

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:
Antropologie a genetika člověka
Studijní obor:
Antropologie a genetika člověka



Bc. Aneta Frajbišová

Studium genů zapojených do kongenitální hypotyreózy

Study of genes involved in congenital hypothyroidism

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Josef Včelák

Praha 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou diplomovou práci vypracovala samostatně na základě uvedených informačních zdrojů. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. V rámci psaní práce byl využit nástroj umělé inteligence (ChatGPT) výhradně pro účely jazykových úprav, stylistických návrhů a k samotnému formátování textu.

V Praze dne 6. srpna 2025

Aneta Frajbišová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Josefu Včelákovi. Dále chci poděkovat svým blízkým za jejich velikou podporu během mého studia.

Obsah

Abstrakt.....	5
Abstract.....	6
1 Teoretický úvod.....	7
1.1 Definice kongenitální hypotyreózy a její význam v kontextu dětské endokrinologie	7
1.2 Epidemiologie a prevalence.....	9
1.3 Etiologie a rizikové faktory	12
1.3.1 DUOX2 a DUOXA2.....	14
1.3.2 KDM6A (UTX)	14
1.3.3 POU1F1	15
1.3.4 TG	15
1.3.5 THRB.....	16
1.3.6 TPO.....	16
1.3.7 TSHR	17
1.4 Patofyziologie.....	19
1.5 Screening, diagnostika a management.....	22
1.6 Léčba	23
2 Cíle práce a hypotézy	24
3 Materiál a metody.....	25
3.1 Vzorky	25
3.2 Izolace DNA z plné krve	25
3.2.1 Příprava přístrojů a reagensů	26
3.2.2 Vlastní izolace - plná nesrážlivá krev (EDTA).....	26
3.2.3 Stanovení koncentrace a čistoty vyizolované DNA.....	27
3.3 Příprava knihoven pro celoexomové sekvenování	28
3.3.1 Enzymatická fragmentace DNA	28
3.3.2 Příprava ligačního mastermixu	29

3.3.3	End repair a dA-tail fragmenty	29
3.3.4	Ligace molekulárních barcodových adaptorů	30
3.3.5	Pročištění po ligaci.....	31
3.3.6	Amplifikace a označení jednotlivých vzorků pomocí duálních indexů	32
3.3.7	Pročištění amplifikované knihovny	33
3.3.8	Kontrola kvality knihoven před hybridizací	33
3.4	Hybridizace.....	34
3.4.1	Poolování knihoven	34
3.4.2	Hybridizace poolů se sondami	35
3.4.3	Příprava streptavidinových kuliček.....	36
3.4.4	Zachycení hybridizovaných knihoven	36
3.5	Amplifikace knihoven	37
3.5.1	Pročištění amplifikovaných poolů finálních knihoven	38
3.5.2	Finální kontrola kvality připravených knihoven.....	39
3.6	Bioinformatická analýza sekvenačních dat.....	39
3.7	Sekvenace	40
3.7.1	Postup vyhodnocení sekvenačních dat.....	41
3.8	Sangerovo sekvenování	42
3.8.1	Příprava sekvenační reakce.....	42
4	Výsledky.....	47
4.1	U pacientů s kongenitální hypotyreózou se nachází dosud nepopsané varianty v genech známých pro jejich roli ve vývoji a funkci štítné žlázy, přičemž tyto varianty vykazují bioinformatické znaky vysoké pravděpodobnosti patogenity (např. sestřih, posun čtecího rámce, nonsense mutace).....	47
4.1.1	Pacient TR4/1.....	49
4.1.2	Pacient TR5/1.....	49
4.1.3	Pacient TR12/1.....	50
4.1.4	Pacient TR20/1.....	50

4.1.5	Pacient TR24/1.....	51
4.1.6	Pacient TR27/1.....	51
4.1.7	Pacient TR 31/1.....	52
4.1.8	Pacient TR36/1.....	52
4.2	Nález bialelických mutací souvisejících s vývojem a funkcí štítné žlázy, které vedou k rozvoji kongenitální hypotyreózy	53
4.3	Některé genetické příčiny kongenitální hypotyreózy považované primárně za recesivní mohou být způsobeny i autozomálně dominantními mutacemi s nižší penetrancí (mírnější formou CH).....	57
4.4	U pacientů s dys hormonogenezí převažuje výskyt patogenních variant v genech kódujících enzymy, podílející se na hormonální syntéze (např. <i>DUOX2</i> , <i>TPO</i>), přičemž většina těchto variant způsobuje narušení katalyticky aktivních domén	58
4.5	Pacient TR34/1 s familiární dysalbuminemickou hypertyroxinémií	60
4.6	Do interpretace výsledků bioinformatických analýz se aktuálně zapojuje strojové učení (umělá inteligence, artificial intelligence, AI). Začíná poskytovat lepší výsledky, než standardní interpretační postupy.	61
5	Diskuze.....	64
5.1	U pacientů s kongenitální hypotyreózou se nachází dosud nepopsané varianty v genech známých pro jejich roli ve vývoji a funkci štítné žlázy, přičemž tyto varianty vykazují bioinformatické znaky vysoké pravděpodobnosti patogenity (např. sestřih, posun čtecího rámce, nonsense mutace).....	65
5.2	Nález bialelických mutací souvisejících s vývojem a funkcí štítné žlázy, které vedou k rozvoji kongenitální hypotyreózy	69
5.3	Některé genetické příčiny kongenitální hypotyreózy považované primárně za recesivní mohou být způsobeny i autozomálně dominantními mutacemi s nižší penetrancí (mírnější formou CH).....	70
5.4	U pacientů s dys hormonogenezí převažuje výskyt patogenních variant v genech kódujících enzymy, podílející se na hormonální syntéze (např. <i>DUOX2</i> , <i>TPO</i>), přičemž většina těchto variant způsobuje narušení katalyticky aktivních domén	71
5.5	Pacient TR34/1 s familiární dysalbuminemickou hypertyroxinémií	72

5.6	Do interpretace výsledků bioinformatických analýz se aktuálně zapojuje strojové učení (umělá inteligence, artificial intelligence, AI). Začíná poskytovat lepší výsledky, než standardní interpretační postupy	73
6	Závěr.....	75
	Seznam zkratek	78
	Seznam literatury	81
	Seznam tabulek a grafů.....	101
	Seznam obrázků	102

Abstrakt

Kongenitální hypotyreóza je ze 75–85 % porucha prenatálního vývoje štítné žlázy, z 15–25 % porucha některého stupně biosyntézy tyreoidálních hormonů s normální nebo zvětšenou štítnou žlázou. Geneticky se jedná o heterogenní skupinu onemocnění.

Do diplomové práce byl zahrnut retrospektivní výběr dětských pacientů, kde převažovali pacienti z Kliniky dětí a dorostu FNKV s kongenitální hypotyreózou a strumou při narození, u kterých byla struma doložena po narození sonograficky. Spolupráce byla nabídnuta i dalším pediatrickým pracovištím v ČR.

Cílem diplomové práce je molekulárně-genetická analýza 47 pacientů s podezřením na kongenitální hypotyreózu, a to pomocí bioinformatického nástroje SeqOne, který umožňuje kompletní bioinformatickou analýzu a interpretaci dat z exomového sekvenování, identifikaci genetické příčiny tohoto onemocnění, klasifikaci nalezené varianty a porovnat výsledky lidského hodnocení s automatizovanou analýzou (AI). Celkem bylo identifikováno 22 variant považovaných za kauzální – 4 patogenní varianty, 4 varianty nejasného významu (VUS) a 13 nových, dosud nepopsaných variant, které vykazovaly vysokou pravděpodobnost patogenity. Nejčastěji zastoupenými geny byly: *DUOX2*, *TSHR*, *TG*. Dále byly přítomny varianty v genech *DUOXA2*, *TPO*, *SLC5A5*, *KDM6A* a *POUIF1*. Také se podařilo nalézt a potvrdit bialelickou mutaci v genu *DUOXA2*. U jednoho pacienta byla dokonce zjištěna v genu *DUOX2* dominantní dědičnost s neúplnou penetrancí. Nejzajímavějším objevem v této práci je nález pacienta s variantou v genu *ALB*, u něhož bylo identifikováno onemocnění familiární dysalbuminemická hypertyroxinémie.

Výsledky výzkumu pomohly objasnit faktory podílející se na etiopatogenezi kongenitální hypotyreózy u českých pacientů, přispěly k upřesnění diagnostiky a zlepšení léčby.

Klíčová slova: kongenitální hypotyreóza, familiární dysalbuminemická hypertyroxinémie, genetické faktory, bialelické mutace, SeqOne, *DUOX2*, *DUOXA2*, *KDM6A*, *POUIF1*, *TG*, *THRB*, *TPO*, *TSHR*

Abstract

Congenital hypothyroidism is caused in 75–85 % of cases by a disorder of prenatal thyroid development, while in the remaining 15–25 %, it results from a defect in one of the steps of thyroid hormone biosynthesis, with a normal or enlarged thyroid gland. Genetically, it represents a heterogeneous group of diseases.

This thesis includes a retrospective selection of pediatric patients from the Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, FNKV diagnosed with congenital hypothyroidism and goiter confirmed by postnatal ultrasound. Collaboration was also offered to other pediatric centers in the Czech Republic.

The aim of this thesis was a molecular-genetic analysis of 47 patients with suspected congenital hypothyroidism using the bioinformatics tool SeqOne, which allows interpretation of data from exome sequencing. The focus was on identifying the genetic cause of the disease, classifying the detected variants, and comparing the results of manual assessment with automated analysis (AI).

In total, 22 variants considered causative were identified — including 4 pathogenic variants, 4 variants of uncertain significance (VUS), and 13 novel, previously undescribed variants with a high likelihood of pathogenicity. The most frequently affected genes were *DUOX2*, *TSHR*, and *TG*. Additionally, variants were found in the *DUOXA2*, *TPO*, *SLC5A5*, *KDM6A*, and *POU1F1* genes. A biallelic mutation in the *DUOXA2* gene was confirmed in one patient. Another noteworthy finding was a *DUOX2* variant showing dominant inheritance with incomplete penetrance. The most interesting discovery of this study was the identification of a variant in the *ALB* gene in one patient, who was subsequently diagnosed with familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia.

The results of this research contributed to a better understanding of the etiopathogenesis of congenital hypothyroidism in Czech patients, improved diagnostic accuracy, and potentially enhanced treatment strategies.

Key words: congenital hypothyroidism, familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia, genetic factors, biallelic mutations, SeqOne, *DUOX2*, *DUOXA2*, *KDM6A*, *POU1F1*, *TG*, *THRB*, *TPO*, *TSHR*

1 Teoretický úvod

1.1 Definice kongenitální hypotyreózy a její význam v kontextu dětské endokrinologie

Pro správný růstový vývoj, rozvoj nervové soustavy a metabolismu člověka je nutná plně funkční štítná žláza. Štítná žláza produkuje tyreoidální hormony (thyroid hormones, TH) 3,5,3'-trijodo-L-tyronin (T3) a 3,5,3',5'-tetrajodo-L-tyronin nebo-li tyroxin (thyroxine, T4) (Shanholtz 2013). Samotná syntéza TH začíná vychytáváním jodu z krevní plazmy a shromažďováním tohoto prvku ve folikulárních buňkách štítné žlázy. Jod je následně zabudován do molekuly tyreoglobulinu skrze tyrosinové zbytky a vzniká tak monojodtyrosin (monoidotyrosine, MIT) a diiodtyrosin (diiodotyrosine, DIT). Z těchto dvou forem (MIT a DIT) se následně sestaví trijodtyronin. T4 je sestaven ze dvou molekul DIT. Poté jsou T3 a T4 uvolněny z tyreoglobulinu a jsou sekretovány (Loevner 1996).

Tyreoidální hormony působí skrze tyreoidní hormonové receptory (thyroid hormone receptors, TRs) (Schroeder a Privalsky 2014). Tyreoidní hormonový receptor se řadí k jaderným hormonovým receptorům, jsou vázány na DNA v oblastech promotorů cílových T3-responzivních genů (Wu Y *et al.* 2001) a tvoří interakci s responzivními elementy tyreoidálních hormonů (thyroid hormone response elements, TREs) (Yen *et al.* 2006). Pokud nemáme na tyreoidní hormonový receptor navázán tyreoidální hormon, je transkripce umlčena, jelikož dochází k interakci s korepresorovým komplexem. Jakmile se však na tyreoidní hormonový receptor naváže tyreoidální hormon, korepresorový komplex se uvolní a následně se navazují koaktivátory, které podpoří zahájení transkripce (Wu Y *et al.* 2001). T3 má mnohem větší afinitu k TRs než T4. Předpokládá se tedy, že T4 funguje jako pro-hormon. Pokud je nedostatek T3, dochází u T4, působením dejodinázy, k odštěpení 5'-jodidového atomu a tedy k přeměně na požadovaný T3 (Gereben *et al.* 2008).

Aby však štítná žláza mohla produkovat a uvolňovat tyreoidální hormony, je nutné mít dobře fungující hypothalamo-hypofysární systém. Řízení produkce začíná hypothalamem, kde se produkuje tyreotropin uvolňující hormon (thyrotropin-releasing hormone, TRH). Sekretovaný TRH stimuluje přední lalok hypofýzy neboli adenohypofýzu, která začne produkovat tyreotropin (thyroid-stimulating hormone, TSH) a ten následně stimuluje štítnou žlázu k tvorbě tyreoidálních hormonů (Sakai *et al.* 2021). Produkce hormonů štítné žlázy je přísně zpětnovazebně regulována. Regulace probíhá negativní zpětnou vazbou T4 a T3.

Kongenitální hypotyreóza (congenital hypothyroidism, CH) je definována nedostatkem tyreoidálních hormonů (sérové hladiny TSH má naopak vysoké/dostačující hodnoty u pacientů (Loevner 1996)) projevující se již při narození (Al-Qahtani 2022). Hypotyreóza může být důsledkem deficitu enzymů, poruch u syntézy tyreoidálních hormonů či kongenitálních anomálií týkající se anatomické a fyziologické funkce štítné žlázy (Loevner 1996). Toto onemocnění má incidenci 1:2000 až 1:4000 narozených (Al-Qahtani 2022) a jedná se o jednu z nejčastějších příčin rozvoje mentální retardace, které je však možné předcházet, pokud je včas zachycena a léčena. Včasná diagnóza však není jednoduchá, protože většina novorozenců nemá jednoznačné příznaky onemocnění. Jejich štítná žláza totiž vykazuje určitou zbytkovou aktivitu a jiné klinické symptomy jsou relativně nespecifické. Navíc bylo zjištěno, že i plody s nulovou produkcí tyreoidálních hormonů mají v sobě tyto hormony od matky, které se do jejich organismu dostaly skrze transplacentární cestu. Průměrně jedna třetina maternálního T4 se dostává do plodu (LaFranchi 2011).

Existují dva základní typy kongenitální hypotyreózy – trvalá neboli permanentní forma onemocnění a dočasná forma onemocnění. U permanentní podoby kongenitální hypotyreózy je deficit tyreoidálních hormonů perzistentní a tito pacienti mají celoživotní léčbu pomocí levotyroxinu. Kdežto dočasná forma kongenitální hypotyreózy se vykazuje pouze dočasným deficitem tyreoidálních hormonů, kdy pacienti jsou léčeni během prvních pár měsíců či pár roků jejich života. Nejčastější etiologií permanentní kongenitální hypotyreózy je tyreoidální dysgeneze nacházející se u 85 % případů a tyreoidální dyshormonogeneze se nachází u zbylých 15 % případů, kdy je u postižených jedinců viditelná tzv. neonatální struma (obrázek číslo 1) (Hashemipour *et al.* 2013). Pokud není kongenitální hypotyreóza včas a správně léčena, může se rozvinout ve vážné onemocnění kretenismus (Loevner 1996).



Obr. č. 1: Fotografie dítěte narozeného s kongenitální hypotyreózou, na které lze pozorovat neonatální strumu (vyznačeno šipkou) (Převzato od MUDr. Eva Al Taji, Ph.D <https://1url.cz/vJFDf>.)

1.2 Epidemiologie a prevalence

Prevalence nám pomáhá pochopit jakési předpoklady pro rozvoj onemocnění u různých komunit a zejména u těch, které jsou ovlivněny vícero těžkými chorobami. Tato data jsou zároveň důležitým zdrojem informací ohledně typických onemocnění u různých populací pro zdravotnické organizace či pro vládní ministerstva zdravotnictví po celém světě (Feuchtbaum *et al.* 2012).

Prevalence kongenitální hypotyreózy po světě nám shrnuje tabulka číslo 1 a tabulka číslo 2. Tyto hodnoty byly sesbírány mezi lety 1969 a 2020. Informace z této studie prozrazují, že je vyšší prevalence permanentní formy kongenitální hypotyreózy než dočasné. Zároveň bylo zjištěno, že celosvětová hodnota prevalence se zvýšila, jakmile byl prioritně upřednostněn screening TSH (zvýšené hodnoty v krvi při nedostatečné funkci štítné žlázy jako prvotní indikátor) oproti T4 (nyní pro účely potvrzení diagnózy). Co se týče rozdílů hodnot prevalence dle geografického rozložení, tak nejvyšší prevalenci kongenitální hypotyreózy vykazuje východní Středomoří a celkově vyšší prevalenci mají státy se středním socioekonomickým statusem (pomalu se rozvíjející zdravotnictví, nedostatek kvalitních

potravin, jodová deficiencie). Také lze pozorovat nárůst prevalence (až o 52 %) v letech 2011–2020 než byla původní hodnota prevalence v letech 1969–1980. Tento jev by šel vysvětlit buď lepší technologickou vybaveností zdravotníků (lepší zachytitelností onemocnění, přesnější a včasnou diagnostikou, zvýšením přežití předčasně narozených dětí, dvojčat či vícčrat) a nebo se naskýtá daleko negativnější pohled na věc, a to daleko horší životospráva či znečištěnější prostředí strumigeny a dalšími endokrinními disruptory. Roli hrají i další zatím neidentifikované faktory. Prevalence kongenitální hypotyreózy postupně narůstá v oblasti východního Středomoří a západního Pacifiku. V oblastech Ameriky a Evropy se prevalence kongenitální hypotyreózy zvyšovala mezi lety 1969 a 2010, ale od roku 2011 se postupně snižuje nejspíše vlivem dobré zdravotní péče (Liu et al. 2020).

Tab. č. 1: Prevalence kongenitální hypotyreózy přehledově seřazena dle geografických oblastí. Data byla sbírána mezi lety 1969-2020. Data jsou dále řazena dle jednotlivých dekad, kdy v každé dekádě probíhaly samostatné výpočty. (Převzato od Liu et al. 2023)

Geografická lokace	1969–1980	1981–1990	1991–2000	2001–2010	2011–2020
východní Středomoří	chybí data	1,21	1,72	2,33	1,19
jihovýchodní Asie	chybí data	chybí data	chybí data	6,9	5,15
USA	2,58	2,9	4,14	5,57	2,77
západní Pacifik	chybí data	2,65	3,27	4,48	4,58
Evropa	2,32	3,06	3,43	4,58	3,73

Tab. č. 2: Prevalence kongenitální hypotyreózy pro současnost (sběr dat rok 2020) dle geografické oblasti, socioekonomického statusu, novorozeneckého screeningu a dle subtypu kongenitální hypotyreózy.

(Převzato od Liu et al. 2023)

<u>Podskupiny zkoumaných oblastí</u>	<u>Prevalence</u>
<u>Dle geografické lokality</u>	
východní Středomoří	7,91
jihovýchodní Asie	5,71
USA	4,11
západní Pacifik	3,71
Evropa	3,56
<u>Dle socioekonomického statusu země</u>	
vyšší třída	3,57
vyšší střední třída	6,76
nižší střední třída	4,60
<u>Dle novorozeneckého screeningu</u>	
TSH	4,82
T4	3,94
<u>Dle subtypu kongenitální hypotyreózy</u>	
dočasná	1,00
permanentní	3,37

Údaje z let 2010– 2022 vykazují, že v České republice je prevalence kongenitální hypotyreózy 1:2 894 (Votava et al. 2024).

Také bylo zjištěno, že je větší prevalence u dočasné formy kongenitální hypotyreózy u ženského pohlaví, kdežto u permanentní formy je větší prevalence u mužského pohlaví

(Abbasi et al. 2022, Alimohamadi et al. 2018). Co se týče prevalence na základě etnicity, výsledky nebyly statisticky signifikantní (Abbasi et al. 2022).

Kongenitální hypotyreóza je často doprovázena poruchami autoimunity např. diabetem 1. typu, střevními onemocněními a dalšími endokrinopatiemi. Je známo více variant kongenitální hypotyreózy, které se od sebe liší svou genetickou podstatou, a tedy i následně svým fenotypem. Mutace může být nalezena v genech pro jodidový transportér, pro TSH receptor nebo v transkripčních faktorech genů důležitých pro správný vývoj štítné žlázy. Z klinického hlediska má kongenitální hypotyreóza následující příznaky: suchá pokožka, vypadávání vlasů, porucha funkce ledvin, kardiovaskulární poruchy, poruchy nervové soustavy, intelektuální omezenost, psychické problémy a další. Během období dětství a adolescence je u jedinců značná porucha růstu (nenaplnují svůj genetický růstový potenciál) a nežídka se projevuje i nadváha (Kiess et al. 2018).

1.3 Etiologie a rizikové faktory

Kongenitální hypotyreóza je známá již od 50. let dvacátého století (Blizzard, Alberts 1956; Mosier 1956). Do devadesátých let dvacátého století (do rozvoje magnetické rezonance) však bylo toto onemocnění považováno jako důsledek porodního traumatismu (Fujita *et al.* 1992). Nyní je známo mnoho transkripčních faktorů a genů podílejících se na rozvoji a funkci hypofýzy. Pokud je jeden z genů nefunkční/nepřítomný, tak dochází k deficitu hypofyzárních hormonů nebo může dojít až k hypoplázii hypofýzy (Burrows *et al.* 1999, Dattani *et al.* 1998, Ingraham *et al.* 1990, Machinis *et al.* 2001, Netchine *et al.* 2000, Wu W *et al.* 1998, Zhang S *et al.* 2020)

Kongenitální hypotyreózu lze rozdělit nejen na permanentní a dočasnou, ale existují i dvě formy dle původu onemocnění tzv. primární/tyreoidální a sekundární/centrální. Primární hypotyreóza označuje formu nemoci, kdy je poškození či chyba ve funkci na úrovni štítné žlázy. U sekundární hypotyreózy je poškození nebo chyba ve funkci na úrovni hypothalamu či hypofýzy (Lauffer *et al.* 2021). Na celosvětové úrovni je však stále zastoupen novorozenecký screening TSH, který ačkoli efektivně, avšak omezeně odhaluje pouze primární formu kongenitální hypotyreózy. Nejvíce se zatím osvědčil postup, kdy je měřeno

T4 a TSH zároveň, což umožňuje detekovat jak primární formu, tak i sekundární formu onemocnění (Zwaveling-Soonawala *et al.* 2015).

Jedním z velmi zásadních faktorů ovlivňujících vznik kongenitální hypotyreózy je genetická složka. Jak již bylo zmíněno výše, za vznikem CH má podíl až z 85 % tyreoidální dysgeneze (Hashemipour *et al.* 2013). U pacientů s kongenitální hypotyreózou byl zaznamenán velký počet mutací u enzymů, které jsou potřeba pro syntézu hormonů. Důležité geny podílející se na produkci tyreoidálních hormonů jsou např. *DUOX1* (dvojitá oxidáza 1, dual oxidase 1), *DUOX1* (maturační faktor dvojitá oxidáza 1, dual oxidase maturation factor 1) (Grasberger a Refetoff 2006, Sun *et al.* 2018), *DUOX2* (dvojitá oxidáza 2, dual oxidase 2), *DUOX2* (maturační faktor dvojitá oxidáza 2, dual oxidase maturation factor 2) (Zamproni *et al.* 2008), *NIS* (symportér sodíkového jodidu, sodium iodide symporter), *IYD* (jodotyrosinová dejodenáza, iodotyrosine deiodinase) (Moreno *et al.* 2008), *PDS* (pendrin) (Scott *et al.* 2000), *TG* (tyreoglobulin, thyroglobulin) (Ieiri *et al.* 1991), *THRB* (receptor tyreoidního hormonu beta, thyroid hormone receptor beta) *TPO* (tyreoidální peroxidáza, thyroid peroxidase) (Abramowicz *et al.* 1992). Nyní je známo 5 genů jejichž mutace se podílejí na rozvoji sekundární formy kongenitální hypotyreózy: *IGSF1* (člen 1 imunoglobulinové superrodiny, immunoglobulin superfamily member 1), *IRS4* (substrát 4 pro inzulinový receptor, insulin receptor substrate 4), *TBLIX* (adaptorový transdukční protein podobný beta 1, the adaptor protein transducin beta-like 1) (Naafs *et al.* 2020), *TRHR* (receptor tyreotropin uvolňujícího hormonu, thyrotropin releasing hormone receptor) (García *et al.* 2017), *TSHB* (β podjednotka tyreotropinu, thyroid stimulating hormone subunit β) (Lauffer *et al.* 2022). Z prací uvádějících procentuální záchyt v populaci lze například uvést 29% výskyt CH mutace v genu *TSHR* (receptor pro tyreotropin, thyrotropin receptor) (Fu *et al.* 2015). Další geny, které mohou mít podíl na rozvoji CH jsou *FOXE1* (forkhead box E1) (Grassi *et al.* 2023, Al Taji 2009), *KDM6A* (demetyláza lysinu 6A, lysin demethylase 6A) *NKX2.1* (NK2 příbuzný transkripčnímu faktoru lokus 1, NK2 transcription factor related locus 1) (Li M *et al.* 2023), *NKX2.5* (NK2 příbuzný transkripčnímu faktoru lokus 5, NK2 transcription factor related locus 5) (Alcántara-Ortigoza *et al.* 2021) *PAX8* (paired box 8) (Hermanns *et al.* 2013).

Je však bráno na zřetel, že vznik kongenitální hypotyreózy je z velké části ovlivněn dočasnými vnějšími faktory působící na hladinu hormonů v organismu než samotným vlivem

špatného vývoje. Tím nejčastějším negativním faktorem může být u matky deficit jodu či naopak nadbytečné množství (předávkování) jodu v těle (Al-Qahtani 2022). Dalším faktorem pro rozvoj kongenitální hypotyreózy může být znečištěné ovzduší pevnými částicemi (particulate matter, PM) (Shang *et al.* 2019), které se mohou dostat do placenty skrze dýchací systém a krev matky. Konkrétně $PM_{2.5}$ obsahuje nebezpečné látky jako polycyklické aromatické uhlovodíky a těžké kovy (Wang Q *et al.* 2016). Právě těžké kovy, jako například olovo, mohou vést ke kongenitálním malformacím a lézím vyvíjejícího se nervového systému (Bellinger 2005). Také se však $PM_{2.5}$ může navázat na receptory pro placentární růstové faktory (van den Hooven *et al.* 2012), což může mít za následek špatné rozvinutí např. endokrinního systému plodu. Bohužel se v České republice doposud nepodařilo prosadit plošný screening štítné žlázy u žen v prvním trimestru těhotenství.

1.3.1 *DUOX2 a DUOXA2*

Gen *DUOXA2* kóduje protein, jehož role je při komplexu s proteinem DUOX2. Komplex DUOX2/DUOXA2 je důležitý pro transport, maturaci a lokalizaci na buněčné membráně proteinu DUOX2, který následně je katalyzátorem pro produkci peroxidu vodíku na apikální membráně folikulárních buněk. Jedná se tedy o protein z rodiny NOX NADPH: O_2 oxidoreduktáza (Morand *et al.* 2009). Peroxid vodíku je nezbytný pro jodizaci tyrosinových zbytků tyreoglobulinu.

1.3.2 *KDM6A (UTX)*

Gen kóduje lysin demetylázu, která je využita v epigenetických modifikacích, které jsou důležité pro regulaci genetické exprese, konkrétně k umlčení exprese. Tato demetyláza odstraňuje methylové skupiny z lysinu 27 na histonu H3, čímž aktivuje transkripci. Tento protein je x-vázaný a obsahuje Jumonji C doménu, která je důležitá pro odstranění metylové skupiny i u trimetylovaných lysinů (Hong *et al.* 2007). Gen

je lokalizován na chromozomu X v oblasti Xp11.3 a uniká inaktivaci (Greenfield *et al.* 1998).

1.3.3 *POUIF1*

Gen *POUIF1* (Třída 1 POU homeobox 1, POU class 1 homeobox 1) se řadí do POU homeodoménové rodiny. Jedná se o transkripční faktor o velikosti 290 aminokyselin obsahující N-terminální transaktivační doménu a DNA vázající doménu, která se skládá ze dvou částí. První část je tzv. POU specifická doména (POU-S, POU-specific domain) a druhá část je POU homeodoména (POU-HD, POU-homeodomain). Obě tyto části jsou sekvenčně specifické (Fang *et al.* 2016).

POUIF1 je důležitým faktorem pro správný vývoj štítné žlázy a pro transkripční regulaci růstového hormonu, TSH a prolaktinového genu. Zatím bylo popsáno cca 30 variant tohoto genu mající za následek hypoplázií štítné žlázy a rozvoj kombinované hormonové deficiencie štítné žlázy s recesivním typem dědičnosti (Jadhav *et al.* 2021).

1.3.4 *TG*

Tento gen se nachází pouze v jedné kopii (tzv. single copy gene), je 270 kbp dlouhý (Baas *et al.* 1986) a nachází se na dlouhém raménku chromozomu 8 v oblasti 8q24.2-8q24.3 (Baas *et al.* 1985). Obsahuje 8.5 kb dlouhou kódující sekvenci, která se dělí na 48 exonů (Mendive *et al.* 2001). Produktem genu je tyreoglobulin, který se syntetizuje ve štítné žláze a jedná se o vysoce specializovaný homodimerní glykoprotein s velkým množstvím tyrosinových zbytků, které mohou být jodované a slouží tak pro biosyntézu tyreoidálních hormonů. Jeho velikost činí 660 kDa (Berg *et al.* 1980). Mutace v tomto genu vedou k rozvoji kongenitální hypotyreózy.

1.3.5 *THRB*

Receptory pro tyreoidální hormony jsou kódované dvěma různými geny *THRA* (receptor tyreoidálních hormonů alfa, thyroid hormone receptor alfa) a *THRB*. Isoformy těchto receptorů jsou TR α 1, TR β 1 a TR β 2 (Prost *et al.* 1988). Každá z těchto isoform má rozdílnou tkáňově-specifickou expresi. Gen *THRA1* je exprimován v celém těle. *THRB*- izoforma TR β 1 je nejvíce exprimována v játrech, kdežto *THRB2* je nejvíce exprimován ve štítné žláze v hypothalamu, ve vyvíjejícím se vnitřním uchu a v sítnici. Dále existuje isoforma TR α 2, která však neváže T3, a zároveň není známa její funkce (Chiamolera *et al.* 2012, Tagami *et al.* 1998). Gen *THRB* je lokalizován na chromozomu 3, konkrétní lokalizace je 3p24.2 a skládá se celkem z 10 exonů (Online Mendelian Inheritance in Man, 2022). Většina mutací se nachází od 7. exonu dál do 10. exonu (Guo *et al.* 2024, Ito *et al.* 2016, Rezgani *et al.* 2022), protože právě v těchto exonech jsou důležité kódující oblasti pro funkci těchto receptorů (Chassande *et al.* 1997). V buněčném jádře se TR α 1, TR β 1 a TR β 2 vážou na TREs v promotorových oblastech cílových genů. V nepřítomnosti T3, receptory často váží korepresory (např. korepresor jaderného receptoru (nuclear receptor corepressor, NCoR)), které utlumují transkripci. V přítomnosti T3, receptory změni konformaci, odpojí korepresory a připojí koaktivátory (např. koaktivátor 1 steroidového receptoru (steroid receptor coactivator-1, SRC-1) nebo CBP/p300) čímž dojde k aktivaci transkripce (Carr *et al.* 1992, Hollenberg *et al.* 1995).

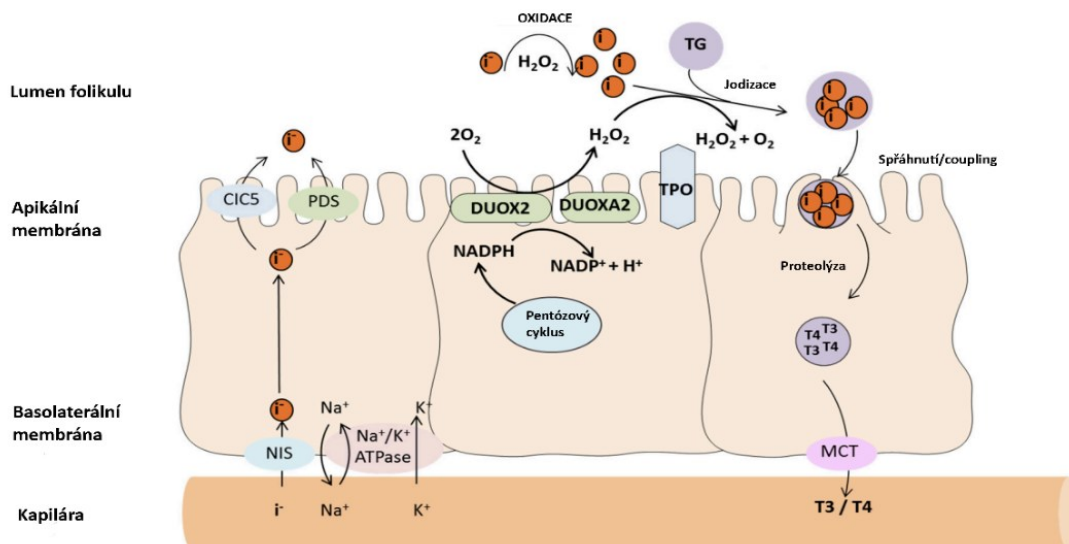
1.3.6 *TPO*

Tyroid-peroxidázová deficiencie je jednou z největších enzymatických příčin rozvoje kongenitální hypotyreózy objevující se v 50 % případů (Avbelj *et al.* 2007). Toto však nejspíše neplatí u pacientů české populace. Nálezy mutací tohoto genu jsou v minoritě oproti jiným genetickým mutacím (Al Taji 2009). TPO je hemoprotein s transmembránovou doménou vázající se na apikální membránu tyrocytů. Skládá se z 933

aminokyselin. Enzymatická aktivita TPO má za následek jodidovou oxidaci, organifikaci a jodotyrosinový coupling (Medeiros-Neto *et al.* 1993).

1.3.7 *TSHR*

Tento gen kóduje tyreotropní receptor a je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 14 v oblasti 14q31. Receptor je spřažen s G proteinem a skládá se ze 7 transmembránových domén a jedné velké extracelulární domény, která je důležitým prvkem pro vysokou afinitu receptoru (Zhang HY *et al.* 2024). Aktivuje se prostřednictvím kontaktu s TSH, kdy následně dochází ke dvěma signalizačním drahám - skrze adenylátcyklázu nebo skrze fosfolipázu C (Grossman *et al.* 1997). Poté dochází k tyreoglobulinové jodizaci a k proliferaci buněk. Dále je tato dráha zodpovědná za regulaci příjmu jodu v tyrocytech. Ztráta funkce tohoto receptoru může vést k TSH rezistenci což vede k rozvoji kongenitální hypothyreózy (Kopp *et al.* 1995). Naopak u hypertyreózy bylo zjištěno, že mutace v genu *TSHR* vede k navýšení produkce cAMP (cyklický adenosin monofosfát, cyclic adenosine monophosphat) a to až šestkrát více než je tomu u buněk s nemutovaným *TSHR* (Bezdučka *et al.* 2021).



Obr. č. 2: Na tomto schématu je znázorněna syntéza tyreoidálních hormonů a zapojení jednotlivých genových produktů v jednotlivých krocích tohoto procesu. Tyreoidální hormony jsou syntetizovány ve vazbě na TG, se kterým zůstávají spojené až do jejich uvolnění do krevní cirkulace. Tyreoglobulin je produkován tyrocyty a sekretován do lumina folikulárních buněk štítné žlázy, kde slouží jako substrát pro syntézu hormonů. K tvorbě hormonů je nezbytná jodizace tyrosinových zbytků tyreoglobulinu, což vyžaduje dostatečný přísun jodu do buňky. Jod (ve formě jodidu) je do tyrocytu aktivně transportován pomocí sodík-jodidového symportéru (NIS – sodium-iodide symporter). Následně je jodid přenášen do lumina folikulu prostřednictvím chloridového kanálu a specifického apiko-laterálního transportéru pendrinu (chlorid-jodidový antiportér). Ve folikulárním lumen dochází ke koncentraci jodidu, který je následně oxidován na reaktivní formu pomocí enzymu TPO. Tato oxidace vyžaduje přítomnost peroxidu vodíku (H_2O_2), který je produkován enzymem DUOX2. Pro správnou funkci DUOX2 je nezbytná přítomnost jeho partnerového proteinu DUOXA2, který zajišťuje jeho stabilizaci a lokalizaci na apikální membráně tyrocytů. Celý tento komplexní proces umožňuje tvorbu hormonů T4 a T3, které jsou následně uvolňovány do krevního oběhu. (Převzato od Szanto et al. 2019)

1.4 Patofyziologie

Tyreoidální hormony hrají velkou roli pro rozvoj všech orgánů, a zvláště jsou důležité pro správný rozvoj mozku. Plod je však do konce prvního trimestru čistě závislý na TH od matky. Zhruba v osmém týdnu gestace začne hypothalamus, žaludek a pankreas plodu produkovat TRH, což následně stimuluje hypofýzu k sekretování TSH. V desátém týdnu gestace se začíná v plodu shromažďovat jod, produkuje se tyreoglobulin a dochází k expresi TSH receptorů. Zároveň dochází k nárůstu hladin tyroxin-vázacího globulinu, TSH a T4. Během druhého trimestru těhotenství dochází k plnému rozvoji dráhy hypothalamus-hypofýza-štítná žláza.

Deficit tyroxinu v časném období vývoje plodu může mít za následek nevratnou mentální a fyzickou retardaci známou jako tzv. kretenismus. Vliv mají i pouze malé změny v hladinách tyreoidálních hormonů, jelikož je mozek jedním z nejcitlivějších orgánů na vývoj a správnou výživu během tohoto období. Tyreoidální hormony mají roli např. při maturaci oligodendrocytů a astrocytů. T3 reguluje stratifikaci kůry mozkové, rozvoj axonů a má také vliv na migraci buněk např. Cajal-Retzius buňky či subplatové buňky (Klosinska *et al.* 2022).

Tyreoidální hormony jsou amfipatické povahy což znamená, že obsahují polární postranní řetězce aminokyselin, které jsou rozpustné ve vodném prostředí a také obsahují nepolární postranní řetězce aminokyselin, které jsou rozpustné v tucích. Při fyziologickém pH tvoří tzv. zwitterion (Tóth *et al.* 2013), tedy amfoterní ion, který neprochází přes membrány pomocí difúze. Membránový transport je tedy zprostředkován skrze membránové přenašeče, které transportují ionty dle jejich hladin koncentrace (Bernal 2017). Aby se tyreoidální hormony dostaly do mozkové tkáně, je třeba projít hematoencefalickou bariérou, která je tvořena endoteliálními buňkami mozkových kapilár, epiteliálními buňkami choroidního plexu a z epitelu pavučnice spojenými pomocí tight junctions (Abbott *et al.* 2010). Skrze tuto membránu existují specifické přenašeče pro tyreoidální hormony, a to konkrétně MCT8 (monokarboxylátový přenašeč 8, monocarboxylate transporter 8) s afinitou pro T4 a T3, OATP1C1 (přenašeč organických aniontů polypeptid 1C1, organic anion transporter polypeptide 1C1) s vysokou afinitou pro T4. Jedná se o membránové proteiny obsahující 12 transmembránových domén. Tyto proteiny exprimují jak nervové

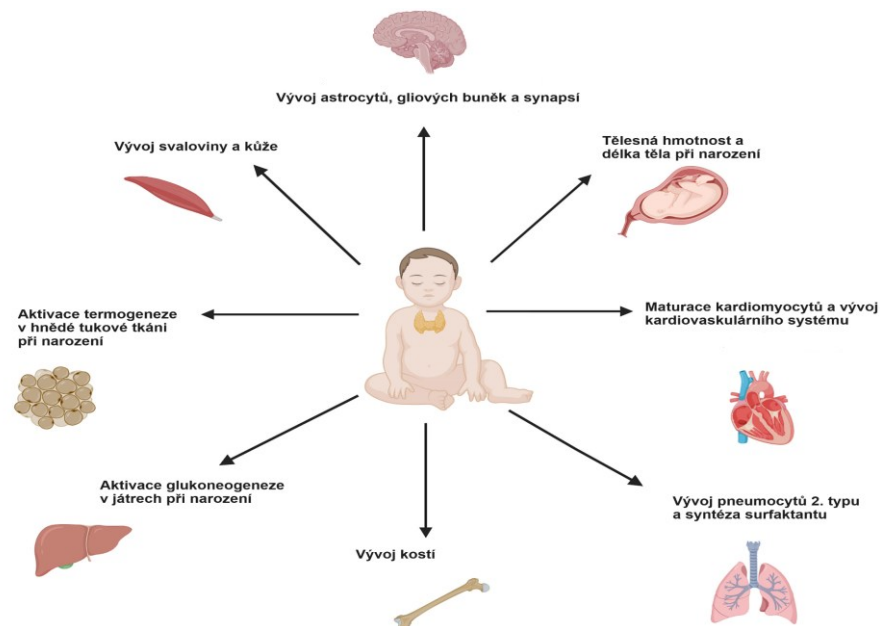
buňky, tak i buňky hematoencefalitické bariéry a jsou také přítomny v endoteliálních buňkách choroidního plexu. Jakmile se T4 dostane do mozkové tkáně, nastává proces dejodenizace, kdy vznikne T3 (Bernal 2017). V lidském mozku máme pouze aktivní DIO2 (dejodináza 2. typu, type 2 deiodinase). DIO2 je dominantně exprimovaná v astrocytech, v tanycytech a v gliových buňkách (Guadaño-Ferraz *et al.* 1997). T3 se váže na nukleární receptory, které fungují na principu ligand-měnícího transkripčního faktoru a regulují tak následnou genovou expresi (Oppenheimer, Schwartz 1997) genů (zejména růstové faktory) důležitých např. při myelinizaci a synaptogenezi (Giannocco *et al.* 2021). TH také regulují expresi Myo-Va (myosin V), který má roli při intracelulárním transportu (Provance *et al.* 2002) a tetheringu organel (Abu-Hamdah *et al.* 2006). Myo-Va se tedy účastní proteinové syntézy, což je další důležitý proces pro správný rozvoj nervové soustavy.

Co se týče rozvoje kosterní soustavy, tyreoidální hormony mají vliv na stimulaci růstu kostí a na osifikaci. Chondrocyty a osteoblasty přímo reagují na TH. Osteoklasty jsou do jisté míry reaktivní na koncentraci tyreoidálních hormonů, ale zatím není jasné, zda jsou přímým cílem pro TH a nebo je efekt TH na resorpci kostní tkáně nepřímý skrze jiné buněčné typy. Vliv tyreoidálních hormonů na osteocyty je zatím neznámý (Bassett a Williams 2016). Pokud máme dítě s neléčenou hypotyreózou, dochází k růstové retardaci a opožděnou skeletální maturaci. Nicméně tento problém se může závčasou vyřešit podáváním tyreoidálních hormonů a dochází k tzv. catch-up růstu (Williams *et al.* 1998).

Dalším důležitým orgánem, na který mají tyreoidální hormony efekt, je srdce. TH mají vliv na kontraktilitu, srdeční frekvenci a metabolismus. Receptory pro TH jsou přítomny v myokardu a také v endotelu. Pokud máme pacienta s hypotyreózou, tak může docházet ke kardiovaskulárním onemocněním. Je odhadováno, že nefunkční tyreoidální systém zvyšuje riziko vaskulární morbidity a mortality o 20 až 80 % (Razvi *et al.* 2018). Geny responzivní na T3 nacházející se v jádrech srdečních myocytů následně regulují (jako transkripční faktory) genovou expresi proteinů důležitých pro správnou funkci myokardu, např. těžké řetězce myosinu, proteiny sarkoplazmatického retikula, fosfolamban či Ca^{2+} ATPázu. Myosin je důležitou komponentou kontraktility srdce, kdežto fosfolamban a Ca^{2+} ATPáza jsou zase důležité pro regulaci vyplavování vápníku ze sarkoplazmatického retikula, dochází tak k řízení systolického a diastolického stavu (Kahaly a Dillman 2005).

Tyreoidální hormony se podílí také na metabolismu lipidů v játrech. Stimulují lipolýzu z tukových zásob bílé tukové tkáně, z čehož vznikají volné mastné kyseliny. Tyto volné mastné kyseliny jsou důležitým zdrojem lipidů pro jaterní tkáň (Sinha *et al.* 2018). Do jaterní tkáně se dostávají pomocí transportérů, které jsou nejspíše řízeny právě skrze receptory tyreoidálních hormonů. U pacientů s hypotyreózou dochází k jevu, kdy je zvýšená koncentrace mastných kyselin s triglyceridovým zbytkem, které se následně prioritně ukládají do bílé tukové tkáně a zároveň je snížený transport těchto mastných kyselin do jater (Klieverik *et al.* 2009). Tento proces má za následek právě značnou obezitu u pacientů s hypotyreózou. Přesný mechanismus je však prozatím nejasný. Co se týká lipogeneze, i při tomto ději mají tyreoidální hormony velký vliv skrze protein Spot 14 (Oppenheimer *et al.* 1987). TH reguluje transkripci genu *Spot 14*, jehož produkt je následně důležitý pro transdukcii TH signálu a následnou transkripci transkripčních faktorů aktivujících lipogenní geny (Brown SB *et al.* 1997, Kinlaw *et al.* 1995).

Zajímavým poznatkem je, že hluchota spřažená s kongenitální hypotyreózou činí 1–10 % podílu všech genetických ohluchnutí (Batsakis a Nishiyama 1962). Příčinou ohluchnutí je právě nedostatek tyreoidálních hormonů.



Obr. č. 3: Schéma znázorňující vliv správně fungující štítné žlázy na rozvoj tkání a orgánů v lidském těle. (převzato od Klosinska *et al.* 2022)

1.5 Screening, diagnostika a management

Novorozenecký screening (newborn screening, NS) je celosvětový program na ochranu lidského zdraví. Jedná se o celoplošné vyhledávání chorob v časném preklinickém stadiu pro včasnou diagnostiku a rychlé nastolení efektivní léčby. V České republice byl zaveden celoplošný NS pro kongenitální hypotyreózu již v roce 1985 (David *et al.* 2018).

Doktor (gynekolog/pediatr) má za povinnost informovat rodiče ohledně možnosti vykonání NS, dále informovat o benefitech, které NS přináší při včasné diagnóze onemocnění, ale také je nutné informovat o možných rizicích při nepodstoupení NS. Dále je nezbytné vysvětlit samotný proces NS a opatření vlády, která se k tomuto úkonu vztahují. Lékař by také měl znát všechny možné faktory ovlivňující výsledek NS jako gestační a postnatální věk, diety, transfúze, parenterální výživu. Výsledky z NS musí být vždy ihned dokumentovány.

Včasná diagnostika kongenitální hypotyreózy je nezbytná pro zmírnění dopadu na neuropsychologický a motorický vývoj dítěte (Delahunty *et al.* 2010). Novorozenecké screeningové testy probíhají z odebrané krve z paty dolní končetiny (tzv. stanovení v suché krevní kapce na speciální screeningové kartě) dítěte mezi druhým a pátým dnem po narození (Kaye *et al.* 2006). Pro odhalení kongenitální hypotyreózy se zjišťují hodnoty TSH, které pak bývá doplněno o stanovení volného T4 pomocí fluorescenční imunoanalýzy. Novorozenci nemají ještě plně vyvinutou hypothalamo-hypofyzární dráhu, a proto mohou mít i zdraví jedinci nižší hodnoty T4. Konkrétně pokud má TSH větší hodnotu v séru než 8.00 mIU/l a volný T4 má nižší hodnotu než 12.0 pmol/L. Tyto limitní hodnoty jsou ukazatelem možné hypotyreózy (David *et al.* 2018).

K jednoznačnému objasnění etiologie onemocnění prostřednictvím identifikace kauzálních genetických variant způsobujících CH slouží sekvenování nové generace, kdy lze vyšetřit panely předem vytipovaných genů (viz kapitola 1.3.), ve kterých se může nacházet mutace způsobující vznik kongenitální hypotyreózy. Tato metoda přináší velkou výhodu v rozsáhlosti využití pro mnohem více onemocnění a redukcí výsledků s falešnou pozitivitou, ale je obtížnější při interpretaci a časově i finálně náročnější. Tyto metody jsou

spolehlivé, ale onemocnění, kde není zatím známá přesná genetická příčina, mají svá omezení (Huang *et al.* 2022).

1.6 Léčba

Léčba pacientů s kongenitální hypotyreózou sestává z vyrovnání deficitu tyreoidálních hormonů. Pro toto vyrovnání se využívá levotyroxin, který lze podávat i dětským pacientům. Dávka se odvíjí od věku pacienta a od rozvinutí hypotyreózy. U dětí je předepisována mnohem větší dávka levotyroxinu na kilogram tělesné hmotnosti než je dávka u dospělých pacientů. Tato léčba je však celoživotní léčbou (Jonklaas *et al.* 2014). Při léčbě levotyroxinem je důležité vyvarovat se konzumaci sójy, která snižuje účinek léčby (Conrad *et al.* 2004).

2 Cíle práce a hypotézy

Cílem diplomové práce je analýza genetických variant a následné objasnění genetických faktorů podílejících se na rozvoji onemocnění kongenitální hypotyreózy u dětských pacientů pomocí celoexomového sekvenování. Výsledky pomohou objasnit faktory podílející se na etiopatogenezi kongenitální hypotyreózy, přispět k upřesnění diagnostiky a zlepšení léčby, která je krucióální.

Práce byla koncipována s cílem ověřit tyto hlavní hypotézy:

1. U pacientů s kongenitální hypotyreózou se nachází dosud nepopsané kauzální varianty v genech známých pro jejich roli ve vývoji a funkci štítné žlázy, přičemž tyto varianty vykazují bioinformatické znaky vysoké patogenity (např. sestřih, posun čtecího rámce, nonsense mutace)
2. Některé genetické příčiny kongenitální hypotyreózy považované primárně za recesivní mohou být způsobeny i autozomálně dominantními mutacemi s nižší penetrancí (mírnější formou hypotyreózy).
3. U pacientů s dyshormonogenezí převažuje výskyt patogenních variant v genech kódujících enzymy podílející se na hormonální syntéze (např. DUOX2, TPO), přičemž většina těchto variant způsobuje narušení katalyticky aktivních domén.
4. Do interpretace výsledků bioinformatických analýz se aktuálně zapojuje strojové učení (umělá inteligence, artificial intelligence, AI). Začíná poskytovat lepší výsledky než standardní interpretační postupy.

3 Materiál a metody

3.1 Vzorky

V rámci této diplomové práce byla odebrána u 47 pacientů a jejich přímých příbuzných žilní krev do vakuovaných odběrových zkumavek s EDTA. Z leukocytů této žilní krve byla následně izolována DNA. Pacienti byli vybráni retrospektivně v Klinice dětí a dorostu Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze a 3. lékařskou fakultou Univerzity Karlovy s kongenitální hypotyreózou a strumou při narození, u kterých byla struma doložena sonograficky. Vzorky byly anonymizovány přiřazením evidenčního čísla v číselné řadě začínající zkratkou TR, s kterým se následně pracovalo jak v laboratoři, tak i při následném vyhodnocení sekvenačních dat.

3.2 Izolace DNA z plné krve

Přístroj:

QuickGene 610L, výrobce FujiFilm Life Science (Jap.) – návod: „Uživatelský manuál CZ“, LAB MARK a.s. a návod "Obsluha a údržba izolátoru DNA"
Hybridization Oven/Shaker, výrobce Amersham Life Science (USA)

Reakční kit: QuickGene DNA whole blood kit L, výrobce KURABO Industries Ltd. (Jap.), kat.č.: DB-L, verze 2.1

Reagencie, které nebyly součástí reakčního kitu:

96% ethanol; Aqua pro injectione (Braun), deionizovaná voda 18 Mohm na čištění přístroje

Protokol: dle firemního návodu

3.2.1 Příprava přístrojů a reagensí

1. Hybridizační pec byla vytemperována na 54–58 °C
2. Proteináza EDB-01 byla rozpuštěna v Aqua pro injectione po dobu 30–40 minut při laboratorní teplotě s občasným promícháním převrácením.
3. Promývací pufr WDB-01 byl naředěn přidáním 170ml 96% ethanolu, mírně protřepán a následně byl ponechán stát při laboratorní teplotě po dobu 30 minut.
4. Poté byla provedena iniciační čistící procedura izolátoru QuickGene-610L (dle návodu výrobce).

3.2.2 Vlastní izolace - plná nesrážlivá krev (EDTA)

1. Bylo odlito 2 ml plné převrácením promíchané nesrážlivé krve do 15ml falkonky (po rysku). Krátce zvortexováno.
2. Následně bylo přidáno 300 µl proteinázy a krátce zvortexováno.
3. Bylo přidáno 2,5 ml lyzačního pufru LDB-03. Silně ručně protřepáno minimálně po dobu 10 sekund, následně zvortexováno na max. rychlost minimálně 20 sekund.
4. Vše bylo inkubováno po dobu 25–30 minut v hybridizační peci při teplotě 54–58 °C.
5. Během inkubace byl připraven izolátor QuickGene-610L (dle návodu výrobce).
6. Po skončení inkubace byly vyjmuty lyzáty z pece a následně bylo zkontrolováno, že neobsahují sraženiny. Poté bylo přidáno 2,6 ml 96% ethanolu.
7. Vše bylo promícháno převrácením minimálně 10 sekund, zvortexováno na max. rychlost minimálně 20 sekund a kontinuálně bylo pokračováno v izolaci na přístroji (bez pauzy).
8. Vzorky byly přelity na kolony ve stojanu, který byl následně uzavřen pomocí spon. Stojan byl vložen do stroje a byl spuštěn START.
9. Ukončení izolace stroj ohlásí zvukově, na displeji se znázorní čísla vzorků a úspěšnost provedení.

10. Stojan byl vyjmut z přístroje, eppendorfky s vyizolovanou DNA byly uzavřeny a přeneseny do plastového stojánku a následně uloženy do lednice k dalšímu zpracování.

3.2.3 Stanovení koncentrace a čistoty vyizolované DNA

Přístroj:

UV/Vis spektrofotometr QIAxpert, výrobce: Qiagen (Německo), měřící celly QIAxpert Slide – 40

1. Byl připraven blank (eluční roztok z izolačního kitu) a vzorky na měření.
2. Každý slide obsahuje 16 jamek (sloupce 1 a 2, řady A až H).
3. Vzorky DNA byly zvortexovány a stočeny.
4. Do jedné jamky bylo nanášeno 2 μ l blanku.
5. Do dalších jamek bylo nanášeno 2 μ l jednotlivých vzorků DNA.
6. Byl vložen slide s nanášenými vzorky DNA do přístroje a bylo spuštěno měření dle návodu výrobce.
7. Po zkontrolování kvality vyizolované DNA, která byla naředěna na pracovní koncentraci 10ng/ μ l elučním pufrem z izolačního kitu.

3.3 Příprava knihoven pro celoxomové sekvenování

Reagenční kit:

5191-6874 SSELXT HS Human All Exon V8, 96 Rxns. For post capture processing of 96 samples.

G9983A SURESELECT XT HS2 Reagent Kit with Index Primer Pairs 1-96, 96 Reactions

Oba kity Agilent (USA)

Protokol: SureSelect XT HS2 DNA Kits Library Preparation (+/-MBC) / Fast-Hyb Target Enrichment / Pre-capture Pooling Workflow, For Illumina Platform NGS. Version F0, May 2023, Agilent

Reagencie, které nebyly součástí reakčního kitu:

100% Ethanol, Q32850 Qubit BR dsDNA Assay Kit, Thermo Fisher Scientific (USA), Aqua pro injectione (Braun, Německo), A63881 AMPure XP Kit, 60 mL Beckman Coulter Genomics (USA)

3.3.1 *Enzymatická fragmentace DNA*

1. Bylo odebráno z každého vzorku DNA 7 μl (o koncentraci 10ng/ μl) do mikrozkušavek, které následně byly uchovány na ledu.
2. Byl nastaven thermocycler dle následující tabulky číslo 3 pro enzymatickou fragmentaci DNA na sekvenační read dlouhý 2 x 150 (dle parametrů sekvenačního kitu):

Tab. č. 3: Nastavení thermocycleru pro fragmentaci

Krok	Teplota	Čas
Krok 1	37 °C	10 minut
Krok 2	65 °C	5 minut
Krok 3	4 °C	neomezený čas

3. Byl připraven fragmentační mastermix do zkumavky, který obsahoval 52 μ l 5X SureSelect fragmentačního pufru a 26 μ l SureSelect fragmentačního enzymu. Následně se tento mastermix promíchal pipetou, krátce stočil v minicentrifuze a uchoval se na ledu.
4. Poté byl tento mastermix přidán po 3 μ l do mikrozkuvek obsahujících 7 μ l DNA vzorků. Opět promícháno pipetou a krátce stočeno v minicentrifuze.
5. Mikrozkuvky dány do thermocycleru (tab. č. 3). Při 4 °C (poslední krok), byly mikrozkuvky vyjmuty z thermocycleru.
6. Následně bylo přidáno 40 μ l vody a poté došlo k uchování vzorků na ledu.

3.3.2 Příprava ligačního mastermixu

1. Ligační pufr byl vortexován 15 sekund.
2. Následně byl připraven ligační mastermix do zkumavky, který obsahoval 598 μ l ligačního pufru a 52 μ l T4 DNA ligázy. Toto vše bylo promícháno pipetou, krátce stočeno v minicentrifuze a ponecháno při pokojové teplotě 30-45 minut.

3.3.3 End repair a dA-tail fragmenty

1. Byl nastaven thermocycler dle následující tabulky číslo 4:

Tab. č. 4: Nastavení thermocycleru pro opravení konců/A-Tailing

Krok	Teplota	Čas
Krok 1	20 °C	15 minut
Krok 2	72 °C	15 minut
Krok 3	4 °C	neomezený čas

2. End Repair-A Tailing pufr byl vortexován 15 sekund.

3. Následně byl připraven End repair/A Tailing mastermix, který obsahoval 416 μ l End Repair-A Tailing pufru a 104 μ l End Repair-A Tailing enzymového mixu. Vše promícháno pipetou, krátce stočeno v minicentrifuze a uchováno na ledu.
4. Ke vzorkům fragmentované DNA bylo přidáno 20 μ l End Repair-A Tailing mastermixu. Opět vše promícháno pipetou, zvortexováno a krátce stočeno v minicentrifuze.
5. Poté byly fragmentované vzorky s End Repair-A Tailing mastermixem dány do thermocycleru (tab. č. 4). Jakmile došlo v thermocycleru k poslednímu kroku, vzorky byly vyjmuty z přístroje a přemístěny na led.

3.3.4 Ligace molekulárních barcodových adaptorů

1. Thermocycler byl nastaven dle tabulky číslo 5:

Tab. č. 5: Nastavení thermocycleru pro ligaci

Krok	Teplota	Čas
Krok 1	20 °C	30 minut
Krok 2	4 °C	Neomezený čas

2. Do vzorků bylo přidáno 25 μ l ligačního mastermixu. Vše promícháno pipetou, zvortexováno a krátce stočeno v minicentrifuze.
3. Následně byl přidán po 5 μ l do každé mikrozkušavky ke vzorkům SureSelect XT HS2 mix oligo adaptéru. Vše opět promícháno pipetou a krátce stočeno v minicentrifuze.
4. Mikrozkušavky byla následně dány do thermocycleru (tab. č. 5). V posledním kroku byly mikrozkušavky vyjmuty a uschovány na ledu.

5. AMPure XP kuličky byly vyjmuty z mrazáku a vytemperovány na laboratorní teplotu po dobu 30 min.

3.3.5 Pročištění po ligaci

1. Po 30 minutách, kdy byly AMPure XP kuličky ponechány při laboratorní teplotě, byly následně intenzivně zvortexovány dokud nedošlo k homogenizaci.
2. Poté bylo přidáno 80 μ l AMPure XP kuliček ke každému vzorku, vše promixováno a inkubováno po dobu 5 minut při pokojové teplotě.
3. Po inkubaci byly kuličky separovány pomocí magnetu, který působil 10 minut. Vytvořený supernatant byl odsán pipetou a odstraněn pipetou. Následně došlo k promytí kuliček skrze 180 μ l 80% roztoku ethanolu. Tento krok se opakoval dvakrát.
4. Po druhém promytí ethanolem byl zbytkovým ethanol do sucha odsán pipetou.
5. Vzorky ponechány k úplnému vyschnutí v thermocycleru nastaveného na 37 °C po dobu 2 minut bez zavření víkem.
6. Poté bylo přidáno 35 μ l vody do každého vzorku, pipetou kuličky sesuspendovány a následně se vzorky ponechaly inkubovat 2 minuty při laboratorní teplotě.
7. Kuličky byly separovány ke straně PCR zkumavky pomocí magnetu, který působil 5 minut.
8. Poté bylo vzato 34 μ l čistého supernatantu do nových mikrozkušavek a vše bylo uchováno na ledu.

3.3.6 Amplifikace a označení jednotlivých vzorků pomocí duálních indexů

1. Indexy byly vyndány z mrazáku a ponechány při pokojové teplotě pro rozmrznutí.
2. Thermocycler byl nastaven pro polymerázovou řetězovou reakci (polymerase chain reaction, PCR) dle tabulky číslo 6:

Tab. č. 6: Nastavení thermocycleru pro PCR pro vzorky o objemu 50 μ l

Krok	Počet cyklů	Teplota	Čas
Krok 1	1	98 °C	2 minuty
Krok 2	9	60 °C	30 sekund
Krok 3	1	72 °C	5 minut
Krok 4	1	4 °C	Neomezený čas

3. Byl připraven PCR mastermix obsahující 260 μ l 5X Herkulázy II pufru s nukleotidy a 26 μ l fúze Herkulázy II a DNA polymerázy. Vše opět bylo promícháno pipetou, dáno do minicentrifugy a uchováno na ledu.
4. Z ledu byly vyjmuty vzorky DNA a k nim bylo přidáno 11 μ l PCR mastermixu.
5. Dále bylo přidáno 5 μ l SureSelect XT HS2 indexů vázajících se na primery (tzv. primer pair) do každého vzorku, vše bylo zalepeno fólií, zvortexováno a krátce stočeno v minicentrifuze.
6. Byl zapnut thermocycler (tab. č. 6). Vzorky byly vloženy do thermocycleru jakmile teplota dosáhla 98 °C a následně proběhla amplifikace pomocí PCR reakce.

3.3.7 Pročištění amplifikované knihovny

1. AMPure XP kuličky byly opět zvortexovány dokud nedošlo k jejich homogenizaci.
2. Vzorky byly vyjmuty z thermocycleru a bylo přidáno 50 μ l AMPure XP kuliček ke každému vzorku, vše promícháno pipetou a následně inkubováno při pokojové teplotě na 5 minut.
3. Kuličky byly separovány pomocí magnetu, který působil po dobu 5 minut. Poté byl supernatant odsán pipetou a odstraněn.
4. Kuličky byly promyty 180 μ l 70% ethanolu a to celkem dvakrát.
5. Jakmile byly kuličky promyty podruhé, byla odsáta pipetou tekutá složka, dáno poté do minicentrifugy a byl odsán pipetou i zbylý ethanol.
6. Vzorky se nechaly schnout v thermocycleru bez víka při teplotě 37 °C po dobu 2 minut.
7. Následně byly vzorky krátce stočeny v minicentrifuze, ještě jednou vráceny na magnet, opět na 5 minut a následně byl opět pipetou odsán zbývající ethanol. Vzorky byly poté nechány na vzduchu cca 2 minuty do úplného odpaření ethanolu.
8. K takto vysušených vzorků bylo přidáno 15 μ l vody, vše uzavřeno, zvortexováno a krátce stočeno v minicentrifuze. Následně došlo k inkubaci při laboratorní teplotě po dobu 2 minut.
9. Kuličky byly separovány magnetem během 3 minut ke stěně mikrozkuhavky.
10. Supernatant (eluát) byl posléze přepipetován do nových mikrozkuhovek a vzorky byly uchovány na ledu.

3.3.8 Kontrola kvality knihoven před hybridizací

1 μ l od každé knihovny byla kontrolováno prostřednictvím bioanalyzátoru Agilent 2100. Správná velikost knihoven před hybridizací musí být v rozmezí 350-450bp.

3.4 Hybridizace

Použité chemikálie:

5X Herkuláza II pufr s nukleotidy, 70% ethanol, AMPure XP kuličky, Herkuláza II fúze s DNA polymerázou, Sondy Exom V8 (SureSelect XT HS Human All Exon V8), SureSelect Post-Capture primerový mix, SureSelect promývací pufr, SureSelect RNase Block, SureSelect rychlý hybridizační pufr, SureSelect streptavidinové kuličky, SureSelect vazebný pufr, SureSelect XT HS2 blokovací mix, TE pufr (Tris a kyselina ethylendiaminotetraoctová), Aqua pro injectione

3.4.1 *Poolování knihoven*

1. Byl připraven pool z 8 knihoven do PCR stripů tak, aby celkové množství DNA z poolu bylo 3 µg DNA na hybridizaci.
2. Objem poolu byl redukován pod 12 µl. K tomuto kroku byl použit vakuum koncentrátor, který byl nastaven na 45 °C.
3. Poté byla přidána voda do objemu 12 µl.
4. Vše bylo zvortexováno po dobu 30 sekund, krátce stočeno v minicentrifuze a uchováno na ledě.

3.4.2 Hybridizace poolů se sondami

1. Thermocycler byl nastaven dle tabulky číslo 7.

Tab. č. 7: Nastavení thermocycleru na program hybridizace

Krok	Počet cyklů	Teplota	Čas
Krok 1	1	95 °C	5 minut
Krok 2	1	65 °C	10 minut
Krok 3	1	65 °C	1 minuta – zde přerušeno a přidány sondy
Krok 4	60	65 °C	1 minuta
		37 °C	3 sekundy
Krok 5	1	65 °C	neomezený čas

2. Do vzorků bylo přidáno 5 µl SureSelect XT HS2 blokovacího mixu. Následně vše bylo zvortexováno po dobu 5 sekund, krátce stočeno v minicentrifuze a zkontrolována absence bublinek.
3. Pooly přemístěny do thermocycleru. Při 3. kroku byl program pozastaven.
4. Bylo připraveno 25% RNazový blokovací roztok, který obsahoval 3,5 µl SureSelect RNase Block a 10,5 µl vody. Vše bylo promícháno a uchováno na ledu.
5. Dále byl připraven Sondovací hybridizační mix, který obsahoval 14 µl 25% SureSelect RNase Block solution, 35 µl sond a 42 µl SureSelect rychlého hybridizačního pufru. Vše zvortexováno, krátce stočeno v minicentrifuze a okamžitě dáno do PCR stripu v thermocycleru se vzorkami, které byly pozastaveny na 3. kroku. Do každého vzorku se dalo 13 µl sondovacího hybridizačního mixu. Vše promixováno pipetou a zavřeno.
6. Následně vše bylo zvortexováno, krátce stočeno v minicentrifuze a byla zkontrolována absence bublinek. Poté ihned vše vráceno do thermocycleru a pokračovalo se v programu hybridizace.

3.4.3 Příprava streptavidinových kuliček

1. SureSelect streptavidinové kuličky byly vyjmuty z lednice a následně byly zvortexovány dokud nebyla dosažena homogenizace.
2. Byl vzat nový strip, kam bylo do každé mikrozkušavky rozpipetováno 50 μ l streptavidinových kuliček.
3. Následně byly kuličky třikrát promyty SureSelect vazebným pufrem. Pro každé promytí bylo přidáno ke kuličkám 180 μ l vazebného pufru, vše promícháno a krátce stočeno v minicentrifuze. Poté byly kuličky separovány pomocí magnetu, který působil po dobu 5 minut. Jakmile byly všechny kuličky separovány, tak byl pipetou odstraněn supernatant.
4. Po promytí byly kuličky resuspendovány v 200 μ l SureSelect vazebném pufru a byly ponechány při pokojové teplotě.

3.4.4 Zachycení hybridizovaných knihoven

1. Jakmile byly streptavidinové kuličky připraveny a hybridizační program v thermocycleru byl u konce, vzorky byly vyjmuty z thermocycleru a uchovány při pokojové teplotě.
2. Poté byly vzorky co nejdříve dány do stripu se streptavidinovými kuličkami a promixovány pipetou. Následně byly vzorky s kuličkami inkubovány na třepačce při 1400-1900 rpm na 30 minut při pokojové teplotě.
3. Během této inkubace byl připraven SureSelect promývací pufr. Promývací pufr (200 μ l) byl dán do nových stripů, vše uzavřeno a dáno do thermocycleru na 70 °C.
4. Po 30 minutách zachycení hybridizace, byly vzorky krátce stočeny v minicentrifuze a poté byly streptavidinové kuličky separovány magnetem do té doby, než byl roztok čistý. Supernatant byl posléze odsán pipetou a vylit do odpadu.

5. Streptavidinové kuličky byly posléze resuspendovány při pokojové teplotě v 200 μ l SureSelect promývacím pufru. Vše bylo promícháno pipetou dokud nebyly kuličky plně resuspendovány.
6. Kuličky byly poté separovány magnetem po dobu 1 minutu a poté byl opět pipetou odsán supernatant.
7. Magnet byl odejmut, a vzorky s kuličkama byly ponechány při pokojové teplotě. Kuličky byly promyty šestkrát pomocí předehřátého SureSelect promývacího pufru. Pro každé promytí byl přidán 200 μ l promývací pufr, vše promícháno pipetou, dáno do vortexu na 8 sekund a krátce do centrifugy. Dále bylo vše inkubováno po dobu 5 minut při 70 °C v thermocycleru. Poté byly kuličky separovány pomocí magnetu po dobu 1 minuty při pokojové teplotě. Supernatant byl pipetou odstraněn.
8. Jakmile byl všechn promývací pufr odstraněn, bylo přidáno 25 μ l vody do každé mikrozkušavky, vše bylo promícháno pipetou a uchováno na ledě.

3.5 Amplifikace knihoven

1. Thermocycler byl nastaven dle tabulky číslo 8.

Tab. č. 8: Nastavení thermocycleru na program po zachycení PCR

Krok	Počet cyklů	Teplota	Čas
Krok 1	1	98 °C	2 minuty
Krok 2	10	98 °C	30 sekund
Krok 3	1	72 °C	5 minut
Krok 4	1	4 °C	neomezený čas

2. Byl připraven mastermix po zachycení PCR, který obsahoval 91 μ l vody, 70 μ l 5X Herkuláza II pufru s nukleotidy, 7 μ l Fúzní DNA polymerázy Herkuláza II a 7 μ l SureSelect Post-Capture primerový mix. Vše bylo promícháno pipetou, krátce stočeno v minicentrifuze a uchováno na ledu.
3. Bylo vzato z ledu 25 μ l knihoven navázaných na kuličkách a přidalo se k tomu 25 μ l PCR mastermixu pro amplifikaci.

4. Opět vše promícháno pipetou, dokud nenastala homogenizace suspenze.
5. Vzorky byly posléze dány do cycleru a byl spuštěn program dle tabulky číslo 8.
6. Jakmile nastal poslední krok (4 °C), vzorky byly odebrány ze cycleru a krátce stočeny v minicentrifuze.
7. Poté byly kuličky separovány pomocí magnetu, který působil 2 minuty.
8. Čirý supernatant byl posléze odsán do nového stripu a uchován na ledu.
9. AMPure XP kuličky byly vyndány z lednice a ponechány při pokojové teplotě alespoň 30 minut.

3.5.1 *Pročištění amplifikovaných poolů finálních knihoven*

1. AMPure XP kuličky byly zvortexovány dokud nenastala homogenizace.
2. Poté bylo přidáno 50 µl AMPure XP kuliček do každé mikrozkušavky s amplifikovanou DNA, vše bylo promixováno pipetou, dokud nenastala homogenizace suspenze a poté bylo vše inkubováno při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
3. Kuličky byly posléze separovány pomocí magnetu, který působil 5 minut. Supernatant byl poté odstraněn pipetou.
4. Kuličky byly poté dvakrát promyty 180 µl 70% ethanolu a za využití magnetu, který působil 1 minutu. Supernatant byl vždy odstraněn pipetou.
5. Po druhém promytí byly knihovny krátce stočeny v minicentrifuze a byl pipetou odsán zbytkový ethanol.
6. Vzorky následně vysušeny pomocí thermocycleru s otevřeným víkem, který byl nastaven na teplotu 37 °C po dobu 2 minut.
7. Poté bylo k vzorkům přidáno 25 µl TE. Vše zvortexováno a krátce stočeno v minicentrifuze. Následně vše bylo inkubováno při pokojové teplotě po dobu 2 minut.
8. Kuličky byly poté separovány pomocí magnetu, který působil 5 minut.
9. Supernatant byl odsán pipetou do čistých mikrozkušavek a byl uchován na ledu.

3.5.2 *Finální kontrola kvality připravených knihoven*

Kvalita knihoven byla zkontrolována prostřednictvím bioanalyzátoru Agilent 2100 s použitím High Sensitivity DNA Kitu, Agilent (USA) dle firemního protokolu (1 μ l knihovny). Optimálně připravené finální knihovny mají velikost v rozmezí 330 až 450 bp.

3.6 Bioinformatická analýza sekvenačních dat

K vlastní analýze a vyhodnocení sekvenačních dat byl použit bioinformatický cloud SeqOne (Francie). Tento program provedl kompletní bioinformatickou analýzu z FASTQ souborů až po terciární analýzu variant, která pomohla s interpretací a posouzením vztahu jednotlivých variant s fenotypem pacientů. Výrobce reagenčního kitu na přípravu knihoven f. Agilent spolupracuje s f. SeqOne, takže analýza již byla optimalizována pro V8 exom, který byl použit. SeqOne již obsahoval souřadnice cílových úseků pro použitý V8 exom (.bed file) k mapování vůči referenční sekvenci. Při nahrání FASTQ souborů k analýze se pouze zadávalo pohlaví probanda.

Bioinformatická pipeline SeqOne byla již optimalizovaná pro použitý SureSelect XT HS Human All Exon V8 pro vyhodnocení germinálních variant výrobcem. Nastavení se při vyšetření vzorků neměnilo. Jako referenční genom byl použit GRCh38. Celková délka sekvenovaných úseků převyšovala 63 Mbp. Použitý workset SeqOne byl verze v2.3.10.

SeqOne (workset v2.3.10) – použité bioinformatické nástroje

ALUMEI (verze v1.3.0); HMMER (verze v3.4.0); BCFTools (verze v1.16.1); Bedtools (verze v2.31.0); Bwamem2 (verze v2.2.1); VEP (verze v112-v1.0.0); GATK (verze v4.6.0.0); GRIDSS (verze v2.13.2); SAMtools (verze v1.16.1); VCFanno (verze v0.3.5); GeneCov (verze v3.3.1); CrossOmim (verze v1.7.0).

SeqOne (workset v2.3.10) – použité databáze pro terciální analýzu

Dfam (verze 3.0); VEP Data (verze 112); MaxEntScan (verze 040420) GeneSplicer (verze 090910); Raw ClinVar (verze 2025-01); Cosmic Coding Mutation (verze v95); dbSNP (verze 180418); 1000 Genomes database (verze 161214); Gnomad (verze 4.1.0-v2); OMIM (verze 250101); RefGene Sorted (verze 20211119_2024-03).

3.7 Sekvenace

Knihovny předány na sekvenování do Fakultní nemocnice Hradec Králové (FNHK) na sekvenátor DNBSEQ-G400, MGI Tech Co., Ltd. (Čínská lidová republika). Před vlastní sekvenací musely pracovníci FNHK knihovny převést na jednořetězcové cirkulární DNA z důvodu použití DNBSEQ technologie sekvenování dle protokolu výrobce sekvenátoru. DNBSEQ je sekvenační technologie vyvinutá společností MGI, která kombinuje tvorbu DNA nanokoulí (DNA nanoball, DNB) s principem sekvenování pomocí syntézy (sequencing, SEQ).

Knihovny se převedou na cirkulární molekuly. Tyto kruhové molekuly slouží jako templáty pro rolling circle amplifikaci, při níž vznikají DNA nanokoule obsahující tisíce kopií jednoho fragmentu bez nutnosti PCR (polymerázová řetězová reakce, polymerase chain reaction), čímž se snižuje chybovost. Nanokoule se následně rozprostřou na sekvenační čip s pravidelnou sítí jamiček (tzv. paternovaná flow-cell), kde je každá jamka obsazena jedinou DNB. Sekvenování probíhá postupným přidáváním fluorescenčně značených nukleotidů, jejichž inkorporace do templátu je snímána optickými senzory. Díky vysoké hustotě DNBs na čipu a silnému signálu z více kopií je dosaženo vysoké přesnosti, efektivity i nižších nákladů na sekvenaci oproti některým jiným technologiím. Jednalo se o tzv. paired-end sekvenaci, při které se sekvenují knihovny z obou stran pro zvýšení přesnosti sekvenování.

Výsledek sekvenace, obdržené FASTQ soubory z FNHK byly nahrány na bioinformatický cloud SeqOne (Francie), kde proběhly veškeré bioinformatické analýzy.

3.7.1 Postup vyhodnocení sekvenčních dat

1. Kontrola kvality sekvenčních dat

Rozhodujícími metrikami přiřazení sekvencí vůči referenčnímu genomu (Alignment metrics) kontrolované u každého vzorku byly: procento přiřazených readů vůči GRCh38 (Aligned reads), procento PCR duplikátů (Duplicate reads), procento bazí s kvalitou vyšší než Q30 (Base Qual ≥ 30) a průměrné pokrytí cílových úseků (Average target coverage). V dalším kroku pak detailní počty genů, které měly některý exon hůře pokrytý, přednostně pro vytvořený virtuální Hereditary thyroid diseases (dědičná onemocnění štítné žlázy) panel.

Geny spojené s kongenitální hypotyreózou – virtuální panel ro vyhodnocení exomů

<u>Dysgeneze ŠŽ</u>	<u>Dyshormonogeneze</u>	<u>Centrální hypotyreóza</u>	<u>Syndromy a transkripční faktory spojené s vrozenou hypotyreózou</u>
NKX2-1		TSHB	
FOXE1		TRHR	
PAX8		TBL1X	
NKX2-5	SLC5A5	HESX1	SALL1, UBR1
GLIS3	TPO	LHX3	DYRK1A, ELN
TSHR	SLC26A4	LHX4	KDM6A, KMT2D
JAG1	TG	SOX3	KAT6B, ALMS1
TBX1	IYD	OTX2	FGF8, HHEX
	DUOX2	POU1F1	NKX2-3, NKX2-6,
	DUOXA2	PROP1	PTRH2, RYR2
	GNAS	IRS4	SERPINA7, SLC30A10
			SLCO1C1(OATP1C1)
			TTR, MC2R
			MRAP, PDE4D
			PRKAR1A, TBC1D24
			TRAPPC9, TXNRD2
			FOXI1, KCNJ10
<u>Rezistence na hormony štítné žlázy</u>		<u>Abnormální metabolismus tyreoidálních hormonů</u>	
THRB		DIO1	
THRA		DIO2	
SLC16A2		DIO3	
SECISBP2			

Obr. č. 4: Virtuální panel genů

2. Postup vyhodnocení nalezených variant

Na základě literární rešerše a dostupných údajů v databázích, byl sestaven virtuální panel genů pojmenovaný Hereditary thyroid diseases panel, u kterých již je známa souvislost s rozvojem kongenitální hypotyreózy (obrázek číslo 4), kterým začínalo vyšetření jednotlivých zjištěných variant. Pokud nebyla zjištěna kauzální varianta, následným krokem bylo vyhodnocení celého exomu.

Program SeqOne hodnotí patogenitu variant dvěma způsoby. Klasický přístup je pomocí aktuálních pravidel stanovených Americkou společností lékařské genetiky a genomiky (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG (Richards *et al.* 2015)), která umožňují rozdělit varianty do 5 základních skupin: patogenní (P), pravděpodobně patogenní (LP), varianty nejasného významu (VUS), pravděpodobně benigní (LB) a benigní varianty (B), a nově pomocí analýzy s umělou inteligencí (machine learning), kterou výrobce nazývá DiagAI.

DiagAI využívající strojové učení založené na čtyřech komponentech hodnocení:

1. Na algoritmu UP², který předpovídá patogenitu varianty
2. Na matici PhenoGenius, která hodnotí shodu mezi genem a The Human Phenotype Ontology (HPO) pacienta, pokud byla HPO zadána (<https://hpo.jax.org/>)
3. Na shodě mezi pozorovaným genotypem a způsobem přenosu onemocnění popsaným v databázích GenCC (<https://thegencc.org/>), OMIM (<https://omim.org/>) a PanelApp (<https://panelapp-aus.org/>).
4. Na kvalitě varianty

3.8 Sangerovo sekvenování

3.8.1 Příprava sekvenační reakce

Protokol: dle firemních postupů BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, používající ExoSAP-IT Expresss PCR kit na čištění připravených produktů pro generování vysoce kvalitní sekvenančních dat. Vlastní sekvenace proběhla na automatickém kapilárním sekvenátoru SeqStudio s využitím Sequence Analysis Software a Variant Reporter Software verze 20/2020 - vše od firmy Thermo Fisher Scientific Inc. (USA).

Pro konfirmační vyšetření zjištěné varianty a vyšetření přenašečství konkrétní varianty u dalších členů rodiny bylo použito klasické Sangerovo sekvenování na kapilárním sekvenátoru.

Den předem byla provedena amplifikace vzorků s vhodnou délkou vzniklých PCR produktů pro sekvenování typu Sanger (500-600pb), konkrétně vzorky TR21/1 (potenciální pacient s kongenitální hypotyreózou) 4. exon genu DUOXA2, konfirmační odběr TR21/1 4. exon genu DUOXA2, TR21/2 (otec TR21/1) 4. exon genu DUOXA2, TR21/3 (matka TR21/1) 4. exon genu DUOXA2, TR21/1 5. exon genu DUOXA2, konfirmační odběr TR21/1 5. exonu genu DUOXA2, TR21/2 5. exonu genu DUOXA2 a TR21/3 5. exonu genu DUOXA2 + negativní kontroly.

3.8.1.1 Stanovení koncentrace PCR produktů

Reagence: Qubit 1X dsDNA High Sensitivity Assay kit

Přístroj: Fluorimetr Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific Inc. (USA))

1. Do zkumavek označených S1 (standard 1), S2 (standard 2) bylo pipetováno 190 μ l pufru s fluorescenční barvičkou + 10 μ l standardů. Následně změřeny na fluorimetru pro vytvoření 2-bodové kalibrační křivky.
2. Do nových osmi zkumavek označených TR21/1 4. exon 98, TR21/1 4. exon 30 (konfirmační odběr pacienta s hypotyreózou), TR21/2 4. exon 29 (otec pacienta TR21/1), TR21/3 4. exon 28 (matka pacienta TR21/1), TR21/1 5. exon 98, TR21/1 5. exon 30, TR21/2 5. exon 29. TR21/3 5. exon 28, bylo pipetováno 198 μ l pufru s fluorescenční barvičkou + 2 μ l PCR produktů.
3. Přístroj automaticky dle kalibrační křivky odečetl koncentraci měřený PCR produktů (dsDNA).

3.8.1.2 Ředění PCR produktů

Z měření z Fluorimetru Qubit 2.0 vyšla koncentrace PCR produktů v průměru 40ng/μl. PCR produkty byly ředěny na požadovanou koncentraci 2 ng/μl vodou.

3.8.1.3 Enzymatická purifikace PCR produktů

Reagence: Injekční sterilní voda, ExoSAP-IT Express

1. označen strip (jedna jamka pro jeden vzorek)
2. napipetováno 5 μl naředěných PCR produktů a 2 μl ExoSAP-IT Express reagence, která obsahuje všechny potřebné komponenty pro enzymatickou purifikaci.
3. Připravený strip se vzorky se umístil na 5 min do thermocycleru T100 Thermal Cycler dle N-OME-25 na program SEQ-ST dle tabulky číslo 9.

Tab. č. 9: Nastavení thermocycleru na program SEQ-ST pro enzymatickou purifikaci

Krok	Teplota	Čas
Krok 1	37 °C	4 minuty
Krok 2	80 °C	1 minuta
Krok 3	4 °C	neomezený čas

4. Purifikované produkty byly do dalšího použití uchovány na ledu.

3.8.1.4 Příprava sekvenační reakce pomocí kitu BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing

Reagence: Injekční sterilní voda Braun, Sekvenační pufr, BigDye Terminator v 1.1 & v3.1 5X Ready reakční mix, Forward a Reverse primery, které byly shodně použité i pro amplifikace vzorků

1. Byl připraven mastermix, kde bylo do eppendorfky dáno 36 μ l BigDye Ready reakčního mixu, 18 μ l sekvenačního pufru a 54 μ l injekční vody. Vše následně zvortexováno a stočeno na minicentrifuze.
1. Do stripu bylo přidáno 6 μ l mastermixu a 1 μ l reverse nebo forward primerů a následně vše zvortexováno a stočeno na minicentrifuze.
2. Dále do stripu bylo přidáno 3 μ l purifikovaných PCR produktů.
3. Vše umístěno do thermocycleru T100 Thermal Cycler dle N-OME-25 a nastaví se program „SEQ-ST“ dle tabulky číslo 10.

Tab. č. 10: Nastavení thermocycleru pro program SEQ-ST na sekvenování

Krok	Počet cyklů	Teplota	Čas
Krok 1	1	96 °C	1 minuta
Krok 2	25	96 °C	10 sekund
		50 °C	5 sekund
		60 °C	4 minuty
Krok 3	1	4 °C	neomezený čas

3.8.1.5 Vlastní sekvenace na kapilárním sekvenátoru SeqStudio

Protokol: N - OME - 49 Návod na ovládání přístroje SeqStudio™ Genetic Analyzer a SOPt - OME - 04 Genetický analyzátor SeqStudio

Bylo přeneseno 10 µl připravených forward a reverse sekvenačních reakcí do příslušných jamek v sekvenační destičce. Destička byla vložena do autosampleru přístroje, přičemž bylo dbáno na správné umístění podle číslování pozic. Bylo zkontrolováno, že je v přístroji nainstalovaná kapilára a cartridge s polymerem, a že má dostatečný objem polymeru pro běh. Pomocí připojeného počítače a software SeqStudio, byla zvolena příslušná metoda sekvenace (defaultní „Seq BDTv3“) a byla zadána identifikace vzorků. Po kontrole všech parametrů byla spuštěna sekvenace, která probíhala již automaticky. Po dokončení byla data dostupná ve formátu .ab1 pro další analýzu.

4 Výsledky

4.1 U pacientů s kongenitální hypotyreózou se nachází dosud nepopsané varianty v genech známých pro jejich roli ve vývoji a funkci štítné žlázy, přičemž tyto varianty vykazují bioinformatické znaky vysoké pravděpodobnosti patogenity (např. sestřih, posun čtecího rámce, nonsense mutace)

V této diplomové práci bylo k dispozici celkem 47 vzorků. Z těchto vzorků potenciálních pacientů s kongenitální hypotyreózou bylo objeveno 22 pozitivních nálezů geneticky kauzálních variant (v tabulce číslo 11 označeno žlutě), z nichž na základě dostupných literárních zdrojů byly 4 varianty ohodnoceny jako patogenní (P), dále 4 varianty byly ohodnoceny jako VUS a zbylých 13 variant nebylo nalezeno v literatuře (N/A). Tyto neznámé varianty se našly ve vzorcích TR4/1, TR5/1, TR12/1, TR20/1, TR21/1, TR24/1, TR27/1 (TR27/2, TR27/3, TR27/4), TR31/1 a TR36/1.

Tab. č. 11: Výsledky analýzy potenciálních kandidátních genů a jejich variant způsobující onemocnění CH. Žlutě označeny geny a jejich varianty, které jsou nejspíše kauzální. V této tabulce máme zleva doprava sloupce označující konkrétní vzorek, gen, transkript, variantu, výsledný efekt, ohodnocení patogenity dle umělé inteligence programu SeqOne, ohodnocení patogenity dle ACMG, míra patogenity a popis zda se jedná o patogenní (P), nejspíše patogenní (LP), benigní (B), nejspíše benigní (LB), varianta neznámého významu (VUS) či nemáme k dispozici literární zdroje a jiný diagnostický popis této varianty (N/A).

VZOREK	Gen	Transkript	Varianta (kauzální patogenní varianta tučně)	Efekt	DiagAI Score	ACMG SeqOne	Pathogenicity (UP) SeqOne	ClinVar
TR1/1	TG	NM_003235.5	c.848G>A p.R283Q	VUS, missense	50	2	4pt	VUS
	KMT2D	NM_003482.4	c.7117T>G p.S2373A	VUS, missense	50	2	5pt	VUS
TR2/1	PDE4D	NM_001104631.2	c.1288-8dup	LB, intron	6	1	0pt	LB
TR3/1	THRB	NM_001354712.2	c.728G>A p.R243Q	P, missense	81	4	34pt	P
TR4/1	TSHR	NM_000369.5	c.1357A>C p.M453L	VUS/P, missense	68	3	22pt	N/A
TR5/1	KDM6A	NM_001291415.2	c.3215T>G p.I1072S	VUS/P, missense	76	2	25pt	N/A
	JAG1	NM_000214.3	c.2231G>A p.R744Q	LB/B, missense	6	1	0pt	LB
TR6/1	TG	NM_003235.5	c.3647C>T p.P1216L	VUS/B, missense	7	2	0pt	VUS
	KMT2D	NM_003482.4	c.7879T>C p.Y2627H	LB/B, missense	6	2	0pt	LB/B
TR6/2	TG	NM_003235.5	c.3647C>T p.P1216L	VUS/B, missense	7	2	0pt	VUS
	PDE4D	NM_001104631.2	c.*3276G>A	B, UTR oblast	60	2	14pt	N/A
	PDE4D	NM_001104631.2	c.456-214556A>T	B intron	58	2	12pt	N/A
TR7/1	neinformační		žádná varianta související s diagnózou					
TR8/1	PAX8	NM_003466.4	c.1277-10A>G	VUS, intron	62	3	17pt	VUS
	SOX3	NM_005634.3	c.157G>C p.V53L	LB, missense	12	2	0pt	B
	FGF8	NM_033163.5	c.77C>T p.P26L	VUS, missense	8	2	0pt	VUS
	KMT2D	NM_003482.4	c.6283C>T p.R2095C	VUS, missense	7	2	0pt	VUS
TR9/1	GLIS3	NM_001042413.2	c.1872C>T p.T624=	VUS oblast splicing	7	2	0pt	VUS
	POU1F1	NM_000306.4	c.605-5T>G	VUS, intron	7	2	0pt	VUS
	DUOX2	NM_001363711.2	c.3830C>G p.A1277G	VUS/LB, missense	7	2	0pt	VUS/LB
TR10/1	SECISBP2	NM_024077.5	c.1388A>G p.Q463R	B, missense	7	2	0pt	B
	JAG1	NM_000214.3	c.2459-17A>C	B, intron	6	1	0pt	B
TR11/1	neinformační		žádná varianta související s diagnózou					
TR12/1	THRB	NM_001354712.2	c.752G>A p.G251E	VUS/P, missense	78	4	31pt	N/A
	SLC5A5	NM_000453.3	c.1594G>A p.G532S	VUS/P, missense	36	2	23pt	Unknown
TR13/1	neinformační		žádná varianta související s diagnózou					
TR14/1	DUOX2	NM_001363711.2	c.1189C>A p.Q397K	VUS, missense	8	3	0pt	VUS
	DUOX2	NM_001363711.2	c.4097C>T p.P1366L	VUS, missense			3	VUS
TR14/2 (matka)	DUOX2	NM_001363711.2	c.1189C>A p.Q397K	VUS, missense	8	3	0pt	VUS
TR14/3 (otec)	DUOX2	NM_001363711.2	c.4097C>T p.P1366L	VUS, missense	8	3	0pt	VUS
TR14/4	DUOX2	NM_001363711.2	c.1189C>A p.Q397K	VUS, missense	8	3	0pt	VUS
TR15/1	neinformační		žádná varianta související s diagnózou					
TR16/1	IYD	NM_203395.3	c.*972T>C	B, UTR oblast	60	2	13pt	N/A
	UBR1	NM_174916.3	c.529-212C>A	B, intron	57	2	11pt	N/A
TR17/1	neinformační		žádná varianta související s diagnózou					
TR18/1	neinformační		žádná varianta související s diagnózou					
TR19/1	neinformační		žádná varianta související s diagnózou					
TR20/1	TG	NM_003235.5	c.2475T>A p.Y825Ter	VUS/P, nonsense (10. exon)	81	5	34pt	P
	TG	NM_003235.5	c.6896T>G p.L2299R	VUS, missense (40. exon)	73	3	27pt	N/A
TR21/1	DUOXA2	NM_207581.4	c.341-2A>T	LP, intron	78	4	31pt	N/A
	DUOXA2	NM_207581.4	c.623dup p.A209GfsTer21	VUS, změna čtecího rámce	75	5	29pt	N/A
	GLIS3	NM_152629.4	c.689G>T p.G230V	VUS, missense	58	2	11pt	VUS
TR21/2 (otec)	DUOXA2	NM_207581.4	c.341-2A>T	LP, intron	78	4	31pt	N/A
TR21/3 (matka)	DUOXA2	NM_207581.4	c.623dup p.A209GfsTer21	VUS, změna čtecího rámce	75	5	29pt	N/A
TR22/1	neinformační		žádná varianta související s diagnózou					
TR23/1	JAG1	NM_000214.3	c.2459-17A>C	VUS/B, intron				
TR24/1	TG	NM_003235.5	c.886C>T p.R296Ter	P, nonsense	80	5	34pt	P
	TG	NM_003235.5	c.6199+4del	VUS, intron	66	3	20pt	N/A
TR25/1	SECISBP2	NM_001282689.2	c.1A>G p.M1?	VUS, missense (start lost)	25	3	12pt	N/A
TR26/1	neinformační		žádná varianta související s diagnózou					
TR27/1	TSHR	NM_000369.5	c.1295A>G p.N432S (homozygot)	VUS, missense	77	3	30pt	N/A
	KDM6A	NM_021140.4	c.2703-17_2703-16delinsC	VUS, intron	67	2	15pt	N/A
	IGSF1	NM_001555.5	c.2132G>C p.G711A	VUS, missense	12	1	0pt	B
	POU1F1	NM_000306.4	c.224C>A p.T75N	LB/VUS missense	7	2	0pt	LB
	IRS4	NM_003604.2	c.3472G>A p.A1158T	B/VUS missense	7	1	0pt	B
TR27/2	TSHR	NM_000369.5	c.1295A>G p.N432S (heterozygot)	VUS, missense	77	3	30pt	N/A
TR27/3	TSHR	NM_000369.5	c.1295A>G p.N432S (heterozygot)	VUS, missense	77	3	30pt	N/A
TR27/4	TSHR	NM_000369.5	c.1295A>G p.N432S (heterozygot)	VUS, missense	77	3	30pt	N/A
TR28/1	DUOX2	NM_014080.5	c.602dup p.Q202TfsTer99	P, změna čtecího rámce	81	5	34pt	P
	SECISBP2	NM_024077.5	c.558G>C p.E186D	VUS missense	30	2	16pt	N/A
TR29/1	DUOX2	NM_014080.5	c.1516G>A p.D506N	VUS missense	73	2	27pt	VUS
	GLIS3	NM_152629.4	c.1053C>G p.D351E	VUS missense	63	2	16pt	N/A
	TG	NM_003235.5	c.1053C>G p.D351E	VUS missense	22	2	9pt	VUS
	GNAS	NM_001077490.3	c.1053C>G p.D351E	LB missense	6	2	0pt	LB
TR30/1	neinformační		žádná varianta související s diagnózou					
TR31/1	POU1F1	NM_000306.4	c.-3G>CS 5-UTR	VUS missense	60	2	13pt	N/A
TR32/1	neinformační		žádná varianta související s diagnózou					
TR33/1	LHX3	NM_001363746.1	c.5C>T p.T2M	VUS missense	21	2	8pt	N/A
TR34/1	ALB	NM_000477.7	c.725G>A p.R242H	VUS missense	61	2	15pt	N/A
TR35/1	neinformační		žádná varianta související s diagnózou					
TR36/1	TPO	NM_000547.6	c.478A>G p.N160D	VUS missense	76	3	30pt	VUS
	TPO	NM_000547.6	c.1334A>G p.H445R	VUS missense	73	3	26pt	N/A
	GNAS	NM_080425.4	c.1798C>G p.R600G	B/LB missense	6	1	0pt	B/LB
TR37/1	neinformační		žádná varianta související s diagnózou					
TR38/1	neinformační		žádná varianta související s diagnózou					

4.1.1 *Pacient TR4/1*

Lékařské klinické údaje: Dívka s polynodosní strumou s hypotyreózou (18,5pmol/l fT4; 0,259mIU/l TSH; 4,88pmol/l fT3; 4,29 IU/ml anti-TPO; 2,05 IU/ml anti-Tgl, 0,3 IU/ml anti- TSHR). Po vysazení thyrozolu fT3 - 5,8, fT4 - 20,6, TSH - 0,077, difúzně zvýšená akumulace radiofarmaka ve štítné žlázy. Matka, sestra matky - hypofunkce štítné žlázy.

Ve vzorku byla identifikována nová varianta genu *TSHR* spočívající ve záměně nukleotidu adeninu (A) za nukleotid cytosin (C) na pozici 1357 v cDNA (NM_000369.5) sekvenci genu na chromozomu 14q31.1 vedoucí k missense mutaci, při níž došlo ke změně aminokyseliny methioninu (M) za leucin (L) na pozici 453 v kódujícím řetězci proteinu (p.M453L).

4.1.2 *Pacient TR5/1*

Lékařské klinické údaje: Chlapec s rezistencí na tyreoidální hormony. Další klinické údaje lékař neuvedl.

V tomto vzorku byla identifikovaná nová varianta genu *KDM6A*. Došlo zde k záměně nukleotidu thyminu (T) za nukleotid guanin (G) na pozici 3215 v cDNA (NM_001291415.2) sekvenci na chromozomu Xp11.3 vedoucí k missense mutaci, při níž došlo ke změně aminokyseliny isoleucinu (I) za serin (S) na pozici 1072 v kódujícím řetězci proteinu (p.I1072S).

4.1.3 *Pacient TR12/1*

Lékařské klinické údaje: Dívka s rezistencí na tyreoidální hormony. Lékař další klinické údaje neuvedl.

Ve vzorku TR12/1 byla nalezena nová varianta genu *THRB*. Došlo zde k záměně nukleotidu guaninu (G) za nukleotid adenin (A) na pozici 752 v cDNA (NM_001354712.2) sekvenci na chromozomu 3p24.3. Jedná se o missense mutaci, při níž došlo ke změně aminokyseliny glycinu (G) za kyselinu glutamátovou (E) na pozici 251 v kódujícím řetězci proteinu (p.G251E).

4.1.4 *Pacient TR20/1*

Lékařské klinické údaje: Chlapec s neonatální strumou (UZ (ultrazvuk) ŠŽ (štítná žláza) - 7,9 ml struma) s hypotyreózou (17,2 mIU/l TSH při NS; 11,2 pmol/l fT4; 33,462 mIU/l TSH; <28 IU/ml anti-TPO; 1,3 IU/ml anti-Tgl). Dále se našly vysoké hodnoty jodu 1360 µg/l (norma je 1000 µg/l), uzávěr velké fontanely ve 4 měsících. Léčba levotyroxinem 10 µg/kg/den. V rodinné anamnéze na nacházel případ karcinomu štítné žlázy.

Ve vzorku byla nalezena nová varianta genu *TG*, která spočívá v záměně nukleotidu tyminu (T) za nukleotid guanin (G) na pozici 6896 v cDNA (NM_003235.5) sekvenci na chromozomu 8q24.22. Jedná se o missense mutaci, při níž došlo ke změně aminokyseliny leucinu (L) za aminokyselinu arginin (R) na pozici 2299 v kódujícím řetězci proteinu (p.L2299R).

4.1.5 *Pacient TR24/1*

Lékařské klinické údaje: Dívka s neonatální strumou (UZ ŠŽ - 1,55 ml struma) s hypotyreózou (5,05 pmol/l fT4; >100 mIU/l TSH; 2,87 pmol/l fT3; 33 IU/ml anti-TPO; <15 IU/ml anti-Tgl; <0,30 IU/ml anti-TSHR; <0,20 µg/l TG). Léčba levotyroxinem 13,4 µg/kg/den. Matka - hypotyreóza při autoimunitní tyreoditidě na terapii.

V tomto vzorku byla identifikovaná nová varianta genu *TG*. Došlo zde k deleci na pozici 6199+4del v cDNA (NM_003235.5) na rozhraní 34. exonu a intronu na chromozomu 8q24.3. Efekt této delece je zatím neznámý nicméně nachází se v sestřihovém místě (Splice donor region) a může mít schopnost ovlivnit sestřih (splicing) mRNA, což může vyústit v tvorbu nesprávného produktu genu *TG*.

4.1.6 *Pacient TR27/1*

Lékařské klinické údaje: Dívka s hypotyreózou (23 mIU/l TSH při NS; 16,81 pmol/l fT4; 84,14 mIU/l TSH; 5,17 pmol/l fT3; <28 IU/ml anti-TPO; <15 IU/ml anti-Tgl; <0,30 IU/ml anti-TSHR; 67,19 µg/l TG). UZ ŠŽ - obvyklá lokalizace, homogenní, 0,67 ml. Léčba levotyroxinem 15 µg/kg/den. Otec – léčba na hypofunkci.

Ve vzorku TR27/1 byla nalezena nová varianta genu *TSHR*. Jedná se zde o záměnu nukleotidu adeninu (A) za guanin na pozici 1295 v cDNA (NM_000369.5) sekvenci na chromozomu 14q31.1. Jedná se o missense mutaci, při níž došlo ke změně aminokyseliny asparaginu (N) za serin (S) na pozici 432 v kódujícím řetězci proteinu (p.N432S). U tohoto pacienta bylo dále zjištěno, že se jedná o homozygota. Pacient má také sourozence TR27/4, u kterého byla nalezena naprosto stejná varianta, ve které je také homozygotem a je tedy také postižen hypotyreózou. Oba rodiče TR27/2 a TR27/3 mají stejnou variantu genu *TSHR*, ale pouze v heterozygotním stavu a nejsou postiženi s hypotyreózou jako jejich děti. Jedná se tedy o variantu, která je děděna autosomálně recesivně.

Svým genetickým původem je tento pacient z Vietnamu, kde je možné, že by se mohlo jednat v jeho rodině o inbreeding.

4.1.7 *Pacient TR 31/1*

Lékařské klinické údaje: Dívka s centrální hypotyreózou jako součást kombinovaného pituitárního deficitu (10,8 a 10,5 pmol/l fT₄; 5,1 a 3,8 mIU/l TSH; 6,5 pmol/l fT₃; norma anti-TPO; norma anti-TgI), další deficity: růstový hormon. Magnetická rezonance (MR) centrální nervové soustavy (CNS) – normální, žádné nálezy. Léčba levotyroxinem 1 µg/kg/den. Jiná postižení - obezita, zpomalení růstu až zástava mezi 3.-5. rokem. Léčba růstovým hormonem.

Ve vzorku TR31/1 byla nalezena nová varianta genu *POU1F1*. Došlo zde k záměně nukleotidu guaninu (G) za nukleotid cytosin (C) v 5-UTR oblasti cDNA (NM_000306.4) sekvenci na chromozomu 3p12.1. Jedná se o missense mutaci, kdy nevzniká produkt tohoto genu.

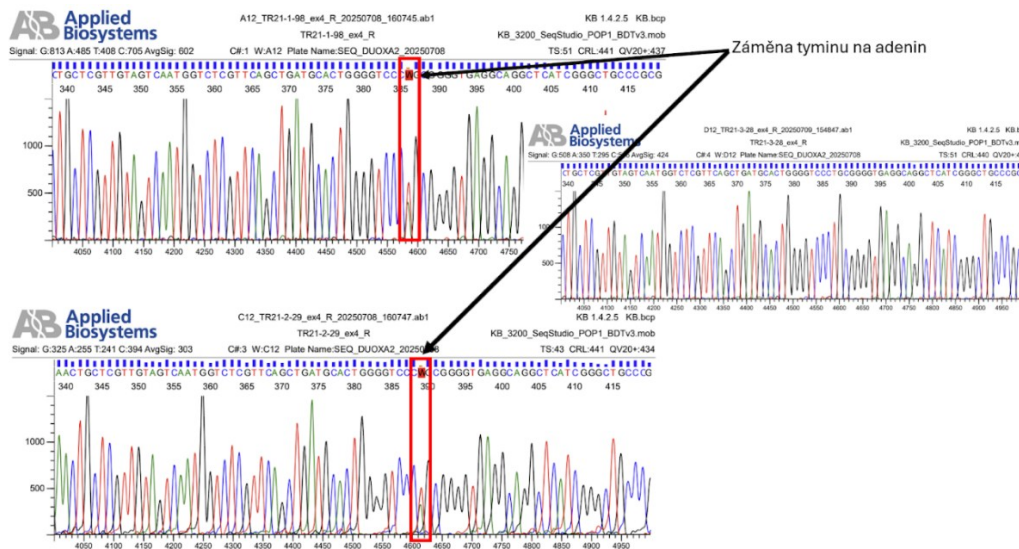
4.1.8 *Pacient TR36/1*

Lékařské klinické údaje: Chlapec s neonatální strumou (UZ ŠZ homogenní struma) s hypotyreózou (>150 mIU/l TSH při NS; 2,16 pmol/l fT₄; >150 mIU/l TSH; 2,67 pmol/l fT₃; >1300 IU/ml anti-TPO; <1,38 IU/ml anti-TgI; 1,31 IU/ml anti-TSHR; >500 µg/l TG). Léčba levotyroxinem 50 µg/kg/den. Matka - autoimunitní tyreoditida na terapii, matka matky - stp tyreodektomie.

Ve vzorku TR36/1 byla nalezena nová varianta genu *TPO*. Došlo zde k záměně nukleotidu argininu (A) za nukleotid guanin (G) na pozici 1334 v cDNA (NM_000547.6) sekvenci na chromozomu 2p25.3. Jedná se o missense mutaci, při níž došlo ke změně aminokyseliny histidinu (H) za aminokyselinu arginin (R) na pozici 445 v kódujícím řetězci proteinu (p.H445R).

4.2 Nález bialelických mutací souvisejících s vývojem a funkcí štítné žlázy, které vedou k rozvoji kongenitální hypotyreózy

U pacienta TR21/1 byly nalezeny dvě nové varianty genu *DUOXA2*. První variantou je záměna nukleotidu adeninu (A) za nukleotid thymin (T) na pozici 341-2 v cDNA (NM_207581.4) sekvenci na chromozomu 15q21.1. Tato mutace způsobuje sestřih (splicing) a nachází se ve 4. exonu. Druhá varianta v tomto genu je duplikace na pozici 623, což má za následek posun čtecího rámce a následné předčasné vytvoření terminačního kodónu. Tato mutace se nachází v 5. exonu. U pacienta bylo podezření, že by se mohlo jednat o složeného heterozygota a bylo tedy vyšetřeno celé tzv. trio vzorků neboli oba rodiče a pacient. Následně bylo provedeno Sangerovo sekvenování (obrázek číslo 5 a 6), které nám tuto naši domněnku potvrdilo a skutečně se jedná o složenou heterozygotnost.



Obr. č. 5: Na tomto snímku ze Sangerova sekvenování lze vidět, že pacient TR21/1 zdědil ve 4. exonu od otce záměnu nukleotidu adeninu (A) za nukleotid thymin (T) na pozici 341-2 v cDNA sekvenci na chromozomu 15q21.1 v genu *DUOXA2* (místo záměny označeno šipkami a červeným obdélníkem), tuto mutaci však nezdedil od matky TR21/3. Tato mutace způsobuje splicing a tvorbu nefunkčního produktu genu *DUOXA2*.



Obr. č. 6: Na tomto snímku ze Sangerova sekvenování lze vidět, že matka pacienta TR21/3 je pozitivní na posun čtecího rámce a vytvoření tak předčasného terminačního kodónu UAG (označeno červeným kruhem) na 5. exonu na chromozomu 15q21.1, otec TR21/2 nikoli. U pacienta TR21/1 navíc byla prokázána duplikace tyminu na pozici 623.

Lékařské klinické údaje TR21/1: Dívka s neonatální strumou (UZ ŠŽ - obvyklá lokalizace, hypoechogenní, struma, PL 1,5 ml, LL 1,2 ml = 2,7 ml) s hypotyreózou (20,3 mIU/l TSH při NS; 6,5 pmol/l fT₄; >100 mIU/l TSH; 4,16 pmol/l fT₃; <28 IU/ml anti-TPO; 19 IU/ml anti-TgI; 0,32 IU/ml anti-TSHR; >500 µg/l TG). Léčba levotyroxinem 15 µg/kg/den. Jiná postižení - zrakové postižení -3/4D na obou očích od 9 let, pectus excavatum. Synovec matky - od 1 roku léčen euthyroxem.

Ve vzorkách pacientů byly další nálezy potenciálních kandidátů na bíaleické mutace neboli složené heterozygoty, ale bohužel se nepodařilo u většiny z nich vyšetřit celé trio

pro 100% potvrzení našeho podezření. Jedná se o vzorky TR14/1, TR20/1 a TR24/1. Nejčastějším důvodem jsou rozvedení rodiče nebo neochota na vyšetření spolupracovat.

Lékařské klinické údaje TR14/1: Chlapec s postnatální neautoimunitní hypotyreózou nebo subklinickou hypotyreózou (susp. rezistence na TSH) (13,26 pmol/l fT4; 8,993 mIU/l TSH; norma anti-TPO; norma anti-TgI). Jiná postižení - růst pod rodičovskou predikcí konstantní, skolióza. Matka - levotyroxin od 16 let, DUOX2 gln396Lys, z její strany všichni po 50. roce (matka, sestra, babička), otec - bez thyropatie v rodině, ale nevyšetřovaný, DUOX2 Pro1366Leu.

Ve vzorku TR14/1 byly nalezeny dvě varianty genu *DUOX2*. První variantou je záměna nukleotidu cytosinu (C) za nukleotid adenin (A) na pozici 1189 v cDNA (NM_001363711.2) sekvenci na chromozomu 16q vedoucí k missense mutaci a tedy záměně aminokyseliny glutaminu (Q) za aminokyselinu lysin (K) na pozici 397 v kódujícím řetězci proteinu (p.Q397K). Tato varianta byla zděděna od matky TR14/2. Druhá varianta je záměna nukleotidu cytosinu (C) za nukleotid thymin (T) na pozici 4097 v sekvenci cDNA na chromozomu 16q rovněž vedoucí k missense mutaci, konkrétně záměnu aminokyseliny prolinu (P) za aminokyselinu leucin (L) na pozici 1366 v kódujícím řetězci proteinu (p.P1366L). Tato varianta byla zděděna od otce TR14/3. Dále byl vyšetřen i sourozenec pacienta TR14/4, kde byla nalezena pouze varianta od matky, a tedy druhý potomek nebyl postižen. Vzorky TR14/1, TR14/2 a TR14/3 byly sekvenovány exomem Illuminou a zanalyzováni skrze bioinformatický software Emedgene. Vzorek TR14/4 byl sekvenován jako ostatní vzorky v této práci exomem Agilent a analyzován bioinformatickým softwarem SeqOne.

U vzorku TR20/1 byly objeveny dvě varianty genu *TG*. První varianta je záměna nukleotidu thyminu (T) za nukleotid adenin (A) na pozici 2475 v cDNA (NM_003235.5) sekvenci chromozomu 8q24.22, jedná se o 10. exon. Tato varianta je nonsense mutací, kdy na pozici 825 vznikl terminační kodón v kódujícím řetězci proteinu. Druhá varianta je záměna nukleotidu thyminu (T) za nukleotid guanin (G) na pozici 6896 v sekvenci cDNA, která vede k missense mutaci ve 40. exonu, kdy došlo k záměně aminokyseliny leucinu (L)

za aminokyselinu arginin (R) na pozici 2299 v kódujícím řetězci proteinu (p.L2299R). Na vyšetření se dostavila pouze matka, u které se potvrdil nálezn varianty v 10. exonu. Otec se bohužel nedostavil. Proto nemůžeme najisto potvrdit, že pacient TR20/1 je složený heterozygot.

Ve vzorku TR24/1 byl nálezn dvou variant genu *TG*. První variantou je záměna nukleotidu cytosinu (C) za nukleotid tymin (T) na pozici 886 v sekvenci cDNA (NM_003235.5) na chromozomu 8q24.22. Tato varianta je nonsense mutací, kdy vznikl terminační kodón v kódujícím řetězci proteinu na pozici 296. Druhá varianta byla již popsána v této práci výše (viz kapitola 4.1). Rodiče se u tohoto pacienta nedostavili na vyšetření.

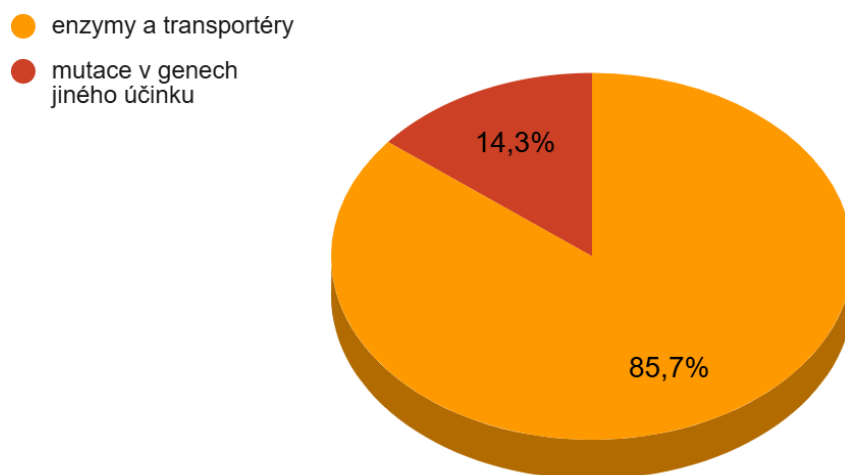
4.3 Některé genetické příčiny kongenitální hypotyreózy považovaného primárně za recesivní mohou být způsobeny i autozomálně dominantními mutacemi s nižší penetrancí (mírnější formou CH)

Vzorek TR28/1 vykazuje dominantní mutaci v genu *DUOX2* s variabilní expresivitou. Jedná se o duplikaci na pozici 602 v cDNA sekvenci na chromozomu 15q21.1. Tato duplikace způsobila frameshift, který vyústil v předčasný terminační kodón na pozici 202 v kódujícím řetězci proteinu. Obecně u variant v genu *DUOX2* je v literatuře uváděna recesivní dědičnost (Sugisawa *et al.* 2025, Tanaka *et al.* 2020), ale v tomto případě silný efekt jedné nefunkční alely vykazuje znaky dominance s neúplnou penetrancí.

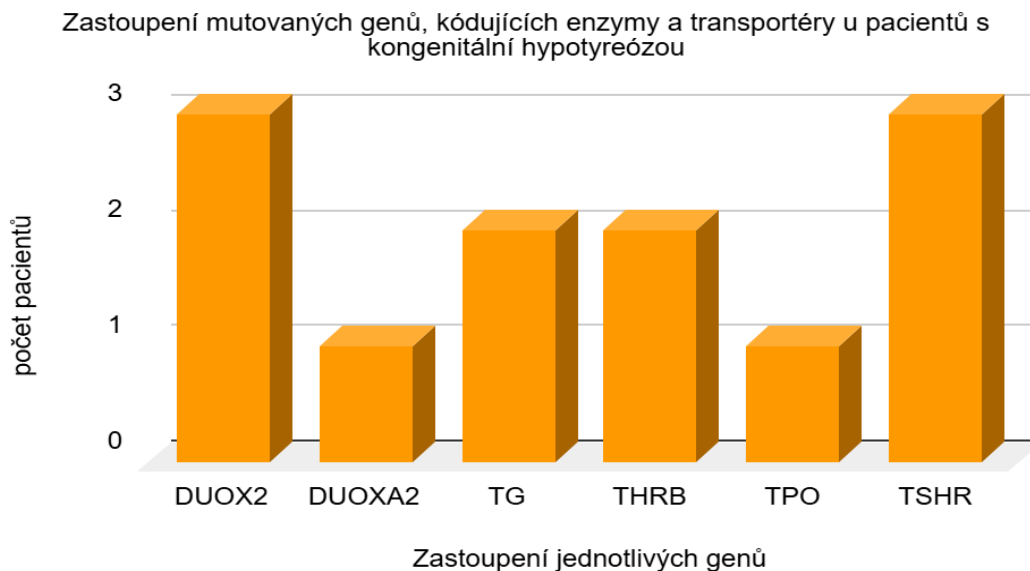
Lékařské klinické údaje TR28/1: Dívka s centrální hypotyreózou jako součást kombinovaného pituitárního deficitu (9,23 pmol/l fT4; 4,5 mIU/l TSH; norma anti-TPO; norma anti-Tgl; norma anti-TSHR), další deficity: růstový hormon, ACTH, gonadotropiny. UZ ŠŽ - normální, MR CNS - hypoplastická hypofýza. Léčba levotyroxinem 1,3 µg/kg/den. Jiná postižení - hypogonadismus. Jiná léčba - hydrokortizon, růstový hormon, estrogeny, gestageny. Matka - lymfocytární tyreoiditida.

4.4 U pacientů s dyshormonogenezí převažuje výskyt patogenních variant v genech kódujících enzymy podílející se na hormonální syntéze (např. *DUOX2*, *TPO*), přičemž většina těchto variant způsobuje narušení katalyticky aktivních domén

Ze všech vzorků pacientů s kongenitální hypotyreózou (tabulka číslo 11) byl největší procentuální podíl mutací genů, které kódují enzymy či významné transportéry ovlivňující syntézu a sekreci hormonů štítné žlázy a zasahující do katalyticky aktivních domén těchto genů. Konkrétně 85,7 % z našeho souboru dat jsou právě tyto geny (graf číslo 1). Nejvíce zastoupeny z našeho souboru pacientů s kauzálními variantami byly mutované geny *DUOX2* a *TSHR* (graf číslo 2), oba tyto geny byly nalezeny u celkem tří ze dvanácti potvrzených postižených jedinců s kauzálními variantami. Mutovaný *DUOX2* byl nalezen u vzorků TR14/1, TR28/1 a TR29/1 a mutovaný *TSHR* gen byl nalezen u vzorků TR4/1, TR24/1 a TR24/4.



Graf č. 1: Tento graf znázorňuje procentuální podíl výskytu genetických mutací mající vliv na enzymy a transportéry, které jsou důležité pro syntézu a produkci hormonů štítné žlázy. Jedná se tedy o podíl 86:14 pro výskyt těchto genů v našem souboru pacientů.



Graf č. 2: Na tomto grafu máme vyjádřeno jednotlivé zastoupení mutovaných genů u pacientů s kongenitální hypotyreózou kódující enzymy a transportéry důležité pro syntézu a produkci hormonů štítné žlázy. Nejvíce zastoupeny geny z této kategorie jsou *DUOX2* a *TSHR*.

Lékařské klinické údaje k TR29/1 (klinické údaje k pacientům TR4/1, TR14/1, TR24/1 a TR28/1 uvedeny výše): Dívka s dysgenezí štítné žlázy (nízké mIU/l TSH při NS; 3,33 pmol/l fT4; >150 mIU/l TSH; 2,89 pmol/l fT3; norma anti-TPO; norma anti-TgI; norma anti-TSHR; 0,12 µg/l TG). UZ ŠŽ - rudiment 0,07 ml. Léčba levotyroxinem 14 µg/kg/den. Matka - subklinická hypotyreóza, babička matky - struma.

4.5 Pacient TR34/1 s familiární dysalbuminemickou hypertyroxinémií

Lékařské klinické údaje: Chlapec s familiární dysalbuminemickou hypertyroxinémií (zvýšené hodnoty fT4, zvýšené hodnoty TSH; zvýšené hodnoty fT3).

Ve vzorku TR34/1 byla nalezena varianta genu *ALB*. Došlo zde k záměně nukleotidu guaninu (G) za nukleotid adeninu (A) na pozici 725 v cDNA (NM_000477.7) sekvenci na chromozomu 4p13.3. Jedná se o missense mutaci, při níž došlo ke změně aminokyseliny argininu (R) za aminokyselinu histidin (H) na pozici 242 v kódujícím řetězci proteinu (p.R242H). Tato záměna má za následek rozvoj onemocnění familiární dysalbuminemická hypertyroxinémie.

4.6 Do interpretace výsledků bioinformatických analýz se aktuálně zapojuje strojové učení (umělá inteligence, artificial intelligence, AI). Začíná poskytovat lepší výsledky než standardní interpretační postupy.

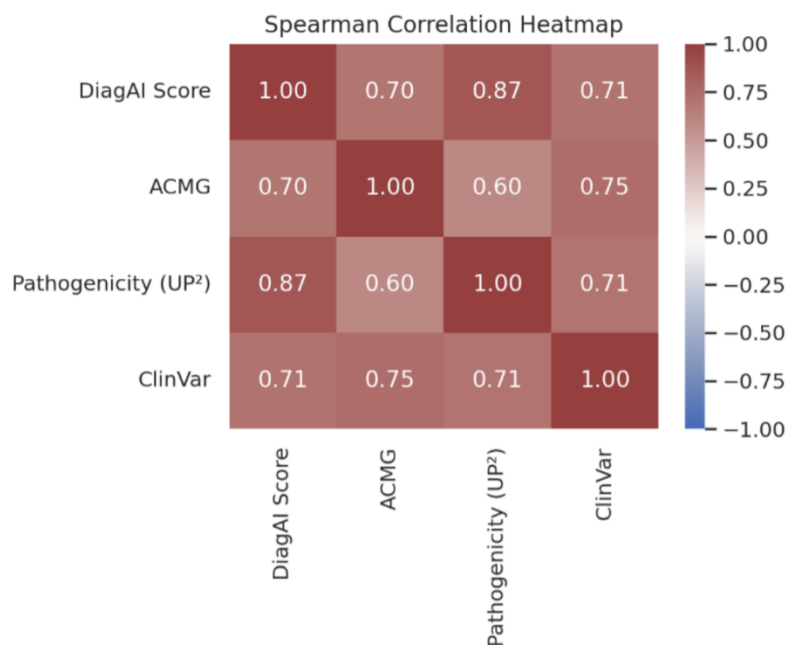
Pro zjištění závislosti (korelace) dvou výstupů strojového učení (AI) v programu SeqOne – tzv. DiagAI skóre a skóre Patogenicity (UP²) s klasickým způsobem klasifikace variant dle ACMG byly použity robustní Spearmanovy korelace (Tabulka číslo 12) z důvodu, že obě skóre jsou kontinuální proměnné a klasifikace dle ACMG a s ní související označení patogenicity variant v databázi ClinVar jsou v ordinální škále od 1 do 5 (benigní, pravděpodobně benigní, varianta nejasného významu, pravděpodobně patogenní a patogenní varianta). Výsledky korelační analýzy jsou shrnuty na následující heatmapě (graf číslo 3). Nejvyšší korelace byla zaznamenána mezi DiagAI Score a Patogenicita (UP²) ($\rho = 0,87$), což ukazuje na vysokou vnitřní konzistenci výstupů algoritmu DiagAI. Silná korelace byla pozorována také mezi ACMG a ClinVar ($\rho = 0,75$).

Tab. č. 12: Spearmanovy korelace. Analyzováno zjištěných 33 variant, ke kterým byly dostupné všechny údaje včetně začlenění varianty dle databáze ClinVar. Všechny korelace jsou monotónně pozitivní, a i po přísné Bonferroniho korekci pro 6 testů, $\alpha = 0,05/6 \approx 0,0083$ jsou signifikantní, jelikož všechny p hodnoty (tabulka číslo 13) jsou $\ll 0,001$.

	DiagAI skóre	0	Patogenicita (UP ²)	ClinVar
DiagAI skóre	1,0	0,69575	0,87199	0,71219
ACMG	0,69875	1,0	0,59986	0,74759
Patogenicita (UP ²)	0,87199	0,59986	1,0	0,70925
ClinVar	0,71219	0,74759	0,70925	1,0

Tab. č. 13: V této tabulce jsou p hodnoty pro jednotlivé korelace.

	DiagAI skóre	ACMG	Patogenicita (UP ²)	ClinVar
DiagAI skóre	0,0	6,10762E-06	3,90095E-11	3,34461E-06
ACMG	6,10762E-06	0,0	0,00023	5,74784E-07
Patogenicita (UP ²)	3,90095E-11	0,00023	0,0	3,82482E-06
ClinVar	3,34461E-06	5,74784E-07	3,82482E-06	0,0



Graf č. 3: Grafické zobrazení zjištěných pozitivních spearmanových korelací (Heatmap)

Také byla provedena přímá kvantitativní komparace hodnocení genetických variant získaných prostřednictvím bioinformatického programu SeqOne s vlastním hodnocením na základě odborných databází a literárních zdrojů (např. ClinVar, gnomAD). Program SeqOne poskytuje dvě základní hodnoty: DiagAI skóre v rozsahu 0–100, kde vyšší hodnota značí vyšší pravděpodobnost patogenicity a ACMG SeqOne klasifikaci v pětistupňové škále (1 = benigní, 5 = patogenní). Nejvyšší DiagAI skóre pozorované v souboru dosáhlo hodnoty 81. Pro účely porovnání byly hodnoty sjednoceny na numerickou škálu. DiagAI skóre bylo převedeno na hodnoty v rozsahu 0–1 dělením číslem 100. ACMG SeqOne skóre a verbální hodnocení z klasického přístupu byly převedeny následovně: benigní (B) = 0, pravděpodobně benigní (LB) = 0,25, varianta nejasného významu (VUS) = 0,5, pravděpodobně patogenní (LP) = 0,75 a patogenní (P) = 1. Následně byl ze SeqOne hodnocení (DiagAI + ACMG SeqOne) vypočítán průměr a porovnán s ručně převedeným hodnocením. Procentuální shoda byla vypočtena podle vzorce:

$$\text{Shoda (\%)} = (1 - |\text{průměr (AI + ACMG)} - \text{klasické hodnocení}|) \times 100$$

Výsledná průměrná shoda mezi hodnocením variant programem SeqOne a klasickým přístupem činila 86 %. 47 variant z celkových 74 variant v našem souboru dat mělo procentuální shodu $\geq 80\%$.

Tab. č. 14: V této tabulce lze vidět procentuální shodu v hodnocení pomocí AI (DiagAI Score a ACMG SeqOne) a klasickým přístupem (sloupce ClinVar, efekt) u jednotlivých variant (modře označený sloupec hodnot). Červeně označená buňka v tabulce obsahuje výslednou průměrnou shodu mezi hodnocením variant programem SeqOne a klasickým přístupem.

	Efekt	DiagAI Score SeqOne	ACMG SeqOne	Pathogenicity (UP) SeqOne	ClinVar	přepočít efekt	AI	ACMG	průměr	procentuální shoda
TR1/1	VUS, missense	50	2	4pt	VUS	0,5	0,5	0,25	0,375	87,5
	VUS, missense	50	2	5pt	VUS	0,5	0,5	0,25	0,375	87,5
TR2/1	LB, intron	6	1	0pt	LB	0,25	0,06	0	0,03	78
TR3/1	P, missense	81	4	34pt	P	1	0,81	0,75	0,78	97
TR4/1	VUS/P, missens	68	3	22pt	N/A	0,5	0,68	0,5	0,59	91
TR5/1	VUS/P, missens	76	2	25pt	N/A	0,5	0,76	0,25	0,505	74,5
	LB/B, missense	6	1	0pt	LB	0,25	0,06	0	0,03	78
TR6/1	VUS/B, missens	7	2	0pt	VUS	0,5	0,07	0,25	0,16	91
	LB/B, missense	6	2	0pt	LB/B	0,25	0,06	0,25	0,155	90,5
TR6/2	VUS/B, missens	7	2	0pt	VUS	0,5	0,07	0,25	0,16	91
	B, UTR oblast	60	2	14pt	N/A	0	0,6	0,25	0,425	57,5
	B intron	58	2	12pt	N/A	0	0,58	0,25	0,415	83,5
TR8/1	VUS, intron	62	3	17pt	VUS	0,5	0,62	0,5	0,56	94
	LB, missense	12	2	0pt	B	0	0,12	0,25	0,185	81,5
	VUS, missense	8	2	0pt	VUS	0,5	0,08	0,25	0,165	91,5
	VUS, missense	7	2	0pt	VUS	0,5	0,07	0,25	0,16	66
TR9/1	VUS oblast splic	7	2	0pt	VUS	0,5	0,07	0,25	0,16	91
	VUS, intron	7	2	0pt	VUS	0,5	0,07	0,25	0,16	66
	VUS/LB, missen	7	2	0pt	VUS/LB	0,25	0,07	0,25	0,16	91
TR10/1	B, missense	7	2	0pt	B	0	0,07	0,25	0,16	84
	B, intron	6	1	0pt	B	0	0,06	0	0,03	97
TR12/1	VUS/P, missens	78	4	31pt	N/A	0,5	0,78	0,75	0,765	98,5
	VUS/P, missens	36	2	23pt	Unknown	0,5	0,36	0,25	0,305	80,5
TR14/1	VUS, missense	8	3	0pt	VUS	0,5	0,08	0,5	0,29	79
	VUS, missense		3		VUS	0,5		0,5	0,5	100
TR14/2 (matka)	VUS, missense	8	3	0pt	VUS	0,5	0,08	0,5	0,29	79
TR14/3 (otec)	VUS, missense		3		VUS	0,5		0,5	0,5	100
TR14/4	VUS, missense	8	3	0pt	VUS	0,5	0,08	0,5	0,29	79
TR16/1	B, UTR oblast	60	2	13pt	N/A	0	0,6	0,25	0,425	57,5
	B, intron	57	2	11pt	N/A	0	0,57	0,25	0,41	84
TR20/1	VUS/P, nonsens	81	5	34pt	P	1	0,81	1	0,905	90,5
	VUS, missense	73	3	27pt	N/A	0,5	0,73	0,5	0,615	88,5
TR21/1	LP, intron	78	4	31pt	N/A	0,75	0,78	0,75	0,765	98,5
	VUS, změna čte	75	5	29pt	N/A	0,5	0,75	1	0,875	62,5
	VUS, missense	58	2	11pt	VUS	0,5	0,58	0,25	0,415	83,5
TR21/2 (otec)	LP, intron	78	4	31pt	N/A	0,75	0,78	0,75	0,765	98,5
TR21/3 (matka)	VUS, změna čte	75	5	29pt	N/A	0,5	0,75	1	0,875	87,5
TR24/1	P, nonsense	80	5	34pt	P	0,5	0,8	1	0,9	60
	VUS, intron	66	3	20pt	N/A	0,5	0,66	0,5	0,58	92
TR25/1	VUS, missense	25	3	12pt	N/A	0,5	0,25	0,5	0,375	87,5
TR27/1	VUS, missense	77	3	30pt	N/A	0,5	0,77	0,5	0,635	86,5
	VUS, intron	67	2	15pt	N/A	0,5	0,67	0,67	0,67	100
	VUS B missense	12	1	0pt	B	0	0,12	0	0,06	94
	LB/VUS missens	7	2	0pt	LB	0,25	0,07	0,25	0,16	91
	B/VUS missense	7	1	0pt	B	0	0,07	0	0,035	96,5
TR27/2	VUS, missense	77	3	30pt	N/A	0,5	0,77	0,5	0,635	86,5
TR27/3	VUS, missense	77	3	30pt	N/A	0,5	0,77	0,5	0,635	86,5
TR27/4	VUS, missense	77	3	30pt	N/A	0,5	0,77	0,5	0,635	86,5
TR28/1	P, změna čtecíh	81	5	34pt	P	1	0,81	1	0,905	90,5
	VUS missense	30	2	16pt	N/A	0,5	0,3	0,25	0,275	97,5
TR29/1	VUS missense	73	2	27pt	VUS	0,5	0,73	0,25	0,49	99
	VUS missense	63	2	16pt	N/A	0,5	0,63	0,25	0,44	81
	VUS missense	22	2	9pt	VUS	0,5	0,22	0,25	0,235	73,5
	LB missense	6	2	0pt	LB	0,25	0,06	0,25	0,155	90,5
TR31/1	VUS missense	60	2	13pt	N/A	0,5	0,6	0,25	0,425	82,5
TR33/1	VUS missense	21	2	8pt	N/A	0,5	0,21	0,25	0,23	98
TR34/1	VUS missense	61	2	15pt	P	1	0,61	0,25	0,43	82
TR36/1	VUS missense	76	3	30pt	VUS	0,5	0,76	0,5	0,63	87
	VUS missense	73	3	26pt	N/A	0,5	0,73	0,5	0,615	88,5
	B/LB missense	6	1	0pt	B/LB	0	0,06	0	0,03	97
									průměrná shoda	86,4666667

5 Diskuze

Cílem této diplomové práce byla analýza genetických variant u dětských pacientů s diagnózou kongenitální hypotyreózy (CH) a objasnění genetických faktorů, které se mohou na rozvoji tohoto onemocnění podílet. K vyhodnocení genetických dat byl použit bioinformatický nástroj SeqOne, jenž umožňuje identifikaci známých i dosud nepopsaných variant v genech relevantních pro vývoj a funkci štítné žlázy.

Na základě současných poznatků a předchozí literatury byly stanoveny čtyři výzkumné hypotézy. První předpokládala, že u pacientů s CH mohou být přítomny dosud neznámé (nové) patogenní varianty v genech, které hrají klíčovou roli ve vývoji štítné žlázy, jako například *TSHR*, *TG*, *PAX8*, *DUOX2*, *DUOXA2* nebo *NKX2-1*. Druhá hypotéza pracovala s předpokladem, že u některých genů s typicky recesivní dědičností se mohou varianty se silným efektem projevit dominantně s neúplnou penetrancí, což by mohlo vést ke klinicky mírnějším formám CH v rámci jedné rodiny. Třetí hypotéza vycházela z očekávání, že pacienti s CH častěji nesou mutace v enzymech nebo transportních proteinech (např. *TPO*, *DUOX2*), které se přímo podílejí na syntéze a sekreci hormonů štítné žlázy. Čtvrtá hypotéza pracovala se současným trendem v bioinformatice a předpokládala, že do interpretace výsledků genetických analýz stále více zapojené strojové učení (AI) může poskytnout přesnější interpretace genetických variant než klasické interpretační postupy.

Analýza celkem 47 vzorků od pacientů s CH umožnila ověřit trendy v těchto hypotézách a v několika případech také rozšířit poznatky o dosud nepopsané genetické varianty, které by mohly být potenciálně kauzální pro vznik onemocnění. Pro úplné potvrzení těchto závěrů by však bylo zapotřebí analyzovat větší soubor patientských dat, ideálně v rámci populačních studií. Tato práce byla do určité míry limitována velikostí dostupného souboru a časovým horizontem diplomové práce. Spolupráce s jednotlivými rodinami na konfirmačních vyšetřeních a sledování segregace varianty v rámci rodiny je velmi zdlouhavá a i přes úspěšnou spolupráci s klinickým genetikem se u řady vyšetřených vzorků doposud nepodařila realizovat. Dalším významným limitem této studie je použití exomového sekvenování, které se zaměřuje výhradně na kódující oblasti genomu. Přestože je tento přístup efektivní pro detekci většiny

patogenních variant v exonech, nelze jím zachytit změny v nekódujících oblastech, regulačních sekvencích nebo hlubokých intronech. Je proto pravděpodobné, že příčina onemocnění u některých pacientů zůstala neodhalena právě z důvodu lokalizace variant mimo exom, což exomové sekvenování nemůže odhalit. Příkladem může být nedávný objev krátkých tandemových repetitiv (short tandem repeats, STR) na chromozomu 15q, které způsobují rezistenci na tyreotropin prostřednictvím aktivace primátově specifického enhancera pro mikroRNA MIR7-2/MIR1179 (Grasberger *et al.* 2024). Tato patogenní varianta se nachází mimo kódující oblasti a nelze ji detekovat běžným exomovým přístupem. Jedná se o příklad mechanismu, který může být relevantní u některých pacientů s nevysvětleným fenotypem hypotyreózy nebo tyreoidální rezistence, ale zůstává skrytý při použití WES (celoexomové sekvenování, whole exome sequencing). Tento i další podobné nálezy podporují potřebu budoucího nasazení celogenomového sekvenování (whole genome sequencing, WGS), zejména u neobjasněných případů.

5.1 U pacientů s kongenitální hypotyreózou se nachází dosud nepopsané varianty v genech známých pro jejich roli ve vývoji a funkci štítné žlázy, přičemž tyto varianty vykazují bioinformatické znaky vysoké pravděpodobnosti patogenity (např. sestřih, posun čtecího rámce, nonsense mutace)

Ze 47 vzorků potenciálních pacientů s kongenitální hypotyreózou bylo objeveno 22 pozitivních nálezů geneticky kauzálních variant (v tabulce číslo 11 označeno žlutě). Z nich, na základě dostupných literárních zdrojů a dle programu SeqOne, byly klasifikovány na varianty patogenní, nejspíše patogenní, benigní, či nejspíše benigní a varianta neznámého významu. Byly identifikovány i dosud nepopsané genetické varianty u pacientů s kongenitální hypotyreózou. Tyto varianty nebyly nalezeny v žádných veřejně dostupných

populačních databázích (např. NCBI, gnomAD) ani v odborné literatuře, a proto byly dále hodnoceny jako potenciálně patogenní na základě bioinformatických predikcí (pomocí nástrojů dostupných v rámci programu SeqOne), evoluční konzervovanosti postižené oblasti, typu mutace a její možné funkční závažnosti (např. nonsense mutace, mutace ovlivňující splicing, posun čtecího rámce, delece/duplikace). Dále byla zohledněna korelace s fenotypem pacienta. Pokud se varianta vyskytovala u pacienta s typickými klinickými znaky kongenitální hypotyreózy a zároveň v genu, který je již známý jako kauzální pro toto onemocnění, byla tato skutečnost brána jako podpůrný argument pro její možnou patogenitu. Kombinací těchto faktorů bylo možné některé nové varianty klasifikovat jako „pravděpodobně patogenní“. Celkem se objevilo v bioinformatických datech 14 nových variant, které byly takto klasifikovány jako možné kauzální varianty.

Ve vzorku TR4/1 byla nalezena varianta v genu *TSHR* c.1357A>C p.M453L vedoucí k missense mutaci a byla vyhodnocena jako pravděpodobně patogenní. V literatuře se tato varianta nevyskytuje, ale je popsána rodina s hypertyreózou, která má kauzální variantu v genu *TSHR* c.1357A>G s efektem missense mutace p.M453V (Stephenson *et al.* 2021). Proto může mít varianta u pacienta TR4/1 významný vliv na štítnou žlázu a tyreoidální hormony. Bioinformatická analýza vyhodnotila tuto variantu (AI) skórem Patogenicity (UP²) = +22pt. Klasický přístup dle pravidel hodnocení variant dle ACMG jako variantu neznámého významu při splnění dvou kritérií PM2 (absence varianty v populačních studiích) a PM5 (známá patogenní varianta ve stejném kodonu).

Vzorek TR5/1 má dosud nepopsanou variantu v genu *KDM6A* c.3215T>G vedoucí k missense variantu p.I1072S. V literatuře je popisována varianta c.3715T>G, která je relativně blízká té ve vzorku TR5/1, ale způsobující závažné onemocnění Kabuki syndrom (Rihani *et al.* 2023), což není případ našeho pacienta, který nevykazuje fenotypově žádné ze známek tohoto postižení. Pacient TR5/1 dle lékařského dotazníku, který byl k dispozici, má prokazující rezistenci vůči tyreoidálním hormonům. U této varianty je rozpor v hodnocení varianty pomocí AI (Patogenicita (UP²) = +25pt) a klasifikace dle ACMG (pravděpodobně benigní) na základě kritéria BP1, které se odkazuje na databázi ClinVar. V této databázi tvoří 81,58 % patogenních variant LoF varianty pro gen *KDM6A* (kritérium BP1 má prahovou hodnotou 80,00 %) a tudíž se nepředpokládá patogenní efekt jen u missense varianty. To může být způsobeno i doposud menšími znalostmi o variabilitě tohoto genu.

U pacienta TR12/1 byla identifikována varianta c.752G>A v genu *THRB*, který kóduje beta podjednotku receptoru pro tyreoidální hormon. Tento gen je znám svou rolí v syndromu rezistence na tyreoidální hormon, avšak jeho souvislost s kongenitální hypotyreózou je méně častá. Skóre Patogenicity (UP²) = +31pt a klasifikace dle ACMG (pravděpodobně patogenní), jelikož mimo kritérií PM2 a PM5 bylo splněno i kritérium PPE, podpora patogenity varianty z analýz řady in-silico algoritmů.

Vzorek TR20/1 má novou variantu genu *TG* c.6896T>G, která má efekt missense ve 40. exonu p.L2299R. *TG* je jedním z nejčastěji mutovaných genů při kongenitální hypotyreóze (Acar *et al.* 2022, Kollati *et al.* 2020, Tanase-Nakao *et al.* 2024, Wang H *et al.* 2020), jeho role je tedy při biosyntéze tyreoidálních hormonů naprosto krucální. Dědičnost zde je autozomálně recesivní, pacient má zděděny dvě bíalelické mutace, kdy tato varianta ve 40. exonu je zděděna od matky a druhá varianta v 10. exonu c.2475T>A p.Y825Ter je nejspíše od otce, který se však nedostavil na vyšetření (viz kap. 4.2.) a jedná se tedy s velkou pravděpodobností o složeného heterozygota.

Ve vzorku TR24/1 byla nalezena nová varianta genu *TG* c.6199+4del (delece v sestřihovém místě). Jelikož pacient ale vykazuje i další mutaci v *TG* genu a to c.886C>T p.R296Ter, která se jeví jako kauzální, není jasný plný význam delece. Do budoucna se plánuje zjistit a osekvenovat RNA pacienta z tohoto genu a tudíž by mohl být objasněn význam delece na sestřih mRNA a dopad na fenotyp pacienta.

Pacient TR27/1 je homozygotem pro nově identifikovanou variantu c.1295A>G (p.N432S) v genu *TSHR*. Tato varianta je předávána autosomálně recesivním způsobem. Na základě genetického profilu pacienta i jeho rodičů lze předpokládat, že se v tomto případě jedná o důsledek příbuzenského sňatku (inbreedingu). Pacient pochází z Vietnamu, kde jsou v některých komunitách stále běžné sňatky mezi bratranci a sestřenicemi, a to zejména za účelem udržení rodinného majetku (např. půdy) (Vietnamplus 2014). K výskytu inbreedingu v těchto regionech přispívá také geografická izolace a omezený kontakt mezi jednotlivými komunitami (Macholdt *et al.* 2020). Oba rodiče pacienta byli testováni (TR27/2 a TR27/3), varianta byla u nich přítomna v heterozygotní formě, což vysvětluje, proč se u nich samotných neprojeví žádné klinické příznaky. Dodatečně byl vyšetřen u druhý potomek TR27/4, který je také homozygotem

samostatně nemusí nutně narušovat normální funkci štítné žlázy. Objasnění může přinést plánované vyšetření rodičů.

5.2 Nález bialelických mutací souvisejících s vývojem a funkcí štítné žlázy, které vedou k rozvoji kongenitální hypotyreózy

Použitá technologie tzv. short-read sequencing má obrovskou výhodu v přesnosti stanovení jednotlivých bází. Vlastní sekvenační reakce mají chybu 1:1000 - 1:10 000 sekvenovaných bází. Většina sekvenačních artefaktů je způsobena enzymy při přípravě knihoven, nikoliv vlastní sekvenační reakcí. Nevýhodou krátkého sekvenování je, že se sekvenují velmi krátké fragmenty DNA a tudíž, pokud se v genu vyskytnou dvě varianty od sebe vzdálené nad rámec sekvenačních reads, nedokážeme spolehlivě určit, zda se varianty nacházejí na chromozomech v pozici trans nebo cis. Pro potvrzení, že se skutečně jedná o složeného heterozygota, je nezbytné vyšetřit tzv. úplné trio – tedy postižené dítě a oba jeho biologické rodiče. Cílem je ověřit, zda každá varianta je na jiném rodičovském chromozomu nebo zda některá z mutací nevznikla de novo. V dostupném souboru vzorků byly celkem čtyři případy s podezřením na složené heterozygoty, z nichž se zatím podařilo vyšetřit úplné trio pouze u jednoho pacienta TR21/1. Tento pacient nesl dvě nové patogenní varianty v genu *DUOXA2* c.341-2A>T ovlivňující sestřih a nacházející se v intronu před 4. exonem a druhá varianta c.623dup p.A209GfsTer21, což je duplikační mutace vedoucí k posunu čtecího rámce a následné předčasné terminaci translace v 5. exonu. První varianta byla zděděna od otce, druhá od matky. Oba rodiče byli heterozygoti se standardním fenotypem. U potomka, který zdědil obě varianty, se projevila kongenitální hypotyreóza, což podporuje hypotézu o patogenitě bialelických mutací v tomto genu.

Další případy pravděpodobných bialelických mutací byly zaznamenány u vzorků TR14/, TR20/1 a TR24/1 (viz tabulka 11). U těchto případů se však nepodařilo vyšetřit rodiče, a to zejména z důvodů neúplných nebo rozvedených rodin, kdy mezi členy často

chybí kontakt nebo ochota spolupracovat na genetickém vyšetření (Dimond *et al.* 2022). Zbylé případy vykazovaly bialelické mutace v genech *TG* a *DUOX2*. Geny *DUOX2*, *TG* a *DUOXA2* patří mezi nejčastěji spojované s výskytem bialelických mutací vedoucích k tyreoidálním onemocněním (Abe *et al.* 2015, Sun *et al.* 2018, Sun *et al.* 2021, Wang F *et al.* 2020).

5.3 Některé genetické příčiny kongenitální hypotyreózy považované primárně za recesivní mohou být způsobeny i autozomálně dominantními mutacemi s nižší penetrancí (mírnější formou CH)

V souboru dat byl nalezen jeden případ varianty u genu, kde je dědičnost primárně považována na recesivní, ale při bližším zkoumání se zjistilo, že se jedná o autozomálně dominantní mutaci s variabilní expresivitou. Jedná se o pacienta TR28/1, který má variantu v genu *DUOX2* c.602dup mající za následek terminaci p.Q202TfsTer99. Z literárních zdrojů vyplývá, že gen *DUOX2* je častým případem tohoto jevu, jelikož často jeho funkci přebírá *DUOX1* a na fenotypu se tedy změna nemusí plně projevit, ale může se projevit tato změna přechodným klinickým projevem. Zároveň exprese tohoto genu je závislá i na okolním genetickém pozadí (exprese/mutace v *DUOX1*) a zčásti i na jodidovém příjmu (Maruo *et al.* 2008, Vigone *et al.* 2005).

5.4 U pacientů s dyshormonogenezí převažuje výskyt patogenních variant v genech kódujících enzymy podílející se na hormonální syntéze (např. *DUOX2*, *TPO*), přičemž většina těchto variant způsobuje narušení katalyticky aktivních domén

Výsledky této práce ukazují, že u pacientů s kongenitální hypotyreózou byly identifikovány patogenní varianty v genech kódujících enzymy nebo transportní proteiny zapojené do syntézy a sekrece hormonů štítné žlázy, ale také se stejně často objevovaly varianty v receptorech a tyreoglobulinu. To může naznačovat, že patogeneze daného onemocnění není jednoznačně lokalizována pouze do jedné části regulačního systému štítné žlázy (viz Graf 2). Místo toho se může jednat o komplexní poruchu, která postihuje jak produkci, tak zpětnou vazbu a signalizaci hormonů. Tento nález může podporovat hypotézu o multifaktoriální etiologii, kde jednotlivé geny v různých krocích hormonální dráhy (syntéza, transport, vazba na receptor) přispívají k manifestaci onemocnění srovnatelnou měrou. Z klinického hlediska to znamená, že při genetickém screeningu nebo výzkumu predispozice je třeba zaměřit se nejen na enzymy a transportéry podílející se na biosyntéze hormonů, ale rovněž na geny zprostředkovávající hormonální účinek (např. receptory, tyreoglobulin). Rovnoměrné rozložení kauzálních mutací pravděpodobně odráží skutečnost, že narušení jakéhokoliv z těchto kroků může mít za následek podobný fenotyp (např. hypotyreózu) a tedy i podobnou klinickou diagnózu, ačkoliv genetická příčina nemusí být shodná.

Nejčastěji mutovanými geny byly *DUOX2* a *TSHR*, které se objevily shodně ve třech případech ze dvanácti potvrzených pacientů s kauzálními variantami. U genu *DUOX2*, jenž kóduje enzym dual oxidázu 2 nezbytnou pro tvorbu H_2O_2 při syntéze tyreoidálních hormonů, byla identifikována mutace u vzorků TR14/1, TR28/1 a TR29/1. Genu *TSHR* kódujícího receptor pro tyreotropin (TSH), byla prokázána mutace u vzorků TR4/1, TR24/1 a TR24/4. Oba tyto geny jsou v literatuře opakovaně spojovány s hereditární formou kongenitální hypotyreózy, přičemž se u nich často vyskytují jak recesivní, tak i dominantně

se dědicí patogenní varianty (Da *et al.* 2021, Long *et al.* 2021, Sorapipatcharoen *et al.* 2020, Sun *et al.* 2018, Wang F *et al.* 2020, Wang H *et al.* 2020).

Klinicky tyto výsledky podtrhují nutnost širšího genetického screeningu, který by měl zahrnovat i geny zodpovědné za regulaci, funkci a účinky hormonů štítné žlázy.

5.5 Pacient TR34/1 s familiární dysalbuminemickou hypertyroxinémií

U pacienta TR34/1 byla identifikována varianta v genu *ALB* c.725G>A vedoucí k missense mutaci p.R242H. Tato mutace je spojována s familiární dysalbuminemickou hypertyroxinémií (FDH), což je geneticky podmíněné onemocnění charakterizované zvýšenými hladinami volného tyroxinu (free T4, fT4) při normální funkci štítné žlázy. Zvýšené hladiny fT4 jsou způsobeny zvýšenou afinitou mutovaného albuminu o 10-15x oproti normálnímu (wild-type) albuminu. FDH se zpravidla neprojevuje klinickými symptomy, avšak její nerozpoznání může vést k chybnému stanovení diagnózy hypertyreózy a následně k nevhodné léčbě, pokud se nepoužijí přesné metody měření fT4 (Brown A *et al.* 2023, Li Y *et al.* 2023 Petitpas *et al.* 2003).

Nález této konkrétní varianty p.R242H v genu *ALB* byl nezávisle potvrzen ve studii Turkkahraman *et al.* 2024, která ji popsala u tureckého dětského pacienta s FDH. Tato publikace a další podobné (např. Sunthornthepvarakul *et al.* 1994), tak poskytují silnou literární oporu pro validaci naší diagnózy a poukazují na důležitost diferenciální diagnostiky u pacientů s neobvyklými výsledky hormonálních testů štítné žlázy.

Bohužel i přes opakovanou žádost se nepodařilo získat podrobnější klinické údaje k tomuto pacientovi.

5.6 Do interpretace výsledků bioinformatických analýz se aktuálně zapojuje strojové učení (umělá inteligence, artificial intelligence, AI). Začíná poskytovat lepší výsledky než standardní interpretační postupy

Jedním z hlavních cílů této práce bylo posoudit vztah mezi výstupy algoritmu umělé inteligence DiagAI, implementovaného v prostředí bioinformatického programu SeqOne, a tradiční klasifikací genetických variant podle směrnic ACMG a odborných databází (např. ClinVar). Pro tento účel byla provedena korelační analýza pomocí Spearmanova pořadového korelačního koeficientu, který je vhodný pro hodnocení monotónních vztahů mezi ordinálními a spojitými proměnnými bez nutnosti normality rozdělení. Výsledky ukázaly výrazně pozitivní a statisticky významnou korelaci mezi většinou proměnných. Nejvyšší korelace byla zaznamenána mezi dvěma výstupy samotného algoritmu – DiagAI Score a Patogenicity (UP²) ($\rho = 0,87$), což potvrzuje jejich vysokou vnitřní konzistenci. Dále byla pozorována středně silná až silná korelace mezi DiagAI Score a klasifikací dle ACMG ($\rho = 0,70$) a mezi DiagAI Score a databází ClinVar ($\rho = 0,71$). Klasifikace ACMG a anotace ClinVar spolu korelovaly na úrovni $\rho = 0,75$, což je očekávatelné vzhledem k tomu, že ClinVar často vychází z odborných ACMG hodnocení. Tato zjištění podporují hypotézu, že model DiagAI je do určité míry schopen napodobit lidské odborné rozhodování a že jeho výstupy reflektují tradiční přístup ke klasifikaci genetických variant. Korelace ovšem není dokonalá, což naznačuje, že AI model se může v některých případech odlišovat od manuální klasifikace. Tato odlišnost může být v klinické praxi přínosná, zejména při hodnocení VUS, u kterých může algoritmus naznačit směr dalšího přezkoumání.

Je však důležité zdůraznit, že Spearmanova korelace vyjadřuje pouze sílu a směr monotónního vztahu. Z tohoto důvodu byla provedena také kvantitativní komparace mezi výstupy programu SeqOne a ručním hodnocením, kdy byly všechny klasifikace převedeny na škálu 0–1 a porovnány pomocí výpočtu procentuální shody. Výsledná průměrná shoda činila 86 %, přičemž 47 z celkových 74 variant (63,5 %) dosáhlo shody ≥ 80 %. Tento výsledek potvrzuje relativně vysokou konzistenci mezi automatizovaným

hodnocením a klasickým přístupem. Zároveň poukazuje na praktickou využitelnost SeqOne jako podpůrného nástroje v diagnostice genetických onemocnění.

Bioinformatické nástroje představují významnou podporu pro klinické pracovníky, jelikož umožňují rychlejší a efektivnější analýzu genetických dat. U onemocnění, jako je kongenitální hypotyreóza nebo familiární dysalbuminemická hypertyroxinémie, kde je časná a přesná diagnostika klíčová pro zahájení vhodné léčby, je tento přínos zcela zásadní. Díky automatizovanému zpracování dat a algoritmům predikujícím patogenitu variant lze výrazně urychlit rozhodovací proces, čímž se zvyšuje efektivita diagnostiky i následné péče o pacienta. Recentně publikované srovnání bioinformatických pipeline využívajících AI od sedmi různých výrobců vyhodnotilo AI, a to konkrétně SeqOne model jako neúspěšnější ve správné prioritizaci variant, což výrazně urychluje proces filtrování a identifikace relevantních změn v genomu pacienta. Tato schopnost představuje významný přínos zejména v klinické diagnostice, kde je rychlost a přesnost rozhodující. SeqOne lze z tohoto pohledu považovat za jeden z nejpokročilejších bioinformatických nástrojů svého druhu. Nicméně, přes veškerý technologický pokrok v sekvenování, progres ve validním přiřazení klinického dopadu dané varianty je stále časově zdoluhavý. Také finanční náročnost potvrzení patogenity obrovského množství nově objevených variant na tkáňových kulturách, zvířecích modelech či vyšetření segregace v rozsáhlých rodokmenech je značná. Bioinformatické analýzy sice pomocí řady in-silico algoritmů patogenitu variant testují, ale v diagnostice se na ně nemůžeme zatím zcela spolehnout. Z těchto důvodů v odborných databázích zatím u většiny nově popsáných variant chybí podklady pro určení patogenity, což se odráží v častém zařazování variant do kategorie VUS. To poukazuje na nutnost zachování lidského odborného posouzení, které je nezbytné pro finální interpretaci klinického významu jednotlivých variant a pro potvrzení jejich patogenity (Bastida-Lertxundi *et al.* 2025).

6 Závěr

Kongenitální hypotyreóza je onemocnění, které je definováno nedostatkem tyreoidálních hormonů, projevující se již při narození. Hypotyreóza může být důsledkem deficitu enzymů, poruch u syntézy tyreoidálních hormonů, poruch ve funkcích receptorů pro tyto hormony a jejich přenašečů či kongenitálních anomálií týkající se anatomické a fyziologické funkce štítné žlázy.

Diplomová práce se věnovala molekulárně-genetické analýze 47 pacientů s podezřením na kongenitální hypotyreózu (CH), a to pomocí bioinformatického nástroje SeqOne, který umožňuje interpretaci dat z exomového sekvenování. Cílem práce bylo identifikovat genetické příčiny tohoto onemocnění, klasifikovat nalezené varianty a porovnat výsledky lidského hodnocení s automatizovanou analýzou.

Ve 22 ze 47 patientských vzorků byly nalezeny genetické varianty, které pravděpodobně vysvětlují klinický obraz. Celkem bylo identifikováno 22 variant považovaných za kauzální – 4 z literatury známé patogenní varianty, 13 nových, dosud nepopsaných variant, které vykazovaly vysokou pravděpodobnost patogenity na základě typu mutace, lokalizace v konzervovaných oblastech a prediktivních algoritmů a 4 varianty dle aktuálního stavu poznání hodnocené jako varianty nejasného významu (VUS). Nejčastěji zastoupenými geny byly: *DUOX2*, *TSHR*, *TG*, což vyvrací naši hypotézu, že u pacientů s dyshormonogenezí převažuje výskyt patogenních variant v genech kódujících enzymy podílející se na hormonální syntéze, jelikož se stejně často objevovaly mutace v genech i mimo enzymy (*TG*, *TSHR*). Dále byly přítomny varianty v genech *DUOXA2*, *TPO*, *SLC5A5*, *KDM6A* a *POU1F1*. Pacienti TR27/1 a TR27/4 byli detekováni s homozygotní variantou v genu *TSHR*, přičemž oba rodiče byli heterozygotní a asymptomatictí, což potvrdilo autosomálně recesivní dědičnost. V dalších případech (např. TR14/1, TR20/1, TR24/1) byla zjištěna pravděpodobná složená heterozygotnost, zejména v genech *DUOX2*, *DUOXA2* a *TG*, ale její potvrzení nebylo možné kvůli nepodstoupení vyšetření rodičů. Pacient TR21/1 byl jediný, u kterého byla analýza provedena z kompletního tria (matka, otec, dítě). Díky tomu bylo možné potvrdit bíalelickou dědičnost v genu *DUOXA2*, kdy každá z patogenních variant pocházela od jednoho z rodičů. Tento nález jednoznačně demonstruje význam

genetické analýzy celých rodin, zejména při ověřování patogenicity složených mutací. U pacienta TR28/1 byla zjištěna frameshift mutace v genu *DUOX2*, která vedla k předčasnému ukončení translace. Přestože se mutace vyskytovala pouze v heterozygotním stavu, se klinicky projevila, což naznačuje možnou dominantní dědičnost s neúplnou penetrancí. Zajímavým případem byl pacient TR34/1, u kterého byla nalezena varianta v genu *ALB* typická pro familiární dysalbuminemickou hypertyroxinémii (FDH). Ačkoliv nejde o pravou hypotyreózu, falešně zvýšené hladiny fT4 mohly být chybně interpretovány jako porucha funkce štítné žlázy. Tento případ potvrzuje důležitost genetické analýzy i pro diferenciální diagnostiku a správnou interpretaci laboratorních dat.

Spearmanova korelační analýza prokázala silné a statisticky významné vztahy mezi výstupy strojového učení algoritmu DiagAI a tradičními klasifikačními systémy genetických variant. Nejvyšší korelace byla zaznamenána mezi dvěma interními metrikami algoritmu (DiagAI skóre a Patogenicity UP²; $\rho = 0,87$), což potvrzuje jejich vysokou vnitřní konzistenci. Významná pozitivní korelace byla dále nalezena mezi DiagAI skóre a klasifikací podle směrnic ACMG ($\rho = 0,70$) i mezi DiagAI skóre a databází ClinVar ($\rho = 0,71$). Také mezi klasifikací ACMG a anotacemi v ClinVar byla potvrzena silná korelace ($\rho = 0,75$). Tato zjištění naznačují, že algoritmus DiagAI je do značné míry schopen reflektovat lidské rozhodování založené na odborných kritériích a že jeho prediktivní výstupy mohou být využitelné jako podpůrný nástroj v diagnostice genetických variant. Zároveň ale nelze opomenout, že silnější korelace nemusí být vždy výhodou, např. při identifikaci potenciálně patogenních variant klasifikovaných dosud jako VUS mohou přinést změnu interpretace varianty. Kromě korelační analýzy byla provedena kvantitativní přímá komparace mezi automatizovaným hodnocením programu SeqOne a ručním hodnocením variant na základě literatury a databází. Po převedení všech klasifikací na jednotnou škálu 0–1 byla vypočtena procentuální shoda, která v průměru dosáhla hodnoty 86 %. U 47 z celkem 74 hodnocených variant (63,5 %) byla míra shody ≥ 80 %. Tento výsledek potvrzuje vysokou míru konzistence mezi tradičním přístupem a výstupy algoritmu a zároveň poukazuje na praktičnost využití automatizovaných nástrojů v klinickém prostředí. Přesto nástroj v několika případech klasifikoval potenciálně patogenní varianty jako VUS, což ukazuje na nutnost lidského odborného dohledu, zejména v případech s nejasným fenotypem nebo nedostatkem důkazů. Díky nižší ochotě některých

rodin spolupracovat na potvrzení patogenicity segregací variant v rodině, bude v dalším upřesnění klinického významu nově popsáných variant pokračovat školící pracoviště.

Tato diplomová práce významně přispěla k rozšíření znalostí o genetickém pozadí kongenitální hypotyreózy. Objevené nové varianty, zejména v genech *TSHR*, *DUOX2* a *DUOXA2*, představují kandidáty pro další funkční validaci a klinické sledování. Výsledky nekorelují s tvrzením, že u pacientů kongenitální hypotyreózy na podkladě dyshormonogeneze, převažují varianty v genech mající roli v enzimech a transportérech. Cílené genetické panely představují vhodný nástroj pro rutinní diagnostiku. Do budoucna by bylo vhodné rozšířit studii o větší kohortu pacientů, častěji využívat trio analýzu a zvažovat i celogenomové sekvenování (whole genome sequencing, WGS), které by mohlo zachytit i mutace mimo kódující oblasti nebo větší strukturální změny.

Seznam zkratek

ACMG	Americkou společností lékařské genetiky a genomiky	American College of Medical genetics and genomics
AI	umělá inteligence	artificial intelligence
B	benigní	benign
cAMP	cyklický adenosin monofosfát	Cyclic adenosin monophosphat
CNS	centrální nervová soustava	
CH	kongenitální hypotyreóza	congenital hypothyroidism
DIO2	deiodináza 2. typu	type 2 deiodinase
DIT	dijodtyrosin	diiodotyrosine
DNB	DNA nanokoule	DNA nanoballs
DUOX1	dvojitá oxidáza 1	dual oxidase 1
DUOX2	dvojitá oxidáza 2	dual oxidase 2
DUOXA1	maturační faktor dvojitá oxidázy 1	dual oxidase maturation factor 1
DUOXA2	maturační faktor dvojitá oxidázy 2	dual oxidase maturation factor 2
FDH	Familiární dysalbuminemická hypertyroxinémie	Familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia
FNHK	Fakultní nemocnice Hradec Králové	
FOXE1	forkhead box E1	
ft4	volný tyroxin	free T4
gnomAD	The Genome Aggregation Database	
IGSF1	člen 1 imunoglobulinové superrodiny	immunoglobulin superfamily member 1
IRS4	substrát 4 pro inzulínový receptor	insulin receptor substrate 4
IYD	jodotyrosinová deiodenáza	iodotyrosine deiodinase
JmjC	Jumonji C doména	Jumonji C domain
KDM6A	demetyláza lysinu 6A	lysine demethylase 6A
LB	pravděpodobně benigní	likely benign

LP	pravděpodobně patogenní	likely pathogenic
MCT8	monokarboxylátový přenašeč 8	monocarboxylate transporter 8
MIT	monojodtyrosin	monoidotyrosine
MR	magnetická rezonance	
Myo-Va	Myosin V	
NCBI	National Center of Biotechnology Information	
NIS	symportér sodíkového iodidu	sodium iodide symporter
NKX2.1	NK2 příbuzný transkripčnímu faktoru lokus 1	NK2 transcription factor related locus 1
NKX2.5	NK2 příbuzný transkripčnímu faktoru lokus 5	NK2 transcription factor related locus 5
NS	novorozenecký screening	newborn screening
OATP1C1	přenašeč organických aniontů polypeptid 1C1	organic anion transporter polypeptide 1C1
P	patogenní	pathogenic
PAX8	paired box 8	
PCH	permanentní kongenitální hypotyreóza	Permanent congenital hypothyroidism
PCR	polymerázová řetězová reakce	polymerase chain reaction
PDS	pendrin	
PM	pevné částice	particulate matter
POU1F1	Třída 1 POU homeobox 1	POU class 1 homeobox 1
SEQ	sekvenování	sequencing
SRC-1	koaktivátor 1 steroidového receptoru	steroid receptor coactivator-1
STR	krátké tandemové repetice	short tandem repeats
ŠŽ	štítná žláza	
T3	3,5,3'-trijodo-L-tyronin	
T4	3,5,3',5'-tetrajodo-L-tyronin, tyroxin	thyroxin
TBL1X	adaptorový transdukční protein podobný beta 1	the adaptor protein transducin beta-like 1

TG	tyreoglobulin	thyroglobulin
TH	tyreoidální hormon	thyroid hormone
THR α	receptor thyroideálního hormonu alfa	thyroid hormone receptor alpha
THR β	receptor thyroideálního hormonu beta	thyroid hormone receptor beta
TPO	tyreoidální peroxidáza	thyroid peroxidase
TR	tyroidní hormonový receptor	thyroid hormone receptor
TREs	responzivní elementy tyreoidálních hormonů	thyroid hormone response elements
TRH	tyreotropin uvolňující hormon	thyrotropin-releasing hormone
TRHR	receptor tyreotropin uvolňujícího hormonu	thyrotropin releasing hormone receptor
TSH	tyreotropin	thyroid-stimulating hormone
TSH β	β podjednotka tyreotropinu	thyroid stimulating hormone subunit β
TSHR	receptor pro tyreotropin	thyrotropin receptor
UZ	ultrazvuk	
VUS	varianta nejasného významu	variant of uncertain significance
WES	celoexomové sekvenování	whole exome sequencing
WGS	celogenomové sekvenování	whole genome sequencing

Seznam literatury

Abe K, Narumi S, Suwanai AS, Hamajima T, Hasegawa T, 2015, Pseudodominant inheritance in a family with nonautoimmune hypothyroidism due to biallelic DUOX2 mutations, *Clin Endocrinol (Oxf)*, 83(3):394-8, doi: 10.1111/cen.12622

Abbasi R, Harari-Kremer R, Haim A, Raz R, 2022, Risk Factors of Congenital Hypothyroidism in Israel, *Isr Med Assoc J*, 25(12):808-814

Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ, 2010, Structure and function of the blood-brain barrier, *Neurobiol Dis*, 37(1):13-25, doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030 (*)

Abramowicz MJ, Targovnik HM, Varela V, Cochaux P, Krawiec L, Pisarev MA, Propato FV, Juvenal G, Chester HA, Vassart G, 1992, Identification of a mutation in the coding sequence of the human thyroid peroxidase gene causing congenital goiter, *J Clin Invest.*, 90(4):1200-4. doi: 10.1172/JCI115981

Abu-Hamdah R, Cho WJ, Hörber JK, Jena BP, 2006, Secretory vesicles in live cells are not free-floating but tethered to filamentous structures: a study using photonic force microscopy, *Ultramicroscopy*, 106(8-9):670-3, doi: 10.1016/j.ultramic.2006.01.013

Acar S, Gürsoy S, Arslan G, Nalbantoğlu Ö, Hazan F, Köprülü Ö, Özkaya B, Özkan B, 2022, Screening of 23 candidate genes by next-generation sequencing of patients with permanent congenital hypothyroidism: novel variants in TG, TSHR, DUOX2, FOXE1, and SLC26A7, *J Endocrinol Invest*, 45(4):773-786, doi: 10.1007/s40618-021-01706-1

Alcántara-Ortigoza MA, Sánchez-Verdiguel I, Fernández-Hernández L, Enríquez-Flores S, González-Núñez A, Hernández-Martínez NL, Sánchez C, González-Del Angel A, 2021, Further Evidence That Defects in Main Thyroid Dysgenesis-Related Genes Are an Uncommon Etiology for Primary Congenital Hypothyroidism in Mexican Patients: Report of Rare Variants in *FOXE1*, *NKX2-5* and *TSHR*, *Children (Basel)*, 8(6):457, doi: 10.3390/children8060457

Alimohamadi Y, Taghdir M, Sepandi M, 2018, Statistical data analysis of the risk factors of Neonatal Congenital Hypothyroidism in Khuzestan Province, Iran, *Data Brief*, 21:2510-2514, doi: 10.1016/j.dib.2018.11.113

Al Taji, Eva, 2009, Pathophysiology of primary congenital and early-onset non-autoimmune hypothyroidism, Praha, Dostupné: <https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/23976/140008227.pdf?sequence=1&isAllowed=y>, Disertační práce, Oddělení pediatrie, 3. lékařská fakulta, Karlova Univerzita, Vedoucí práce: Prof. MUDr. Jan Lebl, CSc., Konzultant: Assoc. Prof. Dr. Heiko Krude

Al-Qahtani M, 2022, Congenital Hypothyroidism, *J Matern Fetal Neonatal Med*, 35(19):3761-3769, doi: 10.1080/14767058.2020.1838480 (*)

Avbelj M, Tahirovic H, Debeljak M, Kusekova M, Toromanovic A, Krzisnik C, Battelino T, 2007, High prevalence of thyroid peroxidase gene mutations in patients with thyroid dysmorphogenesis, *Eur J Endocrinol*, 156(5):511-9, doi: 10.1530/EJE-07-0037

Baas F, Bikker H, Geurts van Kessel A, Melsert R, Pearson PL, de Vijlder JJ, van Ommen GJ, 1985, The human thyroglobulin gene: a polymorphic marker localized distal to C-MYC on chromosome 8 band q24, *Hum Genet*, 69(2):138-43, doi: 10.1007/BF00293284

Baas F, van Ommen GJ, Bikker H, Arnberg AC, de Vijlder JJ, 1986, The human thyroglobulin gene is over 300 kb long and contains introns of up to 64 kb, *Nucleic Acids Res*, 14(13):5171-86, doi: 10.1093/nar/14.13.5171

Bassett JH, Williams G, 2016, Role of Thyroid Hormones in Skeletal Development and Bone Maintenance, *Endocr Rev*, 37(2):135-87, doi: 10.1210/er.2015-1106 (*)

Bastida-Lertxundi N, Martí-Carrera I, Laña-Ruíz B, Martínez-Múgica Barbosa O, Muguerza-Iraola R, Sáez-Villaverde R, Crettaz JS, 2025, Evaluating seven bioinformatics platforms for tertiary analysis of genomic data from whole exome sequencing in a pilot group of patients, *Adv Lab Med*, 6(1):28-36, doi: 10.1515/almed-2025-0031

Batsakis JG, Nishiyama RH, 1962, Deafness with sporadic goiter, Pendred's syndrome, *Arch Otolaryngol*, 76:401-6, doi: 10.1001/archotol.1962.00740050413004

Bellinger DC, 2005, Teratogen update: lead and pregnancy, *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 73(6):409-20, doi: 10.1002/bdra.20127 (*)

Berg G, Björkman U, Ekholm R, 1980, The structure of newly synthesized intracellular thyroglobulin molecules, *Mol Cell Endocrinol*, 20(1):87-98, doi: 10.1016/0303-7207(80)90096-9 (*)

Bernal J, 2017, Thyroid hormone regulated genes in cerebral cortex development, *J Endocrinol*, 232(2):R83-R97, doi: 10.1530/JOE-16-0424 (*)

Bezdiccka M, Kleiblova P, Soucek J, Borecka M, El-Lababidi E, Smrz D, Rataj M, Sumnik Z, Malikova J, Soucek O, 2021, Novel presentation of the c.1856A > G (p.Asp619Gly) TSHR gene-activating variant: relapsing hyperthyroidism in three subsequent generations manifesting in early childhood and an in vitro functional study, *Hormones (Athens)*, 20(4):803-812, doi: 10.1007/s42000-021-00299-x

Blizzard RM, Alberts M, 1956, Hypopituitarism, hypoadrenalism, and hypogonadism in the newborn infant, *J Pediatr*, 48(6):782-92, doi: 10.1016/s0022-3476(56)80210-2

Brown A, Hofman P, Li B, Heron C, Heather N, 2023, A Positive Newborn Screen for Congenital Hypothyroidism in a Clinically Euthyroid Neonate-Avoiding Unnecessary Treatment, *Int J Neonatal Screen*, 9(2):16. doi: 10.3390/ijns9020016

Brown SB, Maloney M, Kinlaw WB, 1997, "Spot 14" protein functions at the pretranslational level in the regulation of hepatic metabolism by thyroid hormone and glucose, *J Biol Chem*, 272(4):2163-6

Burrows HL, Douglas KR, Seasholtz AF, Camper SA, 1999, Genealogy of the Anterior Pituitary Gland: Tracing a Family Tree, *Trends Endocrinol Metab*, 10(9):343-352, doi: 10.1016/s1043-2760(99)00189-7

Carr FE, Kaseem LL, Wong NC, 1992, Thyroid hormone inhibits thyrotropin gene expression via a position-independent negative L-triiodothyronine-responsive element, *J Biol Chem*, 267(26):18689-94

Chassande O, Fraichard A, Gauthier K, Flamant F, Legrand C, Savatier P, Laudet V, Samarut J, 1997, Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the *c-erbA* alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities, *Mol Endocrinol*, 11(9):1278-90, doi: 10.1210/mend.11.9.9972

Chiamolera MI, Sidhaye AR, Matsumoto S, He Q, Hashimoto K, Ortiga-Carvalho TM, Wondisford FE, 2012, Fundamentally distinct roles of thyroid hormone receptor isoforms in a thyrotroph cell line are due to differential DNA binding, *Mol Endocrinol*, 26(6):926-39, doi: 10.1210/me.2011-1290 (*)

Conrad SC, Chiu H, Silverman BL, 2004, Soy formula complicates management of congenital hypothyroidism, *Arch Dis Child*, 89(1):37-40, doi: 10.1136/adc.2002.009365

Da DZ, Wang Y, Wang M, Long Z, Wang Q, Liu J, 2021, Congenital Hypothyroidism Patients With Thyroid Hormone Receptor Variants Are Not Rare: A Systematic Review, *Inquiry*, 58:469580211067943, doi: 10.1177/00469580211067943 (*)

Dattani MT, Martinez-Barbera JP, Thomas PQ, Brickman JM, Gupta R, Mårtensson IL, Toresson H, Fox M, Wales JK, Hindmarsh PC, Krauss S, Beddington RS, Robinson IC, 1998, Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse, *Nat Genet.*, 19(2):125-33, doi: 10.1038/477

David J, Chrastina P, Vinohradská H, Al Taji E, Holubová A, Hlídková E, Kozich V, Votava F, 2018, Neonatal screening in the Czech Republic: increased prevalence of selected diseases in low birthweight neonates, *Eur J Pediatr*, 177(11):1697-1704, doi: 10.1007/s00431-018-3230-y

Delahunty C, Falconer S, Hume R, Jackson L, Midgley P, Mirfield M, Ogston S, Perra O, Simpson J, Watson J, Willatts P, Williams F, 2010, Scottish Preterm Thyroid Group, Levels of neonatal thyroid hormone in preterm infants and neurodevelopmental outcome at 5 1/2 years: millennium cohort study, *J Clin Endocrinol Metab*, 95(11):4898-908m, doi: 10.1210/jc.2010-0743

Dimond R, Doheny S, Ballard L, Clarke A, 2022, Genetic testing and family entanglements, *Soc Sci Med*, 298:114857, doi: 10.1016/j.socscimed.2022.114857

Fang Q, George AS, Brinkmeier ML, Mortensen AH, Gergics P, Cheung LY, Daly AZ, Ajmal A, Pérez Millán MI, Ozel AB, Kitzman JO, Mills RE, Li JZ, Camper SA, 2016, Genetics of Combined Pituitary Hormone Deficiency: Roadmap into the Genome Era, *Endocr Rev*, 37(6):636-675, doi: 10.1210/er.2016-1101 (*)

Feuchtbaum L, Carter J, Dowray S, Currier RJ, Lorey F, 2012, Birth prevalence of disorders detectable through newborn screening by race/ethnicity, *Genet Med*, 14(11):937-45, doi: 10.1038/gim.2012.7

Fujita K, Matsuo N, Mori O, Koda N, Mukai E, Okabe Y, Shirakawa N, Tamai S, Itagane Y, Hibi I, 1992, The association of hypopituitarism with small pituitary, invisible pituitary stalk, type 1 Arnold-Chiari malformation, and syringomyelia in seven patients born in breech position: a further proof of birth injury theory on the pathogenesis of "idiopathic hypopituitarism", *Eur J Pediatr*, 151(4):266-70. doi: 10.1007/BF02072226

García M, Barrio R, García-Lavandeira M, Garcia-Rendueles AR, Escudero A, Díaz-Rodríguez E, Gorbenko Del Blanco D, Fernández A, de Rijke YB, Vallespín E, Nevado J, Lapunzina P, Matre V, Hinkle PM, Hokken-Koelega AC, de Miguel MP, Cameselle-Teijeiro JM, Nistal M, Alvarez CV, Moreno JC, 2017, The syndrome of central hypothyroidism and macroorchidism: IGSF1 controls TRHR and FSHB expression by differential modulation of pituitary TGF β and Activin pathways, *Sci Rep.*, 7:42937, doi: 10.1038/srep42937

Gereben B, Zeöld A, Dentice M, Salvatore D, Bianco AC, 2008, Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences, *Cell Mol Life Sci*, 65(4):570-90, doi: 10.1007/s00018-007-7396-0 (*)

Giannocco G, Kizys MML, Maciel RM, de Souza JS, 2021, Thyroid hormone, gene expression, and Central Nervous System: Where we are, *Semin Cell Dev Biol*, 114:47-56, doi: 10.1016/j.semcdb.2020.09.007 (*)

Grasberger H, Dumitrescu AM, Liao XH, Swanson EG, Weiss RE, Srichomkwun P, Pappa T, Chen J, Yoshimura T, Hoffmann P, França MM, Tagett R, Onigata K, Costagliola S, Ranchalis J, Vollger MR, Stergachis AB, Chong JX, Bamshad MJ, Smits G, Vassart G, Refetoff S, 2024, STR mutations on chromosome 15q cause thyrotropin resistance by activating a primate-specific enhancer of MIR7-2/MIR1179, *Nat Genet*, 56(5):877-888, doi: 10.1038/s41588-024-01717-7

Grasberger H, Refetoff S, 2006, Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent, *J Biol Chem.*, 281(27):18269-72, doi: 10.1074/jbc.C600095200

Grassi ES, Rurale G, de Filippis T, Gentilini D, Carbone E, Coscia F, Uraghi S, Bullock M, Clifton-Bligh RJ, Gupta AK, Persani L, 2023, The length of FOXE1 polyalanine tract in congenital hypothyroidism: Evidence for a pathogenic role from familial, molecular and cohort studies, *Front Endocrinol (Lausanne)*, 14:1127312, doi: 10.3389/fendo.2023.1127312

Greenfield A, Carrel L, Pennisi D, Philippe C, Quaderi N, Siggers P, Steiner K, Tam PP, Monaco AP, Willard HF, Koopman P, 1998, The UTX gene escapes X inactivation in mice and humans, *Hum Mol Genet*, 7(4):737-42, doi: 10.1093/hmg/7.4.737

Grossmann M, Weintraub BD, Szkudlinski MW, 1997, Novel insights into the molecular mechanisms of human thyrotropin action: structural, physiological, and therapeutic implications for the glycoprotein hormone family, *Endocr Rev*, 18(4):476-501, doi: 10.1210/edrv.18.4.0305 (*)

Guadaño-Ferraz A, Obregón MJ, St Germain DL, Bernal J, 1997, The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(19):10391-6, doi: 10.1073/pnas.94.19.10391

Guo J, Xiang T, Wang Y, Yuan G, 2024, A rare mutation in THRB gene of resistance to thyroid hormone: a case report of a Chinese pedigree, *QJM*, 117(7):538-540, doi: 10.1093/qjmed/hcae057

Hashemipour M, Ghasemi M, Hovsepian S, Heiydari K, Sajadi A, Hadian R, Mansourian M, Mirshahzadeh N, Dalvi M, 2013, Prevalence of permanent congenital hypothyroidism in isfahan-iran, *Int J Prev Med*, 4(12):1365-70

Hennemann G, Docter R, Krenning EP, Bos G, Otten M, Visser TJ, 1979, Raised total thyroxine and free thyroxine index but normal free thyroxine. A serum abnormality due to inherited increased affinity of iodothyronines for serum binding protein, *Lancet*, 1(8117):639-42, doi: 10.1016/s0140-6736(79)91080-8

Hermanns P, Grasberger H, Cohen R, Freiberg C, Dörr HG, Refetoff S, Pohlenz J, 2013, Two cases of thyroid dysgenesis caused by different novel PAX8 mutations in the DNA-binding region: in vitro studies reveal different pathogenic mechanisms, *Thyroid*, 23(7):791-6, doi: 10.1089/thy.2012.0141

Hollenberg AN, Monden T, Flynn TR, Boers ME, Cohen O, Wondisford FE, 1995, The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements, *Mol Endocrinol*, 9(5):540-50, doi: 10.1210/mend.9.5.7565802

Hong S, Cho YW, Yu LR, Yu H, Veenstra TD, Ge K, 2007, Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(47):18439-44, doi: 10.1073/pnas.0707292104 (*)

Huang X, Wu D, Zhu L, Wang W, Yang R, Yang J, He Q, Zhu B, You Y, Xiao R, Zhao Z, 2022, Application of a next-generation sequencing (NGS) panel in newborn screening efficiently identifies inborn disorders of neonates, *Orphanet J Rare Dis*, 17(1):66, doi: 10.1186/s13023-022-02231-x.

Ieiri T, Cochaux P, Targovnik HM, Suzuki M, Shimoda S, Perret J, Vassart G, 1991, A 3' splice site mutation in the thyroglobulin gene responsible for congenital goiter with hypothyroidism, *J Clin Invest*, 88(6):1901-5, doi: 10.1172/JCI115513

Ingraham HA, Albert VR, Chen RP, Crenshaw EB, Elsholtz HP, He X, Kapiloff MS, Mangalam HJ, Swanson LW, Treacy MN, et al., 1990, A family of POU-domain and Pit-1 tissue-specific transcription factors in pituitary and neuroendocrine development, *Annu Rev Physiol*, 52:773-91, doi: 10.1146/annurev.ph.52.030190.004013 (*)

Ito J, Narumi S, Nishizawa K, Kamimaki T, Hori N, Hasegawa T, 2016, A novel mutation of the THRB gene in a Japanese family with resistance to thyroid hormone, *Clin Pediatr Endocrinol*, 25(1):19-22, doi: 10.1297/cpe.25.19

Jadhav S, Diwaker C, Lila AR, Gada JV, Kale S, Sarathi V, Thadani PM, Arya S, Patil VA, Shah NS, Bandgar TR, 2021, POU1F1 mutations in combined pituitary hormone deficiency: differing spectrum of mutations in a Western-Indian cohort and systematic analysis of world literature, *Pituitary*, 24(5):657-669, doi: 10.1007/s11102-021-01140-9 (*)

Jazdzewski K, Boguslawska J, Jendrzewski J, Liyanarachchi S, Pachucki J, Wardyn KA, Nauman A, de la Chapelle A, 2011, Thyroid hormone receptor beta (THRB) is a major target gene for microRNAs deregulated in papillary thyroid carcinoma (PTC), *J Clin Endocrinol Metab*, 96(3):E546-53, doi: 10.1210/jc.2010-1594 (*)

Jonklaas J, Bianco AC, Bauer AJ, Burman KD, Cappola AR, Celi FS, Cooper DS, Kim BW, Peeters RP, Rosenthal MS, Sawka AM, 2014, American Thyroid Association Task Force on Thyroid Hormone Replacement. Guidelines for the treatment of hypothyroidism: prepared by the american thyroid association task force on thyroid hormone replacement, *Thyroid*, 24(12):1670-751, doi: 10.1089/thy.2014.0028

Kahaly GJ, Dillmann WH, 2005, Thyroid hormone action in the heart, *Endocr Rev*, 26(5):704-28, doi: 10.1210/er.2003-0033 (*)

Kaye CI, Committee on Genetics, Accurso F, La Franchi S, Lane PA, Northrup H, Pang S, Schaefer GB, 2006, Introduction to the newborn screening fact sheets, *Pediatrics*, 118(3):1304-12, doi: 10.1542/peds.2006-1782 (*)

Khoo S, Lyons G, Solomon A, Oddy S, Halsall D, Chatterjee K, Moran C, 2020 Familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia confounding management of coexistent autoimmune thyroid disease, *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep*, 2020:19-0161, doi: 10.1530/EDM-19-0161 (*)

Kiess W, Penke M, Gesing J, Stoltze A, Körner A, Pfäffle R, Kratzsch J, 2018, Congenital hypothyroidism, *J Pediatr Endocrinol Metab*, 31(6):595-596, doi: 10.1515/jpem-2018-0197 (*)

Kinlaw WB, Church JL, Harmon J, Mariash CN, 1995, Direct evidence for a role of the "spot 14" protein in the regulation of lipid synthesis, *J Biol Chem*, 270(28):16615-8, doi: 10.1074/jbc.270.28.16615

Klieverik LP, Coomans CP, Endert E, Sauerwein HP, Havekes LM, Voshol PJ, Rensen PC, Romijn JA, Kalsbeek A, Fliers E, 2009, Thyroid hormone effects on whole-body energy homeostasis and tissue-specific fatty acid uptake in vivo, *Endocrinology*, 150(12):5639-48, doi: 10.1210/en.2009-0297

Klosinska M, Kaczynska A, Ben-Skowronek I, 2022, Congenital Hypothyroidism in Preterm Newborns - The Challenges of Diagnostics and Treatment: A Review, *Front Endocrinol (Lausanne)*, 13:860862, doi: 10.3389/fendo.2022.860862 (*)

Kollati Y, Akella RRD, Naushad SM, Borkar D, Thalla M, Nagalingam S, Lingappa L, Patel RK, Reddy GB, Dirisala VR, 2020, Newborn screening and single nucleotide variation profiling of TSHR, TPO, TG and DUOX2 candidate genes for congenital hypothyroidism, *Mol Biol Rep*, 47(10):7467-7475, doi: 10.1007/s11033-020-05803-x

Kopp P, van Sande J, Parma J, Duprez L, Gerber H, Joss E, Jameson JL, Dumont JE, Vassart G, 1995, Brief report: congenital hyperthyroidism caused by a mutation in the thyrotropin-receptor gene, *N Engl J Med*, 332(3):150-4, doi: 10.1056/NEJM199501193320304

Lauffer P, Bikker H, Boelen A, Jöbsis JJ, van Trotsenburg ASP, Zwaveling-Soonawala N, 2022, Mild Isolated Congenital Central Hypothyroidism Due to a Novel Homozygous Variant in *TSHB*: A Case Report, *Thyroid*, 32(4):472-474, doi: 10.1089/thy.2021.0651

Lauffer P, Zwaveling-Soonawala N, Naafs JC, Boelen A, van Trotsenburg ASP, 2021, Diagnosis and Management of Central Congenital Hypothyroidism, *Front Endocrinol (Lausanne)*, 12:686317. doi: 10.3389/fendo.2021.686317 (*)

LaFranchi SH, 2011, Approach to the diagnosis and treatment of neonatal hypothyroidism, *J Clin Endocrinol Metab*, 96(10):2959-67, doi: 10.1210/jc.2011-1175 (*)

Lee WN, Golden MP, Van Herle AJ, Lippe BM, Kaplan SA, 1979, Inherited abnormal thyroid hormone-binding protein causing selective increase of total serum thyroxine, *J Clin Endocrinol Metab*, 49(2):292-9, doi: 10.1210/jcem-49-2-292

Li M, Li Z, Chen M, Hu Z, Zhou M, Wu L, Zhang C, Liang D, 2023, Novel Missense Variants in *PAX8* and *NKX2-1* Cause Congenital Hypothyroidism, *Int J Mol Sci*, 24(1):786, doi: 10.3390/ijms24010786

Li Y, Chi Y, Chai X, Liu H, Li N, Lian X, 2023, Familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia combined with Graves' disease: a rare case report, *BMC Endocr Disord*, 23(1):226, doi: 10.1186/s12902-023-01481-5

Liu L, He W, Zhu J, Deng K, Tan H, Xiang L, Yuan X, Li Q, Huang M, Guo Y, Yao Y, Li X, 2023, Global prevalence of congenital hypothyroidism among neonates from 1969 to 2020: a systematic review and meta-analysis, *Eur J Pediatr*, 182(7):2957-2965, doi: 10.1007/s00431-023-04932-2

Loevner LA, 1996, Imaging of the thyroid gland, *Semin Ultrasound CT MR*, 17(6):539-62, doi: 10.1016/s0887-2171(96)90003-7 (*)

Long W, Guo F, Yao R, Wang Y, Wang H, Yu B, Xue P, 2021, Genetic and Phenotypic Characteristics of Congenital Hypothyroidism in a Chinese Cohort, *Front Endocrinol (Lausanne)*, 12:705773, doi: 10.3389/fendo.2021.705773

Machinis K, Pantel J, Netchine I, Léger J, Camand OJ, Sobrier ML, Dastot-Le Moal F, Duquesnoy P, Abitbol M, Czernichow P, Amselem S, 2001, Syndromic short stature in patients with a germline mutation in the LIM homeobox LHX4, *Am J Hum Genet*, 69(5):961-8, doi: 10.1086/323764

Macholdt E, Arias L, Duong NT, Ton ND, Van Phong N, Schröder R, Pakendorf B, Van Hai N, Stoneking M, 2020, The paternal and maternal genetic history of Vietnamese populations, *Eur J Hum Genet*, 28(5):636-645, doi: 10.1038/s41431-019-0557-4

Maruo Y, Takahashi H, Soeda I, Nishikura N, Matsui K, Ota Y, Mimura Y, Mori A, Sato H, Takeuchi Y, 2008, Transient congenital hypothyroidism caused by biallelic mutations of the dual oxidase 2 gene in Japanese patients detected by a neonatal screening program, *J Clin Endocrinol Metab*, 93(11):4261-7, doi: 10.1210/jc.2008-0856

Medeiros-Neto GA, Billerbeck AE, Wajchenberg BL, Targovnik HM, 1993, Defective organification of iodide causing hereditary goitrous hypothyroidism. *Thyroid*, 3(2):143-59, doi: 10.1089/thy.1993.3.143 (*)

Mendive FM, Rivolta CM, Moya CM, Vassart G, Targovnik HM, 2001, Genomic organization of the human thyroglobulin gene: the complete intron-exon structure, *Eur J Endocrinol*, 145(4):485-96, doi: 10.1530/eje.0.1450485

Meyerhoff WL, 1979, Hypothyroidism and the ear: electrophysiological, morphological, and chemical considerations, *Laryngoscope*, 89(10 Pt 2 Suppl 19):1-25, doi: 10.1002/lary.5540891501

Morand S, Ueyama T, Tsujibe S, Saito N, Korzeniowska A, Leto TL, 2009, Duox maturation factors form cell surface complexes with Duox affecting the specificity of reactive oxygen species generation, *FASEB J*, 23(4):1205-18, doi: 10.1096/fj.08-120006 (*)

Moreno JC, Klootwijk W, van Toor H, Pinto G, D'Alessandro M, Lèger A, Goudie D, Polak M, Grütters A, Visser TJ, 2008, Mutations in the iodotyrosine deiodinase gene and hypothyroidism, *N Engl J Med.*, 358(17):1811-8, doi: 10.1056/NEJMoa0706819

Mosier HD, 1956, Hypoplasia of the pituitary and adrenal cortex; report of occurrence in twin siblings and autopsy findings, *J Pediatr*, 48(5):633-9, doi: 10.1016/s0022-3476(56)80097-8

Naafs JC, Verkerk PH, Fliers E, van Trotsenburg ASP, Zwaveling-Soonawala N, 2020, Clinical and genetic characteristics of Dutch children with central congenital hypothyroidism, early detected by neonatal screening, *Eur J Endocrinol.*, 183(6):627-636, doi: 10.1530/EJE-20-0833

Netchine I, Sobrier ML, Krude H, Schnabel D, Maghnie M, Marcos E, Duriez B, Cacheux V, Moers Av, Goossens M, Grütters A, Amselem S, 2000, Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency, *Nat Genet.*, 25(2):182-6, doi: 10.1038/76041

Online Mendelian Inheritance in Man®, 2022, <https://www.omim.org/entry/190160#9?>

Oppenheimer JH, Kinlaw WB, Wong NC, Schwartz HL, Mariash CN, 1987, Regulation of gene S-14 by triiodothyronine in liver, *Horm Metab Res Suppl*, 17:1-5 (*)

Oppenheimer JH, Schwartz HL, 1997, Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development, *Endocr Rev*, 18(4):462-75, doi: 10.1210/edrv.18.4.0309 (*)

Petitpas I, Petersen CE, Ha CE, Bhattacharya AA, Zunszain PA, Ghuman J, Bhagavan NV, Curry S, 2003, Structural basis of albumin-thyroxine interactions and familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(11):6440-5, doi: 10.1073/pnas.1137188100

Pierce JG, Parsons TF, 1981, Glycoprotein hormones: structure and function, *Annu Rev Biochem.*, 50:465-95, doi: 10.1146/annurev.bi.50.070181.002341 (*)

Prost E, Koenig RJ, Moore DD, Larsen PR, Whalen RG, 1988, Multiple sequences encoding potential thyroid hormone receptors isolated from mouse skeletal muscle cDNA libraries, *Nucleic Acids Res*, 16(13):6248, doi: 10.1093/nar/16.13.6248

Provance DW, James TL, Mercer JA, 2002, Melanophilin, the product of the leaden locus, is required for targeting of myosin-Va to melanosomes, *Traffic*, 3(2):124-32, doi: 10.1034/j.1600-0854.2002.030205.x

Razvi S, Jabbar A, Pingitore A, Danzi S, Biondi B, Klein I, Peeters R, Zaman A, Iervasi G, 2018 Thyroid Hormones and Cardiovascular Function and Diseases, *J Am Coll Cardiol*, 71(16):1781-1796, doi: 10.1016/j.jacc.2018.02.045 (*)

Rezgani I, Chihaoui M, Oueslati I, Chaker F, Nagi S, Yazidi M, 2022, Thyroid hormone resistance syndrome caused by a novel mutation in the thyroid hormone receptor-beta gene (*THRB*, GLU457LYS) treated with methimazole, *Clin Case Rep*, 10(11):e6543, doi: 10.1002/ccr3.6543

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL, 2015, ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology, *Genet Med*, 17(5):405-24, doi: 10.1038/gim.2015.30

Rihani FB, Altayeh MM, Al-Kilani RZ, Alrejfal RA, 2023, Solitary median maxillary central incisor in Kabuki syndrome 2 with novel missense mutation of *KDM6A* and *ABCC8* genes, *J Clin Pediatr Dent*, 47(2):108-116, doi: 10.22514/jocpd.2023.005

Sakai Y, Ohba K, Sasaki S, Matsushita A, Nakamura HM, Kuroda G, Tsuruya D, Yamashita M, Suda T, 2021, Impairment of the Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis Caused by Naturally Occurring *GATA2* Mutations In Vitro, *Int J Mol Sci*, 22(18):10015, doi: 10.3390/ijms221810015

Schroeder AC, Privalsky ML, 2014, Thyroid hormones, t3 and t4, in the brain, *Front Endocrinol*, 5:40, doi: 10.3389/fendo.2014.00040 (*)

Scott DA, Wang R, Kreman TM, Andrews M, McDonald JM, Bishop JR, Smith RJ, Karniski LP, Sheffield VC, 2000, Functional differences of the PDS gene product are associated with phenotypic variation in patients with Pendred syndrome and non-syndromic hearing loss (DFNB4), *Hum Mol Genet.*, 9(11):1709-15, doi: 10.1093/hmg/9.11.1709

Shang L, Huang L, Yang W, Qi C, Yang L, Xin J, Wang S, Li D, Wang B, Zeng L, Chung MC, 2019, Maternal exposure to PM2.5 may increase the risk of congenital hypothyroidism in the offspring: a national database based study in China, *BMC Public Health*, 19(1):1412, doi: 10.1186/s12889-019-7790-1

Shanholtz HJ, 2013, Congenital hypothyroidism, *J Pediatr Nurs*, 28(2):200-2, doi: 10.1016/j.pedn.2013.01.006 (*)

Sinha RA, Singh BK, Yen PM, 2018, Direct effects of thyroid hormones on hepatic lipid metabolism, *Nat Rev Endocrinol*, 14(5):259-269, doi: 10.1038/nrendo.2018.10 (*)

Sorapipatcharoen K, Tim-Aroon T, Mahachoklertwattana P, Chantratita W, Iemwimangsa N, Sensorn I, Panthan B, Jiaranai P, Noojareern S, Khlairit P, Pongratanakul S, Suprasongsin C, Korwutthikulrangsri M, Sriphrapadang C, Poomthavorn P, 2020, DUOX2 variants are a frequent cause of congenital primary hypothyroidism in Thai patients, *Endocr Connect*, 9(11):1121-1134, doi: 10.1530/EC-20-0411

Stephenson A, Punjwani Z, Eszlinger M, Sawicka B, Bossowski A, Paschke R, 2021, Report of a family with three generations of undiagnosed familial nonautoimmune hyperthyroidism, *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep*, 2021:21-0019, doi: 10.1530/EDM-21-0019

Stockigt JR, Stevens V, White EL, Barlow JW, 1983, "Unbound analog" radioimmunoassays for free thyroxin measure the albumin-bound hormone fraction, *Clin Chem*, 29(7):1408-10

Sugisawa C, Uehara E, Tanase-Nakao K, Inoue K, Iida T, Otsuka F, Suzuki N, Ohye H, Fukushima M, Matsumoto M, Yoshihara A, Watanabe N, Sugino K, Noh JY, Taniyama M, Narumi S, Ito K, 2025, Clinical and Genetic Characteristics of Adult Nonautoimmune Hypothyroidism: A Single-Institution Study, *J Clin Endocrinol Metab*, dgaf352, doi: 10.1210/clinem/dgaf352

Sun F, Zhang JX, Yang CY, Gao GQ, Zhu WB, Han B, Zhang LL, Wan YY, Ye XP, Ma YR, Zhang MM, Yang L, Zhang QY, Liu W, Guo CC, Chen G, Zhao SX, Song KY, Song HD, 2018, The genetic characteristics of congenital hypothyroidism in China by comprehensive screening of 21 candidate genes, *Eur J Endocrinol.*, 178(6):623-633, doi: 10.1530/EJE-17-1017

Sun F, Zhang RJ, Cheng F, Fang Y, Yang RM, Ye XP, Han B, Zhao SX, Dong M, Song HD, 2021, Correlation of DUOX2 residual enzymatic activity with phenotype in congenital hypothyroidism caused by biallelic DUOX2 defects, *Clin Genet*, 100(6):713-721, doi: 10.1111/cge.14065

Sunthornthepvarakul T, Angkeow P, Weiss RE, Hayashi Y, Refetoff S, 1994, An identical missense mutation in the albumin gene results in familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia in 8 unrelated families, *Biochem Biophys Res Commun*, 202(2):781-7, doi: 10.1006/bbrc.1994.1998

Szanto I, Pusztaszeri M, Mavromati M, 2019, H₂O₂ Metabolism in Normal Thyroid Cells and in Thyroid Tumorigenesis: Focus on NADPH Oxidases, *Antioxidants (Basel)*, 8(5):126, doi: 10.3390/antiox8050126 (*)

Tagami T, Kopp P, Johnson W, Arseven OK, Jameson JL, 1998, The thyroid hormone receptor variant alpha2 is a weak antagonist because it is deficient in interactions with nuclear receptor corepressors, *Endocrinology*, 139(5):2535-44, doi: 10.1210/endo.139.5.6011

Tanaka T, Aoyama K, Suzuki A, Saitoh S, Mizuno H, 2020, Clinical and genetic investigation of 136 Japanese patients with congenital hypothyroidism, *J Pediatr Endocrinol Metab*, 33(6):691-701, doi: 10.1515/jpem-2019-0433

Tanase-Nakao K, Iwahashi-Odano M, Sugisawa C, Abe K, Muroya K, Yamamoto Y, Kawada Y, Mushimoto Y, Ohkubo K, Kinjo S, Shimura K, Aoyama K, Mizuno H, Hotsubo T, Takahashi C, Isojima T, Kina Y, Takakuwa S, Hamada J, Sawaki M, Shigehara K, Sugimoto S, Etani Y, Narumi-Wakayama H, Mine Y, Hasegawa T, Hishinuma A, Narumi S, 2024, Genotype-Phenotype Correlations in 30 Japanese Patients With Congenital Hypothyroidism Attributable to TG Defects, *J Clin Endocrinol Metab*, 109(9):2358-2365, doi: 10.1210/clinem/dgae098

Tóth G, Mazák K, Hosztafi S, Kőkösi J, Noszál B, 2013, Species-specific lipophilicity of thyroid hormones and their precursors in view of their membrane transport properties, *J Pharm Biomed Anal*, 76:112-8, doi: 10.1016/j.jpba.2012.12.010

Turkkahraman D, Gullu M, Tekin S, Kalkan T, 2024, Familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia (FDH) due to Arg242 His variant in *ALB* gene in Turkish children, *J Pediatr Endocrinol Metab*, 37(6):532-535, doi: 10.1515/jpem-2023-0506

van den Hooven EH, Pierik FH, de Kluizenaar Y, Hofman A, van Ratingen SW, Zandveld PY, Russcher H, Lindemans J, Miedema HM, Steegers EA, Jaddoe VW, 2012, Air pollution exposure and markers of placental growth and function: the generation R study, *Environ Health Perspect*, 120(12):1753-9, doi: 10.1289/ehp.1204918

Vietnamplus, 2014, Inbreeding threatens survival of ethnic minority populations Dostupné z: <https://en.vietnamplus.vn/inbreeding-threatens-survival-of-ethnic-minority-populations-post50235.vnp>

Vigone MC, Fugazzola L, Zamproni I, Passoni A, Di Candia S, Chiumello G, Persani L, Weber G, 2005, Persistent mild hypothyroidism associated with novel sequence variants of the *DUOX2* gene in two siblings, *Hum Mutat*, 26(4):395, doi: 10.1002/humu.9372

Votava F, Kozich V, Pešková K, Chrastina P, Hedelová M, Vinohradská H, Friedecký D, Holubová A, Gaillyová R, 2024, Laboratory newborn screening in the Czech Republic: results in 2010-2022 period, *Česko-slovenská pediatrie*, 79:133-135, doi: 10.55095/CSPediatrie2024/022

Wang F, Zang Y, Li M, Liu W, Wang Y, Yu X, Li H, Wang F, Liu S, 2020, *DUOX2* and *DUOX2* Variants Confer Susceptibility to Thyroid Dysgenesis and Gland-*in-situ* With Congenital Hypothyroidism, *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11:237, doi: 10.3389/fendo.2020.00237

Wang H, Kong X, Pei Y, Cui X, Zhu Y, He Z, Wang Y, Zhang L, Zhuo L, Chen C, Yan X, 2020, Mutation spectrum analysis of 29 causative genes in 43 Chinese patients with congenital hypothyroidism, *Mol Med Rep*, 22(1):297-309, doi: 10.3892/mmr.2020.11078

Wang Q, Liu M, Yu Y, Li Y, 2016, Characterization and source apportionment of PM_{2.5}-bound polycyclic aromatic hydrocarbons from Shanghai city, China, *Environ Pollut*, 218:118-128, doi: 10.1016/j.envpol.2016.08.037

Williams GR, Robson H, Shalet SM, 1998, Thyroid hormone actions on cartilage and bone: interactions with other hormones at the epiphyseal plate and effects on linear growth, *J Endocrinol*, 157(3):391-403, doi: 10.1677/joe.0.1570391 (*)

Wu W, Cogan JD, Pfäffle RW, Dasen JS, Frisch H, O'Connell SM, Flynn SE, Brown MR, Mullis PE, Parks JS, Phillips JA, Rosenfeld MG, 1998, Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency, *Nat Genet.*, 18(2):147-9, doi: 10.1038/ng0298-147

Wu Y, Xu B, Koenig RJ, 2001, Thyroid hormone response element sequence and the recruitment of retinoid X receptors for thyroid hormone responsiveness, *J Biol Chem*, 276(6):3929-36, doi: 10.1074/jbc.M006743200

Yen PM, Ando S, Feng X, Liu Y, Maruvada P, Xia X, 2006, Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels, *Mol Cell Endocrinol*, 246(1-2):121-7, doi: 10.1016/j.mce.2005.11.030 (*)

Young RA, Stoffer SS, Braverman LE, 1987, Familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia associated with primary thyroid disease, *Am J Med*, 82(2):221-3, doi: 10.1016/0002-9343(87)90059-3

Zamproni I, Grasberger H, Cortinovic F, Vigone MC, Chiumello G, Mora S, Onigata K, Fugazzola L, Refetoff S, Persani L, Weber G, 2008, Biallelic inactivation of the dual oxidase maturation factor 2 (DUOXA2) gene as a novel cause of congenital hypothyroidism, *J Clin Endocrinol Metab.*, 93(2):605-10, doi: 10.1210/jc.2007-2020

Zhang HY, Wu FY, Li XS, Tu PH, Zhang CX, Yang RM, Cui RJ, Wu CY, Fang Y, Yang L, Song HD, Zhao SX, 2024, *TSHR* Variant Screening and Phenotype Analysis in 367

Chinese Patients With Congenital Hypothyroidism, *Ann Lab Med*, 44(4):343-353, doi: 10.3343/alm.2023.0337 (*)

Zhang S, Cui Y, Ma X, Yong J, Yan L, Yang M, Ren J, Tang F, Wen L, Qiao J, 2020, Single-cell transcriptomics identifies divergent developmental lineage trajectories during human pituitary development, *Nat Commun.*, 11(1):5275, doi: 10.1038/s41467-020-19012-4

Zwaveling-Soonawala N, van Trotsenburg AS, Verkerk PH, 2015, The severity of congenital hypothyroidism of central origin should not be underestimated, *J Clin Endocrinol Metab*, 100(2):E297-300, doi: 10.1210/jc.2014-2871 (*)

*označeny přehledové články a sekundární citace

Seznam tabulek a grafů

Tabulka číslo 1: Prevalence kongenitální hypotyreózy přehledově seřazena dle geografických oblastí od roku 1969 do roku 2020, data jsou dále rozřazena dle dekád, kdy v každé jednotlivé dekádě probíhaly samostatné výpočty (Liu et al. 2023).....	10
Tabulka číslo 2: Prevalence dle geografické oblasti, socioekonomického statusu, novorozeneckého screeningu a dle subtypu kongenitální hypotyreózy (Liu et al. 2023).....	11
Tabulka číslo 3: Nastavení thermocycleru pro fragmentaci DNA.....	28
Tabulka číslo 4: Nastavení thermocycleru pro Opravení konců/A-tailing.....	29
Tabulka číslo 5: Nastavení thermocycleru pro ligaci.....	30
Tabulka číslo 6: Nastavení thermocycleru pro PCR pro vzorky o objemu 50 µl.....	32
Tabulka číslo 7: Nastavení thermocycleru na program hybridizace.....	34
Tabulka číslo 8: Nastavení thermocycleru na program po zachycení PCR.....	37
Tabulka číslo 9: Nastavení termocykleru na program SEQ-ST pro enzymatickou purifikaci.....	44
Tabulka číslo 10: Nastavení termocykleru pro program SEQ-ST na sekvenování.....	45
Tabulka číslo 11: Výsledky analýzy potenciálních kandidátních genů a jejich variant způsobující onemocnění kongenitální hypotyreózu.....	48
Tabulka číslo 12: Spearmanovy korelace	61
Tabulka číslo 13: p hodnoty pro jednotlivé korelace.....	61
Tabulka číslo 14: Procentuální shodu v hodnocení pomocí AI (DiagAI Score a ACMG SeqOne) a klasickým přístupem (sloupce ClinVar, efekt) u jednotlivých variant (modře označený sloupec hodnot). Červeně označená buňka v tabulce obsahuje výslednou průměrnou shodu mezi hodnocením variant programem SeqOne a klasickým přístupem.....	63
Graf číslo 1: Graf znázorňuje procentuální podíl výskytu genetických mutací mající vliv na enzymy a transportéry, které jsou důležité pro syntézu a produkci hormonů štítné žlázy.....	58
Graf číslo 2: Jednotlivé zastoupení mutovaných genů u pacientů s kongenitální hypotyreózou, kódující enzymy a transportéry důležité pro syntézu a produkci hormonů štítné žlázy. Nejvíce zastoupeny geny z této kategorie jsou <i>DUOX2</i> a <i>TSHR</i>	59
Graf číslo 3: zobrazení zjištěných pozitivních spearmanových korelací (Heatmap).....	62

Seznam obrázků

Obrázek číslo 1: Neonatální struma (MUDr. Eva Al Taji, Ph.D. 2019 https://1url.cz/vJFDf).....	9
Obrázek číslo 2: Syntéza tyreoidálních hormonů (Szanto et al. 2019).....	18
Obrázek číslo 3: Vliv štítné žlázy na rozvoj tkání a orgánů v lidském těle (Klosinska et al. 2022)...	21
Obrázek číslo 4: Virtuální panel genů.....	31
Obrázek číslo 5: Snímek ze Sangerova sekvenování, pacient TR21/1 zdědil ve 4. exonu od otce záměnu nukleotidu adeninu (A) za nukleotid thymin (T) na pozici 341-2 v cDNA sekvenci na chromozomu 15q21.1 v genu <i>DUOXA2</i> (místo záměny označeno šipkami a červeným obdélníkem), tuto mutaci však nezdědil od matky TR21/3. Tato mutace způsobuje splicing a tvorbu nefunkčního produktu genu <i>DUOXA2</i>	53
Obrázek číslo 6: Snímek ze Sangerova sekvenování, matka pacienta TR21/3 je pozitivní na posun čtecího rámce a vytvoření tak předčasného terminačního kodónu UAG (označeno červeným kruhem) na 5. exonu na chromozomu 15q21.1, otec TR21/2 nikoli. U pacienta TR21/1 navíc byla prokázána duplikace thyminu na pozici 623.....	54
Obrázek číslo 7: schéma Kozakové sekvence (nahore referenční sekvence genu <i>POU1F1</i> a dole mutovaná pacientova TR31/1 sekvence) porovnává a názorně ukazuje mutaci, ke které v tomto vzorku došlo.....	68