

Abstrakt

Kabuki syndrom (KS) je dominantně dědičné onemocnění způsobené většinou *de novo* patogenními mutacemi v genech *KMT2D* (dříve *MLL2*) nebo *KDM6A*. Jedná se o vzácné multisystémové onemocnění charakterizované především intelektovou nedostatečností (ID – „intellectual disability“) a typickou obličejovou dysmorií. KS je klinicky velmi heterogenní, což znesnadňuje jeho klinickou diagnostiku.

Prvním cílem této dizertační práce bylo zavedení testování patogenních mutací ve dvou známých KS kauzálních genech metodou Sangerova DNA sekvenování a následně metodou MLPA (Multiple Ligation Probe Amplification) na pracovišti Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol a následně pak identifikace mutací v genech *KMT2D* či *KDM6A* u reprezentativního souboru 43 pacientů s fenotypem typickým pro KS, kteří byli indikováni k tomuto molekulárně genetickému vyšetření z několika spolupracujících genetických ambulancí v České republice. Výsledkem této studie bylo potvrzení či vyvrácení klinické diagnózy pacienta, studium spektra mutací v genech *KMT2D/KDM6A* v české populaci, korelace fenotypu s genotypem a zhodnocení využití fenotypového „MLL2-skóre“ (publikovaného Markrythanasisem et al., 2013) jakožto predikčního nástroje k selekci pacientů pro sekvenování genu *KMT2D*.

U 40% (17/43) analyzovaných pacientů s KS fenotypem byla nalezena mutace v genu *KMT2D* pomocí Sangerova DNA sekvenování, naprostá většina mutací byla protein zkracujícího typu a mutace se nacházely v různých exonech tohoto genu. Nebyla nalezena žádná mutace v genu *KDM6A*, ani žádná intragenová přestavba v žádném z obou genů pomocí metody MLPA. Rovněž nebyla nalezena korelace mezi konkrétní mutací a fenotypem studovaného onemocnění. Byla však nalezena výrazná korelace mezi fenotypem a přítomností či nepřítomností mutace v genu *KMT2D* vyjádřená pomocí „MLL2- skóre“, pacienti s patogenní mutací měli průměrné fenotypové

skóre 7,4 (rozmezí 6-9), zatímco pacienti bez mutace 5 (rozmezí 2-7). Pacienti s KS se skóre 6 a více jsou tak vhodnými kandidáty pro cílenou sekvenaci genu *KMT2D*.

Druhým cílem této práce bylo objasnit molekulárně genetickou podstatu Kabuki fenotypu u 18 pacientů bez mutace v genech *KMT2D/KDM6A* za použití metody aCGH následované sekvenováním nové generace (NGS) zacíleným na klinický exom (CES), a tak zjistit, které genomové lokusy mohou způsobovat vzácná onemocnění podobající se KS – tj. syndromy Kabuki-like (KS-like). Pouze u 18 pacientů z 26 *KMT2D/KDM6A* negativních pacientů jsme obdrželi souhlas rodičů s provedením NGS. Taktéž bylo snahou ustanovit testovací algoritmus pro pacienty s KS a KS-like fenotypy.

U 2 pacientek s KS-like fenotypem byly nalezeny kauzální genomické imbalance (Copy Number Variations – CNV) v lokusech Xp21.1-Xp21.3, respektive 14q11.2. U 4 pacientů s fenotypem KS-like byly nalezeny kauzální mutace v embryonálně exprimovaných genech, jejichž proteinové produkty se účastní regulace transkripce – gen *KMT2A*, mRNA sestřihu – gen *EFTUD2*, apoptózy – gen *HUWE1* a přenosu signálu – gen *GRIN1*. U pacientů, kteří jsou *KMT2D/KDM6A* negativní, jsou aCGH následovaná CES metodami první volby, což představuje vhodný kaskádový testovací algoritmus, jehož záchytnost v naší kohortě byla relativně vysoká – 33% (6/18 pacientů se souhlasem k vyšetření pomocí NGS). Pacienti s fenotypovým skóre 5 a nižším mohou být neprodleně indikováni k aCGH/CES testování, jelikož u této skupiny nebyla nalezena mutace v genech *KMT2D/KDM6A*.

Posledním cílem mé práce bylo testování využití CES u pacientů se vzácným onemocněním (VO) charakterizovaným syndromovou ID podobně jako u KS, ke zjištění molekulární příčiny těchto klinicky heterogenních onemocnění. U 15 z 60 testovaných pacientů byla pomocí této metody nalezena potenciálně patogenní či patogenní varianta, stanovující tak diagnostickou výtěžnost metody u syndromově asociované ID až na 25 %. V této skupině pacientů jsme diagnostikovali další dva pacienty s mutací v genu *KMT2A*, přestože

nebylo u těchto pacientů vysloveno podezření na Wiedemann-Steiner syndrom, podobně jako u pacienta s fenotypem KS-like. Dále jsme nově asociovali histonovou demetylázu kódovanou genem *KDM6B* (ze stejné genové rodiny jako gen *KDM6A*) se syndromově asociovanou ID. Identifikovali jsme dalšího pacienta s protein zkracující mutací v genu *EFTUD2* a pacientku s mutací v genu *GRIN2B*, a to ze stejné skupiny genů jako *GRIN1*. U dalších dvou pacientů byla potvrzena autozomálně recesivní (AR) dědičnost jejich ID, u dvou pacientů X-vázaná (XL – X-linked) dědičnost. Metoda CES představuje metodu s vysokým záchytem u syndromových forem ID, a může tak poskytnout rychlou diagnostiku, obzvláště pak u pacientů, kde je jejich klinický fenotyp nejednoznačný často díky variabilní klinické / věkové expresivitě jejich příznaků. Závěrem lze tedy říci, že řada pacientů se syndromově asociovanou ID má mutace v histonových metyltransferázách (obsahujících SET doménou) (*KMT2A*, *KMT2D*) a demetylázách (*KDM6A*, *KDM6B*), v genu pro spozozomální GTPázu (*EFTUD2*), v genech pro neurotransmitterové receptory aktivované glutamátem (*GRIN1*, *GRIN2B*) a v genech kódujících ubiquitin protein ligázy s HECT doménou (*HUWE1*, *HECT2*).

Klíčová slova: aCGH, *EFTUD2*, fenotypizace, *GRIN1*, *GRIN2B*, *HECT2*, *HUWE1*, intelektová nedostatečnost (ID), Kabuki syndrom, *KDM6A*, *KDM6B*, klinický exom, *KMT2A*, *KMT2D*, MLL2-skóre, MLPA, molekulární syndromologie, NGS, Sangerovo DNA sekvenování, sekvenování klinického exomu (CES), sekvenování nové generace (NGS).