

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Jana Čopíková

Molekulárně genetická vyšetření u klinicky definované skupiny pacientů se syndromovou poruchou zraku a sluchu u vzácných genetických syndromů asociovaných s hluchoslepotou v ČR a SR

Molecular genetic examinations in clinically defined group of patients with syndromic sight and hearing impairment in rare genetic disorders associated with deafblindness in the CR and SR

Disertační práce

Školitel: MUDr. Radka Kremlíková Pourová, Ph.D.

Konzultant: MUDr. Anna Křepelová, CSc.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 27. 11. 2020

JANA ČOPÍKOVÁ

.....

Podpis autora

Identifikační záznam:

ČOPÍKOVÁ, Jana. *Molekulárně genetická vyšetření u klinicky definované skupiny pacientů se syndromovou poruchou zraku a sluchu u vzácných genetických syndromů asociovaných s hluchoslepotou v ČR a SR. [Molecular Genetic examinations in clinically defined group of patients with syndromic sight and hearing impairment in rare genetic disorders associated with deafblindness in the CR and SR]*. Praha, 2020. 175 stran. 6 příloh. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol.

Školitel: MUDr. Radka Kremlíková Pourová, Ph.D.

Konzultant: MUDr. Anna Křepelová, CSc.

Poděkování:

Vypracování této práce s ohromnou podporou, trpělivostí a pozitivní energií bylo možné jenom díky mému milovanému manželovi, který mě po celou dobu této studie podporoval a žil spolu s ní, a díky našim milovaným dětem, které byly hnacím motorem k dokončení této vědecké práce. Dále bych chtěla poděkovat celé mé úžasné rodině, všem přátelům a známým za povzbuzení a podporu. Za motivaci, usměrňování a za veškerou pomoc při shromažďování výsledků prezentované v této práci bych ráda poděkovala mé školitelce MUDr. Radce Kremlíkové Pourové, Ph.D., která profesionálně podpořila tuto práci svými několikaletými zkušenostmi. Také velice děkuji mé konzultantce MUDr. Anně Křepelové, CSc., za odborné konzultace dané problematiky. Speciálně bych ráda na tomto místě také poděkovala RNDr. Anně Uhrové Mészárosové, Ph.D., za veškerou přátelskou pomoc, maximální ochotu a za cenné rady. Děkuji za skvělou spolupráci všem zainteresovaným klinickým lékařům ochotným poskytnout odbornou pomoc při přípravě klinické části této práce a článků, zejména doc. MUDr. Petře Liškové, Ph.D., a všem dalším kolegům. A také mnohokrát děkuji všem rodinám, které daly souhlas s uveřejněním fotografií. Tato disertační práce vznikla za podpory grantu GAUK 165815.

Autorka

Abstrakt

Hluchoslepota, neboli kombinované postižení, je současné poškození zraku a sluchu různého stupně s incidencí cca 1 : 8000 dětí a 1 : 5500 dospělých. Její nejčastější genetickou příčinou jsou syndromy Sticklerův (STL) a Usherův (USH).

Hlavním cílem této práce je poskytnout aktuální přehled o výskytu STL a USH v ČR a SR, upřesnění korelací genotypu s fenotypem pro naši populaci a tím diagnostických kritérií.

Pro podezření na STL jsme pomocí sekvenování a MLPA vyšetřili celkem 45 pacientů z 28 rodin. U 39 pacientů z 22 rodin jsme našli potenciálně kauzální varianty STL genů. Detekovali jsme celkem 15 různých variant (z toho 8 nových) v genu *COL2A1* u 28 pacientů z 18 rodin a 4 různé dosud nepopsané varianty v genu *COL11A1* u 11 pacientů ze 4 rodin. Příčinu onemocnění jsme objasnili u 22 rodin (79% vyšetřovaných).

Do výzkumu USH bylo zařazeno 30 pacientů z 27 rodin. Nejčastěji jsme zachytili patogenní varianty v genu *USH2A*, a to 19 variant u 14 rodin, z toho 10 popsanych a 9 nových. Dále jsme našli 6 variant (5 nových) v genu *MYO7A* (3 rodiny), 3 (2 nové) v genu *USH1C* (2 rodiny) a 3 (2 nové) v genu *CDH23* (2 rodiny). U dvou rodin byla zjištěna složená heterozygotita pro varianty ve dvou různých USH genech. Příčinu hluchoslepoty v této skupině nemocných jsme objasnili u 21 rodin (78 % vyšetřovaných).

Na základě výsledků této studie jsme postulovali zpřesněná diagnostická a indikační kritéria pro zvýšení zachytu STL a USH v ČR a SR.

Klíčová slova

COL2A1, hluchoslepota, kolagen, NGS sekvenování nové generace, odchlípení sítnice, retinitis pigmentosa, Sangerovo sekvenování, Sticklerův syndrom, USH2A, Usherův syndrom

Abstract

Deafblindness is a combined impairment of vision and hearing with an incidence of about 1: 8000 children and 1: 5500 adults. The most common genetic causes are the Stickler (STL) and Usher (USH) syndromes.

The main goal of this work is to provide an up-to-dat overview of STL and USH in the Czech and Slovak Republic (CR and SR), to determine the correlations between the genotypes and phenotype in our population and the associated diagnostic criteria.

Using sequencing and MLPA we examined 45 patients from 28 families for suspected STL. We found potentially causal variants of STL genes in 39 patients from 22 families. Fifteen different *COL2A1* variants (8 being novel) were found in 28 patients from 18 families and 4 novel *COL11A1* variants were found in 11 patients from 4 families. We identified the cause of the disease in 79% of the families.

The USH study involved 30 patients from 27 families. The most frequent cause was *USH2A* pathogenic variants, i.e. 19 variants in 14 families, 9 being novel. Less common were pathogenic variants in *MYO7A* (6 variants in 3 families, 5 being novel), *USH1C* and *CDH23* (3 variants, 2 being novel, in 2 families both) genes. In 2 families, compound heterozygosity was found for variants in two different USH genes. The deafblindness etiology was clarified for 24 patients from 78% families.

Based on the results of this study, we postulated more precise diagnostic and indication criteria for increasing STL and USH detection in the CR and SR.

Keywords

COL2A1, collagen, deafblindness, NGS next generation sequencing, retinal detachment, retinitis pigmentosa, Sanger sequencing, Stickler syndrome, USH2A, Usher syndrome

OBSAH

OBSAH	8
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	11
SEZNAM TABULEK	14
SEZNAM OBRÁZKŮ	15
SEZNAM GRAFŮ	16
SEZNAM ONLINE ZDROJŮ	17
SEZNAM PŘÍLOH	18
I. ÚVOD	19
1. VYMEZENÍ POJMU HLUCHOSLEPOTA	19
1.1 Klasifikace osob s hluchoslepotou	20
1.2 Incidence hluchoslepoty	21
1.3 Etiologie hluchoslepoty	22
1.4 Syndromová porucha zraku a sluchu - nejčastější syndromy	24
1.4.1 CHARGE syndrom.....	25
1.4.2 Alströmův syndrom	25
1.4.3 Goldenharův syndrom	26
1.4.4 Norrieho choroba	26
1.4.5 Waardenburgův syndrom	26
1.4.6 Wolframův syndrom	27
2. STICKLERŮV SYNDROM.....	28
2.1 Historická fakta	29
2.2 Prevalence a epidemiologie	30
2.3 Klinický obraz	31
2.4 Kolageny a jejich funkce	35
2.5 Klinická a molekulárně genetická klasifikace STL.....	39
2.5.1 Sticklerův syndrom typ 1	42
2.5.2 Sticklerův syndrom typ 2	46
2.5.3 OSMEDA (Sticklerův syndrom typ 3).....	47
2.5.4 Sticklerův syndrom typ 4	48
2.5.5 Sticklerův syndrom typ 5	49
2.5.6 Sticklerův syndrom asociován s mutacemi v genech COL9A3 a LOXL3.....	49
2.6 Klinická vs. molekulární diagnostika STL.....	50
2.7 Prevence a management.....	53
3. USHERŮV SYNDROM	55
3.1 Klinický obraz	56
3.2 Klinická klasifikace	59
3.2.1 Usherův syndrom typ 1 (USH1).....	61
3.2.2 Usherův syndrom typ 2 (USH2).....	61
3.2.3 Usherův syndrom typ 3 (USH3).....	62
3.3 Molekulární genetika.....	63
3.3.1 USH1 geny.....	68
3.3.2 USH2 geny.....	73
3.3.3 USH3 geny.....	76
3.4 Prognóza, terapie a diagnostika	77
II. CÍLE PRÁCE	79

III. MATERIÁL A METODY	80
1. STRATEGIE GENETICKÉHO TESTOVÁNÍ (WORKFLOW).....	80
2. SOUBOR VYŠETŘENÝCH PACIENTŮ	81
3. METODY MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ ANALÝZY	83
3.1 Izolace DNA.....	83
3.2 Sangerovo sekvenování.....	83
3.2.1 Mutační analýza genu COL2A1 pro Sticklerův syndrom	84
3.2.2 Mutační analýza genu USH2A pro Usherův syndrom	85
3.3 MLPA	86
3.4 Sekvenování nové generace (NGS)	87
3.4.1 Target enrichment, příprava knihovny a vlastní NGS sekvenování	88
3.4.2 Softwarová analýza dat	89
3.5 HaploPainter	92
IV. VÝSLEDKY	93
1. STICKLERŮV SYNDROM	93
1.1. Spektrum a frekvence kauzálních variant v COL2A1.....	95
1.2. Spektrum a frekvence kauzálních variant v COL11A1.....	95
1.3 Klinické nálezy u pacientů s COL2A1 a COL11A1 variantami	98
1.4 Klinické nálezy u pacientů bez nalezené varianty v STL genech.....	99
1.5. Nálezy rozšiřující fenotypové spektrum STL	103
1.6. Vedlejší nálezy	105
2. USHERŮV SYNDROM.....	106
2.1. Spektrum a frekvence kauzálních variant v USH2A.....	107
2.2. Spektrum a frekvence kauzálních variant v MYO7A.....	108
2.3. Spektrum a frekvence kauzálních variant v USH1C	108
2.4. Spektrum a frekvence kauzálních variant v CDH23 a PCDH15.....	108
2.5. Klinické nálezy pacientů s kauzálními variantami v USH genech	111
2.6 Klinické nálezy u pacientů bez biálelických kauzálních variant v USH genech.....	115
V. DISKUZE	116
1. STICKLERŮV SYNDROM	116
1.1. Patogenita nově nalezených variant v genu COL2A1.....	116
1.2. Patogenita nově nalezených variant v genu COL11A1.....	118
1.3. Frekvence a spektrum COL2A1 variant.....	120
1.4. Korelace genotyp-fenotyp u pacientů s COL2A1 variantami.....	120
1.5. Korelace genotyp-fenotyp u pacientů s COL11A1 variantami.....	122
1.6. Záchytnost kauzálních variant podle jednotlivých příznaků	124
1.7. Navržená indikační kritéria pro vyšetření STL v ČR	125
2. USHERŮV SYNDROM.....	127
2.1. Patogenita nově nalezených variant v genu USH2A.....	127
2.2. Patogenita nově nalezených variant v genu MYO7A.....	130
2.3. Patogenita nově nalezených variant v genu USH1C.....	132
2.4. Patogenita nově nalezených variant v genech CDH23 a PCDH15	133
2.5. Frekvence a spektrum variant v USH genech	134
2.6. Korelace genotyp-fenotyp u pacientů s USH2A variantami.....	136
2.7. Korelace genotyp-fenotyp u pacientů s USH1	137
2.8. Navržená indikační kritéria pro genetické vyšetření USH v ČR	140
VI. ZÁVĚR	141
POUŽITÁ LITERATURA	142

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAV	adeno-asociovaný virus
ACMG	American College of Medical Genetics
AD	autosomálně dominantní
ADHD	Attention Deficit Hyperactivity Disorder
ANK	ankyrin
AR	autosomálně recesivní
BERA	vyšetření kmenových evokovaných sluchových potenciálů (z angl. Brainstem evoked response audiometry)
CENT	centrální oblast (doména)
CMV	cytomegalovirus
CPAP	pozitivní tlak kontinuálně podávaný do dýchacích cest (z angl. continuous positive airway pressure)
cVEMP	cervikální vestibulární myogenní evokovaný potenciál
ČR	Česká republika
D	dědičnost
db	databáze
DK	dolní končetiny
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ExAC	Exome Aggregation Consortium (Broad Institute, USA; databáze populačních frekvencí variant; exac.broadinstitute.org/)
ERG	elektroretinografie
FACIT	kolageny asociované s fibrilami s přerušením trojšroubovice (z angl. fibril associated collagens with interrupted triple helices)
HGMD	Human Gene Mutation Database
HGVS	Human Genome Variation Society
HK	horní končetiny
KRS	kongenitální rubeolový syndrom
LamG	laminin G doména
LamNT	laminin N-terminalní doména
LORM	společnost pro hluchoslepé
LOVD	Leiden Open Variation Database
MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification

MNP	Multi Nucleotide Polymorphism
MS	Marshallův syndrom
MVP	prolaps mitrální chlopně (z angl. mitral valve prolapse)
NAS	nonsense-mediated altered splicing
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	next generation sequencing
NMD	nonsense-mediated mRNA decay
NSS	novorozenecký screening sluchu
OAE	otoakustické emise
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OSMED	otospondylomegaepifyzární dysplázie
PBM	PDZ binding motif
PCR	polymerase chain reaction
PMV	psychomotorický vývoj
PRS	Pierre-Robinova sekvence
PTC	předčasný terminační kodon (z angl. premature termination codon)
RP	retinitis pigmentosa
RPE	retinální pigmentový epitel
SAM	sterile alpha motif
SD-OCT	optická koherenční tomografie se spektrální doménou (z angl. spectral domain optical coherence tomography)
SEDC	spondyloepifyzární kongenitální dysplázie
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SR	Slovenská republika
STL	Sticklerův syndrom
TBC	tuberkulóza
tt	týden těhotenství
USH	Usherův syndrom
UZ	ultrazvuk
VNTR	variable number of tandem repeat (angl.)
EGF Lam	laminin-type EGF-like doména
FN3	fibronectin type III doména
Calx	Ca ²⁺ -binding calcium exchanger β doména

VLGR1b	very large G-coupled protein receptor isoform 1b
VUS	varianta nejasného významu (z angl. variant of unknown significance)
WES	whole exome sequencing
WGS	whole genome sequencing

SEZNAM TABULEK

- Tab. 1: Klasifikace a klinické příznaky jednotlivých typů Sticklerova syndromu.
- Tab. 2: Vybraná onemocnění způsobená poruchami genů spojených se Sticklerovým syndromem (tzv. alelické choroby).
- Tab. 3: Diagnostická kritéria pro STL podle Rose et al., 2001.
- Tab. 4: Skórovací systém podle Hoornaert et al., 2010.
- Tab. 5: Klinická klasifikace Usherova syndromu.
- Tab. 6: Molekulární klasifikace Usherova syndromu.
- Tab. 7: Složení PCR mixu.
- Tab. 8: Program pro PCR amplifikaci genu *COL2A1*.
- Tab. 9: Program pro PCR amplifikaci genu *USH2A* (všechny 3 mutační screeniny).
- Tab. 10: Seznam nalezených variant v souboru českých a slovenských pacientů se STL a jejich klinický význam.
- Tab. 11: Nalezené missense varianty u pacientů se STL a jejich *in silico* predikce.
- Tab. 12: Nalezené sestřihové varianty u pacientů se STL a jejich *in silico* predikce.
- Tab. 13: Nalezené frameshift varianty u pacientů se STL a jejich *in silico* predikce.
- Tab. 14: Klinické příznaky pacientů s fenotypem STL a detekovanými variantami v *COL2A1* genu.
- Tab. 15: Klinické příznaky pacientů s detekovanými variantami v *COL11A1* genu.
- Tab. 16: Klinické znaky u pacientů bez nálezu patogenních nebo pravděpodobně patogenních variant v genech pro STL.
- Tab. 17: Seznam nalezených variant v souboru pacientů s non-STL fenotypem a jejich *in silico* predikce.
- Tab. 18: Seznam nalezených variant v souboru českých a slovenských pacientů s USH a jejich klinický význam.
- Tab. 19: Seznam nalezených variant typu missense u pacientů s USH a jejich *in silico* predikce.
- Tab. 20: Nalezené sestřihové varianty u pacientů s USH a jejich *in silico* predikce.
- Tab. 21: Hlavní klinické příznaky u pacientů s potvrzenými variantami v genu *USH2A*.
- Tab. 22: Hlavní klinické příznaky u pacientů s potvrzenými variantami v *USH1* genech.
- Tab. 23: Hlavní klinické příznaky u pacientů s fenotypem USH bez nalezených variant.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Anomálie sklivce - „membranózní“ typ STL.

Obr. 2: Anomálie sklivce - „korálkový“ typ STL.

Obr. 3: Členové superrodiny kolagenu a jejich známé supramolekulární struktury.

Obr. 4: Grafické znázornění prokolagenu typ I (prekurzor kolagenu) s jednotlivými doménami.

Obr. 5: Schéma organizace kolagenů tvořících fibrily.

Obr. 6: Schéma odlišné exprese genu *COL2A1* v důsledku alternativního sestřihu.

Obr. 7: Schematické znázornění rozmístění exonů do jednotlivých funkčních domén v genu *COL2A1*.

Obr. 8: Fotografie sítnice pacienta s Usherovým syndromem v porovnání s normální sítnicí zdravého člověka.

Obr. 9: Tunelové vidění u pacientů s Usherovým syndromem.

Obr. 10: Přehled USH proteinů a jejich různých izoform.

Obr. 11: USH proteinový komplex.

Obr. 12: Schematické znázornění molekuly myosinu VIIA s nálezem různých typů mutací.

Obr. 13: Protein usherin.

Obr. 14: Strategie genetického testování pro STL a USH.

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Podíl nalezených kauzálních variant v genech *COL2A1* a *COL11A1* v souboru českých a slovenských pacientů.

Graf 2: Podíl jednotlivých typů *COL2A1* patogenních variant.

Graf 3: Podíl jednotlivých typů *COL11A1* patogenních variant.

Graf 4: Zastoupení jednotlivých USH genů u pacientů s klinickou diagnózou USH.

Graf 5: Spektrum nalezených patogenních variant v genu *USH2A* u pacientů s USH2.

SEZNAM ONLINE ZDROJŮ

<http://www.lorm.cz/>
<http://www.majak-no.sk/>
<http://www.sense.org.uk/>
<https://www.orpha.net/>
<http://www.sciencephoto.com/media/186032/view>
<https://databases.lovd.nl>
https://www.medicinenet.com/usher_syndrome/article.htm#what_is_usher_syndrome
<https://nethealthbook.com/eye-diseases-and-eye-related-topics/retinal-problems>
<https://www.symptomy.cz/anatomie/ucho>
<http://www.iapg.cas.cz/cs/aktuality/Genova-terapie-by-mohla-pomoci-v-lecbe-Usherova-syndromu/>
<https://sph.uth.edu/Retnet/sum-dis.htm#B-diseases>
<https://databases.lovd.nl/shared/genes/USH1C>
<https://databases.lovd.nl/shared/genes/USH2A>
<http://technelysium.com.au/wp/chromaspro/>
<http://emlpa.lf2.cuni.cz/>
<https://support.mlpa.com/>
www.nimblegene.com
www.illumina.com
http://drive5.com/usearch/manual/quality_score.html
<https://software.broadinstitute.org/gatk/>
<https://www.jsi-medisys.de/>
<http://exac.broadinstitute.org/>
<http://gnomad.broadinstitute.org/>
<http://www.internationalgenome.org/>
<https://www.omim.org/about>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/intro/>
<https://www.lovd.nl/>
<http://www.Blocks.fhcr.org/sift/SIFT.html>
<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>
<http://www.mutationtaster.org/documentation.html>
<https://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/>
<http://snps.uib.es/phd-snp/phdsnp.html>
<http://provean.jcvi.org>
<http://www.pantherdb.org/>
http://www.columbia.edu/~ii2135/information_eigen.html
<http://fathmm.biocompute.org.uk/index.html>
http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html
http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
<http://www.umd.be/HSF/>
<https://varnomen.hgvs.org>
<http://haplopainter.sourceforge.net/>
<http://www.vzacni.cz/>

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Seznam primerů pro gen *COL2A1*.

Příloha 2: Seznam primerů pro gen *USH2A*.

Příloha 3: Seznam genů NGS panelu pro hluchotu a slepotu.

Příloha 4: Kazuistiky pacientů se STL.

Příloha 5: Kazuistiky pacientů s USH.

Příloha 6: Fotografie vybraných pacientů se STL.

I. ÚVOD

1. Vymezení pojmu hluchoslepota

Hluchoslepota, neboli duální senzoričké postižení, je unikátní postižení, které vzniká kombinací poškození zraku a sluchu. Zahrnuje širokou škálu závažnosti a kombinací, od úplné nevidomosti a hluchoty až po slabozrakost a nedoslýchavost. Schopnost vidět a slyšet je hlavním zdrojem informací pro každého jednotlivce a důsledek souběhu poruch funkcí obou smyslů má zásadní dopad na život člověka a představuje speciální formu omezení. Míra postižení obou smyslů se v tomto případě nesčítá, ale násobí, neboť hluchoslepý jedinec si nemůže postižení jednoho smyslu kompenzovat smyslem druhým. Světová zdravotnická organizace (WHO) považuje hluchoslepotu za nejtěžší zdravotní postižení. Žádné jiné postižení nepřináší tolik bariér jako právě hluchoslepota. Kombinovaná porucha sluchu a zraku způsobuje extrémní těžkosti v oblasti výchovy a vzdělávání, vznikají závažné potíže v psychosociální oblasti, při komunikaci, sociální interakci s okolím, v pracovním a společenském životě, v mobilitě, v přístupu k informacím a při zajišťování vlastních životních potřeb takto postiženého člověka. Jedním z hlavních problémů hluchoslepých je jejich sociální izolace a obavy z vyloučení ze společnosti. V raném dětství v minulosti bývala často hluchoslepota zaměňována za mentální retardaci a hluchoslepý jedinec byl umístěn do neadekvátního zařízení s nevhodným použitím léčebných metod. Lidé trpící hluchoslepotou od narození se nemohou přirozenou cestou naučit mluvit (Ludíková, 2000).

V současné době není zavedena přesná definice pojmu hluchoslepota a terminologie pro skupinu osob s tímto kombinovaným postižením je poměrně komplikovaná. V České republice (ČR) zatím není legislativně ukotvena definice hluchoslepoty a v současnosti patří mezi nejfrekventovanější termíny „vícenásobné postižení“, „kombinované postižení“ a „kombinované vady“. Na tyto pojmy je nazíráno jako na synonyma a jsou také takto užívány (Ludíková, 2005). Podle o. s. LORM - Společnosti pro hluchoslepé, která je v ČR nejdéle působící organizací zabývající se problematikou hluchoslepoty, a která se také podílela na návrhu jednotné definice hluchoslepoty, je definice následující: „Hluchoslepota je jedinečné postižení dané různým stupněm souběžného poškození zraku a sluchu. Způsobuje především potíže při komunikaci, prostorové orientaci a samostatném pohybu, sebeobsluze a přístupu k informacím. Zabraňuje hluchoslepému člověku plnohodnotně se zapojit do společnosti a vyžaduje zajištění odborných služeb, kompenzačních pomůcek a úpravy prostředí.“ (LORM

Společnost pro hluchoslepé z.s. [online]. LORM: © 2015 [cit. 8.5.2020]. Dostupné z: <http://www.lorm.cz>).

Na Slovensku je používán pojem „viacnásobné postihnutie“ a „viaceré chyby“. Od roku 1997 tady funguje nezisková organizace Maják - jediné zařízení pro dospělé postižené hluchoslepotou, které definuje hluchoslepotu podle Světové federace hluchoslepých z října 2001 jako "jedinečné postižení způsobené kombinací vážného sluchového a zrakového poškození.“ (<http://www.majak-no.sk>).

Míra postižení sluchu a zraku se dá při kombinovaném postižení velmi obtížně stanovit a dochází proto velmi často k chybné diagnostice. Interdisciplinární přístup včetně odborných znalostí a dovedností (know-how), které souvisejí s hluchoslepotou, jsou potřeba pro poskytování služeb a změn v prostředí (LORM Společnost pro hluchoslepé z.s. [online]. LORM: © 2015 [cit. 8.5.2020]. Dostupné z: <http://www.lorm.cz>).

1.1 Klasifikace osob s hluchoslepotou

Jedinci s kombinovaným postižením zraku a sluchu tvoří heterogenní skupinu a proto také existuje poměrně široká škála klasifikací hluchoslepoty na základě různých kritérií. Hluchoslepoty se vyskytuje v mnoha variantách, a to v závislosti na stupni a době vzniku zrakového a sluchového postižení (Ludíková, 2001). Hluchoslepý člověk nemusí mít naprostou ztrátu obou smyslů. Do této skupiny spadají i osoby s částečnou ztrátou některého nebo obou smyslů. Postižení každého hluchoslepeho jedince je zcela individuální, závislé na době vzniku, délce projevu smyslového poškození, na jeho stupni a intelektuálních předpokladech. Dle doby vzniku postižení se může jednat o hluchoslepotu prenatální či postnatální, prelingvální nebo postlingvální. Lidé s vrozenou hluchoslepotou musí rozvíjet jazyk i přes ztrátu zraku a sluchu, zatímco u lidí se získanou hluchoslepotou je klíčové udržení jazykové schopnosti na úrovni před začátkem postižení.

Protože jsem se v této práci zaměřila na genetické příčiny hluchoslepoty, uvádím zde nejčastější klasifikaci osob s duálním postižením sluchu a zraku z hlediska stupně duálního postižení a doby, kdy k postižení obou smyslů došlo, a která byla také v této práci zohledněna.

Klasifikace dle stupně duálního postižení

- slabozraký nedoslýchavý – osoba se zbytky zraku a sluchu
- nedoslýchavý nevidomý – osoba se zbytky sluchu s totální či praktickou slepotou
- slabozraký neslyšící – osoba se zbytky zraku a totální či praktickou hluchotou
- prakticky hluchoslepý – osoba s minimálními zbytky zraku a sluchu
- totálně hluchoslepý – osoba totálně nevidomá a neslyšící

(Hlaváčová, 2007)

Klasifikace podle doby vzniku postižení

- hluchoslepí od narození čili s hluchoslepotou vrozenou
- hluchoslepí s vrozeným poškozením sluchu a s poškozením zraku získaným v pozdějším období života
- hluchoslepí s vrozeným poškozením zraku a s poškozením sluchu získaným v pozdějším období života
- hluchoslepí s poškozením zraku a sluchu získaným v pozdějším období života

(Kowalik, Baňka, 2000)

1.2 Incidence hluchoslepoty

Různé literární zdroje uvádějí, že prevalence hluchoslepoty je odhadována na 1 : 8000 dětí a 1 : 5500 dospělých. Podle průzkumu v některých rozvinutých zemích (USA, Kanada, Dánsko, Holandsko, Velká Británie) je odhadováno, že na 100 000 obyvatel připadá 40 osob postižených hluchoslepotou. Podle statistiky na základě různých průzkumu vyplývá, že 7 % z celkového počtu hluchoslepých osob tvoří osoby hluchoslepé od narození. Osoby od narození nevidomé bez poruchy sluchu při narození představují 4 % z celkového počtu hluchoslepých, od narození neslyšící bez přítomné poruchy zraku při narození 35 % a osoby narozené jako vidící a slyšící 54 % z celkového počtu osob s hluchoslepotou. Celkem tedy statisticky tvoří jedinci se získanou hluchoslepotou 93 % z celkového počtu osob s hluchoslepotou (Jakeš, 2011).

V Evropské unii žije dle různých informačních zdrojů minimálně 150 000 hluchoslepých lidí. Podle www.sense.org.uk žije jen ve Velké Británii až 390 000

hluchoslepých. Spolehlivý údaj o výskytu hluchoslepoty v ČR bohužel chybí, a přestože je výskyt vrozené hluchoslepoty v populaci poměrně vzácný, podle statistických údajů lze předpokládat, že se zde vyskytuje přibližně 4000 osob s hluchoslepotou, z toho asi 400 dětí. Občanské sdružení LORM dnes eviduje přes 225 hluchoslepých žijících v ČR. Počet jedinců postižených hluchoslepotou není znám ani na Slovensku.

1.3 Etiologie hluchoslepoty

Etiologie hluchoslepoty je značně heterogenní, a stále existuje mnoho případů, u kterých vznik hluchoslepoty není dostatečně objasněn. Zjistit konkrétní příčiny, které hluchoslepotu způsobují, je složité, zvláště pokud se jedná o kombinaci více faktorů. Existuje přes 70 známých příčin hluchoslepoty, a to získaných nebo vrozených, avšak u některých jedinců se příčiny hluchoslepoty nepodařilo doposud objasnit. Příčinou mohou být různá onemocnění, při nichž je hluchoslepotota buď dominantním znakem, nebo se může jednat o přidružený klinický příznak.

K obecným příčinám hluchoslepoty vzniklé v průběhu života patří fyziologický proces stárnutí, infekční onemocnění (meningitida), úrazy, tumory, slepota na podkladě nekompenzovaného diabetu, progresivní zrakových a sluchových vad, drogy, alkohol a vývojové malformace. K dalším příčinám patří předčasný porod, zejména porodní hmotnost pod 1500 g a následná dlouhodobá oxygenoterapie nedonošených novorozenců, traumata vyskytující se v průběhu porodu, metabolické poruchy, virové encefalitidy, intoxikace a virové onemocnění matky v průběhu těhotenství (Ludíková, 2001). Největší skupinu hluchoslepých osob tvoří lidé se získaným postižením zraku a sluchu ve vyšším věku života. Hlavními příčinami poškození zraku jsou věkem podmíněná makulární degenerace, katarakta a glaukom. Porucha sluchu ve vyšším věku se nazývá presbyakuzie, většinou je definována jako sensorineurální porucha sluchu způsobená degenerativními změnami vláskových buněk v Cortiho orgánu v důsledku dlouhodobé sluchové zátěže (Van Eyken et al., 2007).

Recentní populační studie uvádějí, že bylo identifikováno více než 30 příčin vrozené (prelingvální) hluchoslepoty (Dammeyer, 2010). K často zmiňovaným příčinám kongenitální hluchoslepoty patří **kongenitální rubeolový syndrom (KRS)**, jehož příčinou je teratogenní působení viru rubeoly (zarděnek) na plod. Vzhledem k rozsáhlému a pravidelnému očkování je nyní výskyt rubeoly, která byla jednou z hlavních příčin vrozené hluchoslepoty a

psychomotorické retardace, mimořádně vzácný. Jako další příčiny hluchoslepoty v prenatálním období lze uvést infekci cytomegalovirem (CMV), syfilis a toxoplazmózu. Při podezření, že porucha sluchu může být podmíněná kongenitální infekcí, jsou vhodné sérologické testy na CMV, toxoplazmózu a syfilis. Po zjištění poruchy zraku a sluchu je důležité zajistit pečlivou anamnézu, klinické, laboratorní a zobrazovací vyšetření včetně HRCT či MRI mozku a pokud není jasně stanovena infekční či jiná environmentální příčina, tak zejména u vrozené hluchoslepoty (či alespoň jedné její složky), je na místě indikovat genetické vyšetření.

Specifickou příčinou hluchoslepoty jsou dědičné poruchy zraku a sluchu, a to zejména Sticklerův a Usherův syndrom, na které jsem se v této studii zaměřila a které jsou blíže popsány v samostatných kapitolách 2 a 3. V literatuře bylo popsáno více než 400 syndromů s hluchotou jako jedním z hlavních symptomů, přičemž nejčastějšími jsou Usherův syndrom a Pendredův syndrom (Angeli et al., 2012). Tato skupina syndromů zahrnuje velký soubor dědičných onemocnění, u kterých je ztráta sluchu spojena s různými poruchami pohybového aparátu, kardiovaskulárního systému, urogenitálního systému, nervového systému, endokrinního systému nebo trávicího systému. Asi 40 z těchto syndromů zahrnuje oční poruchu. K často zmiňovaným syndromům asociovaných s hluchoslepotou patří syndrom CHARGE, Moebiův syndrom, Rosenbergův syndrom, Goldenharův syndrom, Alströmův syndrom a Patauův syndrom.

Poruchy v jednotlivých kauzálních genech jsou zodpovědné za přibližně 50 % sluchových defektů u novorozenců a genetická predispozice je důležitým determinantem v některých formách ztráty sluchu souvisejících s věkem. Ze všech hereditárních příčin poruchy sluchu je asi 30 % syndromových a 70 % nesyndromových (Gorlin et al., 1995).

Dřívější údaje ukazovaly, že vrozená hluchota postihuje 1/1 000 narozených dětí (Morton, 1990), a přibližně dalších 3/1 000 se narodí s určitou poruchou sluchu. Po zavedení celoplošného screeningu sluchu bylo v USA zjištěno, že vrozená hluchota se týká 1/300 narozených dětí, 1/300 má lehkou až střední poruchu sluchu a u dalšího 1 z 300 dětí se porucha sluchu projeví do věku 18 let (Schrijver, 2004). Pokud není zaveden celoplošný novorozenecký screening sluchu (NSS), zůstává cca 30 - 50 % vrozených poruch sluchu neodhalených. Na Slovensku se screening sluchu u novorozenců začal provádět v roce 1998 a v současnosti je povinný u všech novorozenců od 1. 5. 2006. Při porovnání identifikace oboustranné těžké poruchy sluchu/hluchoty před zavedením a po zavedení celoplošného screeningu sluchu novorozenců se na Slovensku odhalilo o 22,8 % více dětí s poruchou

sluchu. Po zavedení celoplošného screeningu byla porucha sluchu diagnostikována před 6. měsícem života až u 50 % pacientů, oproti pouhým 11 % případů před jeho zavedením (Jakubíková, Závodná, 2003). V ČR je provádění novorozeneckého screeningu sluchu podpořeno legislativně Metodickým pokynem k zajištění celoplošného novorozeneckého screeningu sluchu a následné péče, Věstník MZ ČR, částka 7/2012. Realitou však zůstává, že provádění screeningu sluchu se sice zlepšuje, plošný NSS však v současnosti funguje a je statisticky sledován pouze v Moravskoslezském, Královéhradeckém a Pardubickém kraji (Havlíková et al., 2015). V těchto krajích byl též zaveden screening předškolních dětí a to s velmi překvapivým výsledkem, kdy byla zachycena klinicky významná nedoslýchavost u 4 % pětiletých dětí, kdy u 0,3 % se jednalo o ztrátu oboustrannou a senzorineurální (Školoudík et al., 2018). Součástí novorozeneckého screeningu v ČR je též screening kongenitální katarakty pomocí oftalmoskopu, další oční vady nejsou předmětem novorozeneckého screeningu (Filouš et al., 2000).

Výzkum v oblasti hluchoslepoty čelí mnoha výzvám, hlavními body jsou v současné době: ustanovení přesné definice hluchoslepoty, která je dodnes nedostatečná a kde nebyla nalezena prozatím shoda, vzácnost výskytu, heterogenita populace - v důsledku které je obtížné studovat jedince s hluchoslepotou v rámci jedné skupiny, komunikační bariéry, problémy s použitím tradičních vyšetřovacích procedur a psychologických testů - protože tyto často vyžadují plné fungování obou smyslů. Důležitá je proto kooperace v rámci sběru dat - dostatečné množství vzorků, vývoj spolehlivých a platných testů a nástrojů pro hodnocení dat a rozvoj nových výzkumných metod a přístupů (Dammeyer, 2015).

1.4 Syndromová porucha zraku a sluchu - nejčastější syndromy

Syndromová ztráta zraku a sluchu se vyskytuje často v spojení s dalšími symptomy, nejčastěji malformacemi orofaciální oblasti či mozku, vrozenými vadami vnitřních orgánů bez jakékoliv zřejmé stigmatizace či poruchy fyzického a mentálního vývoje. V následujících kapitolách jsou uvedeny a blíže popsány nejčastější syndromy s duálním postižením zraku a sluchu kromě STL a USH syndromu, které jsou popsány dále v samostatných kapitolách.

1.4.1 CHARGE syndrom

Syndrom CHARGE, MIM #214800, (akronym z angl. **C**oloboma of the eye, **H**ear defects, **A**tresia of the choanae, **R**etardation of growth and/or development, **G**enital and/or urinary abnormalities, and **E**ar abnormalities) je vzácné AD onemocnění s prevalencí 1-9:100 000 obyvatel (https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=EN&Expert=138, Källén et al., 1999). Akronym CHARGE představuje soubor následujících hlavních klinických příznaků: oční kolobom a poškození kraniálních nervů, srdeční vady, atrézie choan, psychomotorická retardace (PMR) a porucha růstu, genitoureterální abnormality, anomálie zevního, středního a vnitřního ucha, a sluchového postižení. Mezi další symptomy patří orofaciální rozštěpy, problémy s polykáním a dýcháním. Na molekulární úrovni jsou nejčastější příčinou onemocnění patogenní mutace v genu *CDH7* (Lalani et al., 2006) nebo *SEMA3E* (Lalani et al., 2004). Mohou se také vyskytovat mikrolece a mikroduplikace v oblastech 7q21.11 a 8q12.1-2, kde jsou tyto geny lokalizovány (Vissers et al., 2004). Přibližně u 5 % pacientů je příčinou onemocnění mikrolece 22q11.2 (Corsten-Janssen et al., 2013).

1.4.2 Alströmvův syndrom

Jde o vzácné AR multisystémové onemocnění (MIM #203800) s prevalencí přibližně 1:1000000 v Evropě a Severní Americe. Celosvětově bylo identifikováno více než 950 případů (https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=64, cit. 13.5.2020). Pacienti jsou typicky malého vzrůstu. K hlavním klinickým příznakům syndromu patří dystrofie tyčinek, porucha sluchu, kardiomyopatie, diabetes mellitus 2. typu, obezita, hormonální a metabolické poruchy a chronické progresivní onemocnění ledvin (Marshall et al., 2015). Obvykle se jako první příznak vyskytuje v období mezi narozením a věkem 15 měsíců progresivní pigmentová retinopatie (dystrofie tyčinek a čípků), která končí slepotou. Progresivní oboustranná sensorineurální ztráta sluchu se vyskytuje v první dekádě až u 70 % jedinců, přičemž průměrný věk při detekci ztráty sluchu je sedm let (Marshall et al., 2005, Ozantürk et al., 2015, Lindsey et al., 2017). Inzulinová rezistence je obvykle doprovázena kožními změnami acanthosis nigricans. Téměř všichni pacienti vykazují hypertriglyceridémii (Paisey et al., 1993). Příčinou onemocnění je porucha v genu *ALMS1* s podílem 85 %-90 % patogenních variant (Marshall et al., 2015).

1.4.3 Goldenharův syndrom

Goldenharův syndrom (GS, MIM #164210), známý také jako hemifaciální mikrosomie nebo okulo-aurikulo-vertebrální dysplázie, je vzácné onemocnění se širokou škálou klinických projevů zahrnujících různé kraniofaciální, vertebrální, srdeční a renální anomálie, a anomálie centrálního nervového systému (Anderson, David, 2005). Nápadná asymetrie obličeje u postižených je způsobena unilaterální hypoplazií střední části obličeje. Syndrom je také asociován s malformacemi zevního a středního ucha, oka, vrozenými vývojovými vadami mozku, srdce a jiných vnitřních orgánů. Tento stav má prevalenci v rozmezí 1:3500 až 1:7 000 živě narozených dětí s poměrem mužů a žen 3:2 (Martelli et al., 2010, Kokavec, 2006). Etiologie GS zůstává neznámá. Některé případy mají AD, AR a multifaktoriální dědičnost, většina případů GS je však sporadická (De Golovine et al., 2012).

1.4.4 Norrieho choroba

Norrieho choroba (ND, MIM #310600) je X-vázaná AR porucha, která se vyznačuje velmi časnou dětskou slepotou v důsledku degenerativních a proliferačních změn retiny, kdy prvním příznakem je šedá masa za čočkou, později vzniká katarakta a dochází k atrofii bulbů. Dále se může vyskytovat nystagmus a strabismus. U ND je oboustranně přítomný pseudogliom sítnice, který je příčinou slepoty. Postižení centrální nervové soustavy se projevuje epileptickými záchvaty (Berger et al., 1992, Lomníčková, Raška, 1969). Přibližně 50 % pacientů vykazuje určitou formu progresivní duševní poruchy, často s psychotickými rysy, a přibližně u jedné třetiny pacientů se ve druhé dekádě vyvíjí senzorineurální hluchota (Berger et al., 1992). U některých pacientů s komplexnějším fenotypem se vyskytuje také mentální retardace s poruchou chování s autistickými rysy, autonomní dysfunkcí a atonickými křečemi (Collins et al., 1992). Příčinou onemocnění je defekt genu *NDP*.

1.4.5 Waardenburgův syndrom

Waardenburgův syndrom (WS, MIM #193500) je AD onemocnění s prevalencí 5-6:100 000 obyvatel (asi 5 % neslyšících) (Tamayo et al., 2008), které je charakterizováno kromě senzorineurální ztráty sluchu také poruchou pigmentace, projevující se bílým pruhem ve vlasech nebo předčasným šedivěním vlasů, častou heterochromií duhovek a typickou

stigmatizací - dystopia canthorum, hypertelorismus, epikanty a hypoplastická alae nasi (Read, Newton, 1997). Doposud byly popsány 4 typy WS, které se liší přítomností typického znaku dystopia canthorum, anomálií horních končetin a Hirsprungovy choroby. Příčinou onemocnění jsou mutace v 6 kauzálních genech: *PAX3*, *MITF*, *SNAI2*, *SOX10*, *TYR*, *EDN3* (Pingault et al., 2010).

1.4.6 Wolframův syndrom

Wolframův syndrom (WFS, MIM #222300), také známý jako DIDMOAD syndrom, je vzácná neurodegenerativní porucha zahrnující diabetes mellitus typu I (DM), diabetes insipidus (DI), hluchotu (D), atrofii optiku (OA) a další neurologické příznaky jako cerebelární ataxie, periferní neuropatie, demence a psychiatrická onemocnění (Chausseot et al., 2011, Swift et al., 1990). Prevalence onemocnění je odhadována na 1:770 000 v UK (Barrett et al., 1995) a 1:100 000 v Severní Americe (Kinsley et al., 1995). Příčinou WFS jsou AR mutace v genu *WFS1*. Protein WFS1 se podílí na funkci endoplazmatického retikula, proto se také toto onemocnění řadí mezi tzv. nemoci endoplazmatického retikula. Byly popsány celkem dva typy WFS. Typ 1 je způsoben AR mutacemi v genu *WFS1*, a obvykle nastupuje v první dekádě. Pacienti vykazují progresivní snížení zrakové ostrosti a ztrátu vidění barev. Méně časté oční abnormality zahrnují abnormální papilární světelné reflexy, nystagmus, šedý zákal, pigmentovou makulopatii, retinopatii (pigmentovou nebo diabetickou) a glaukom. Sensorineurální porucha sluchu je přítomná u přibližně 66 % jedinců s WFS, kde medián věku nástupu je 12,5 roku (Barrett et al., 1995). WFS typ 2 (WFS2, MIM #604928) je AR onemocnění způsobené bialelickými patogenními mutacemi v genu *CISD2* a v literatuře bylo popsáno jen několik případů (Rouzier et al., 2017). AD mutace v genu *WFS1* způsobují také méně časté WFS-like choroby charakterizované diabetem, nízkofrekvenční sensorineurální ztrátou sluchu, psychiatrickým onemocněním a variabilní optickou atrofií (Tranebjaerg et al., 1993).

2. Sticklerův syndrom

Sticklerův syndrom (STL) je multisystémové heterogenní onemocnění pojivové tkáně, které je jednou z nejčastějších dědičných příčin hluchoslepoty. Jde o progresivní onemocnění s neúplnou penetrancí, variabilní expresivitou a závažností. Pojmenování dostalo podle svého objevitele Gunnara B. Sticklera a je také známé pod původním názvem jako hereditární progresivní arthro-oftalmopatie. Hlavními klinickými příznaky syndromu jsou oftalmologické komplikace, zejména degenerace či odchlípení (amoce) sítnice, které jsou obvykle progresivní a mohou vést k slepotě, častým příznakem je i opticky prázdný sklivec. Z refrakčních vad je často přítomna mírná až těžká myopie, dále katarakta a glaukom. Další celkové systémové změny zahrnují orofaciální abnormality, poruchy sluchu a poruchy pohybového aparátu, které jsou spojené s kostními a kloubními abnormalitami, a které mohou skončit upoutáním pacienta na invalidní vozík. STL je obvykle diagnostikován již během dětství. Postižené děti mají charakteristické obličejové rysy - zploštělý obličej, výrazné oči, malý nos, dlouhý horní ret (philtrum) a malou ustupující bradu a často se rodí s rozštěpem patra, které může a nemusí být součástí tzv. Pierre-Robinovy sekvence (PRS), která zahrnuje kromě rozštěpu patra také glossoptózu (dopředu posunutý kořen jazyka) a velmi malou spodní čelist (mikromandibulu). Příznaky syndromu a jejich tíže jsou velmi variabilní.

Klinická heterogenita onemocnění je doprovázena genetickou heterogenitou - dodnes je známých 6 genových lokusů zodpovědných za fenotypovou variabilitu syndromu v důsledku abnormální syntézy kolagenu typu II, XI nebo IX. Nejčastější formou STL je typ 1 způsobený defektem genu *COL2A1*, který kóduje kolagen typu II, a ve kterém jsou patologické mutace detekovány u 80-90 % pacientů. STL typ 2 je druhý nejčastější typ a je zapříčiněn mutacemi v genu *COL11A1*. Mutace v genu *COL11A2* jsou asociovány se STL typu 3, který však byl podle db OMIM přejmenován na OSMEDA (Spranger, 1998, Pihlajamaa et al., 1998). Velmi vzácná AR forma STL je asociována s mutacemi v genech *COL9A1* (STL4) (Van Camp et al., 2006, Nikopoulos et al., 2011), *COL9A2* (STL5) (Baker et al., 2011) a *COL9A3* (STL6) (Faletra et al., 2014, Hanson-Kahn et al., 2018). Blíže jsou jednotlivé typy popsány v podkapitole 2.5. I když jsou přítomny všechny obvyklé symptomy tohoto onemocnění, mohou se vyskytovat mutace i v jiných genech.

STL je součástí celého komplexu chorob způsobených mutacemi v genech pro kolagen, tzv. kolagenopatie. Dokonce i různé mutace v dalších genech, které způsobují STL, mohou způsobovat mnoho dalších chorob a syndromů, které se většinou vyznačují poruchou

sluchu a těžkou růstovou retardací. Jedná se o celé spektrum poruch od platyspondylické dysplázie, která vede k perinatálním úmrtím, přes trpaslictví podobné achondroplazii, až po samotnou nesydromovou poruchu sluchu s normální postavou. STL se nachází asi uprostřed této škály.

V současnosti je diagnóza STL založená na klinickém obrazu, avšak neexistuje žádný konsenzus pro klinická diagnostická kritéria pro jednotlivé typy syndromu. Doposud neexistuje žádný lék na toto onemocnění, avšak symptomatická léčba může kontrolovat příznaky a tím sloužit jako prevence možných komplikací.

2.1 Historická fakta

Identifikace STL syndromu byla poprvé zaznamenána pediatrem Dr. Gunnarem B. Sticklerem z nadace MAYO Foundation, Minnesota, USA, který v roce 1960 vyšetřoval dvanáctiletého chlapce s těžkou progresivní myopií, amocií (odchlípením) sítnice s následnou slepotou a předčasnými degeneračními změnami kloubů. Podobné příznaky byly zaznamenány i u ostatních členů rodiny (matka chlapce byla úplně slepá), přičemž první člen rodiny s příznaky STL byl vyšetřován už v roce 1887 Dr. Charlesem Mayo. Výsledky Sticklerova bádání byly publikovány v roce 1965, kdy byl tento stav pojmenován jako hereditární progresivní arthro-ofthalmopatie, v současnosti známý jako Sticklerův syndrom. Stickler a kolegové poprvé popsali toto onemocnění ve dvou publikacích. V první (Stickler et al., 1965) popisují nový AD syndrom projevující se progresivní myopií, která nastupuje v první dekádě života a vede k odchlípení sítnice a následné slepotě. Postižené osoby také vykazovaly další přidružené systémové změny, zejména předčasné degenerativní kloubní změny s mírnou epifyzární dysplazií a kloubní hypermobilitu. Ve druhé publikaci Stickler a Pugh popsali u postiženého chlapce a jeho matky zakřivení páteře, poruchu sluchu a hypoplazii střední části obličeje jako součást syndromu (Stickler, Pugh, 1967). Opitz et al. ve své práci popsali pacienty se STL, u kterých byla přítomná PRS a spolu s Herrmannem et al. významně přispěli k charakteristice syndromu, když popsali 64 případů STL s důrazem na variabilní projevy choroby (Opitz et al., 1972, Herrmann et al., 1975). Avšak sporné zůstávalo, zda má být tento syndrom popsán jako samostatný subjekt, nebo by měl být vnímán pouze jako součást komplexního onemocnění s poruchou pojivové tkáně, kam patří Marshallův, Wagnerův a Weissenbacher-Zweymüller syndrom. V dalších publikacích, které následovaly, byly popsány další klinické znaky syndromu, které vysvětlovaly fenotypovou

inter- a intrafamiliální variabilitu syndromu. S rozvojem molekulárně genetických metod následovalo objevení lokusu pro kolagen typu II, který se hojně vyskytuje v chrupavce a v sítnici, na chromozomu 12. Právě toto pozorování vedlo Maumenee et al. k domněnce, že nejčastější příčinou STL může být defekt v genu *COL2A1*, který kóduje kolagen typu II (Maumenee, 1979). Tento poznatek byl dále potvrzen ve studiích genetických vazeb rodin se STL a pomocí analýzy DNA polymorfismů byla prokázána asociace genu *COL2A1* se syndromem v přibližně polovině sledovaných rodin (Francomano et al., 1987).

2.2 Prevalence a epidemiologie

Sticklerův syndrom patří podle Národního institutu pro zdraví (NIH) do skupiny vzácných genetických onemocnění. Postihuje rovnoměrně obě pohlaví stejně jako všechny etnické skupiny. Nejvíce je tento syndrom diagnostikován v anglicky mluvících zemích. Herrmann et al. (1975) se domnívali, že STL je nejčastější AD onemocnění pojivové tkáně na americkém středozápadě. Incidence byla stanovena na zhruba 1 : 10 000 u Kavkazské populace ve Spojených státech a STL byl označen za nejčastější dědičnou příčinu amocce sítnice a slepoty (Herrmann et al., 1975). V Evropě byl výskyt odhadnut na přibližně 1 : 7500 - 1 : 9000 (Printzlau, Andersen, 2004).

Předpokládá se ale, že frekvence výskytu tohoto onemocnění je ve skutečnosti vyšší z důvodu chybné nebo pozdní diagnostiky v důsledku klinické heterogenity onemocnění. V ČR a ani v SR dosud nejsou dostupné spolehlivé údaje ohledně výskytu STL. Přesná incidence tedy není známá, jelikož mírné formy onemocnění velmi často nelze identifikovat. Incidence recesivních typů onemocnění nebyla doposud v literatuře popsána, jedná se převážně o jednotlivé popsané rodiny. Fenotypová variabilita syndromu vede k obtížné diagnostice, v důsledku čeho je zřejmě závažně poddiagnostikován, přičemž může též dojít k chybné diagnóze včetně záměny s Marshallovým, Marfanovým či Wagnerovým syndromem.

Ačkoliv chronická bolest pohybového aparátu, amocce sítnice a ztráta sluchu mohou významně ovlivnit kvalitu života, STL nezkracuje jeho délku (Francomano, 2010).

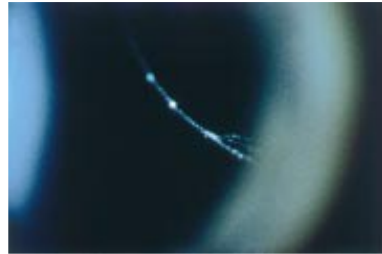
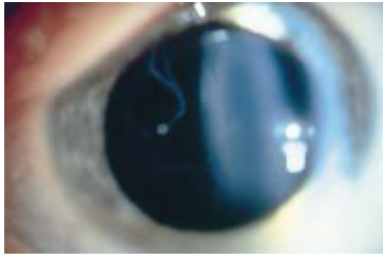
2.3 Klinický obraz

Sticklerův syndrom je multisystémové onemocnění, které se dělí se na několik podtypů (Tab. 1), které se liší klinickými příznaky a genetickou příčinou - mutacemi v jednom z genů kódujících kolagen. V klinickém obrazu převládají oftalmologické a sluchové potíže, orofaciální abnormality zahrnující rozštěp patra a poruchy kloubního aparátu. Jde o nejčastější dědičnou příčinu rhegmatogenního odchlípení sítnice v dětském věku a přestože jsou systémové příznaky velmi komplexní, zrak ohrožující komplikace jsou pravděpodobně nejnápadnější a nezávažnější (Snead, Yates, 1999). Níže uvedené klinické příznaky a symptomy se mohou lišit mezi postiženými jedinci a vykazují vysokou inter- a intrafamiliální variabilitu (Zlotogora et al., 1992).

Oční komplikace

K hlavním potížím postihujícím okulární systém patří degenerativní změny na sítnici, trhliny sítnice a její následné odchlípení, myopie, katarakta, glaukom a chronická uveitida. Tyto oční vady, pokud se včas nezachytí, mohou vést u řady pacientů až ke slepotě. STL je nejčastěji identifikovanou dědičnou příčinou odchlípení sítnice v dětství. Vitreoretinální degenerace, v důsledku které se zmenšuje zorné pole a zhoršuje vidění, způsobuje, že jednotlivci se STL jsou vystaveni riziku odchlípení sítnice, které se může objevit v každém věku a může postihnout jedno nebo obě oči. První příznaky se objevují nejčastěji v období dospívání nebo rané dospělosti, v rozmezí věku 10 - 30 let. Riziko výskytu je celoživotní, avšak pravděpodobnější u pacientů s pozitivní rodinnou anamnézou. Předpokládá se, že až 60 % pacientů se STL trpí odchlípením sítnice alespoň jednoho oka. Existuje tedy potenciální důvod pro včasnou profylaktickou intervenci u pacientů se STL s nejvyšším rizikem (Carroll et al., 2011, Temple, 1989). Léčba odchlípení sítnice u STL je velice obtížná vzhledem k četným trhlinám na sítnici a vysoké incidenci proliferativní vitreoretinopatie. Pokud se nezačne s včasnou léčbou, může dojít postupně k úplné ztrátě zraku. Patognomickým znakem syndromu je kongenitální abnormalita sklivce vzniklá v průběhu embryonálního vývoje (Snead et al., 2011), která dělí STL na dvě fenotypově rozdílné podskupiny. Většina pacientů má přítomnou charakteristickou kongenitální anomálii sklivce - tzv. „**membranózní**“ (z angl. membranous) neboli **typ 1** (Obr. 1) asociovaný s mutacemi v *COL2A1* genu u pacientů se STL typem 1, kde sklivcový gel vyplňuje retrolentální prostor a je ohraničen zřetelně svinutou membránou. V menší míře se vyskytuje u pacientů další vitreoretinální fenotyp -

tzv. „korálkový“ (z angl. beaded) neboli **typ 2** (Obr. 2) s rozptýleným a nepravidelně zahuštěným svazkem vláken skrz dutinu sklivce, který je asociován s mutacemi v *COL11A1* genu a je tedy typický pro pacienty se STL typu 2 (Snead, Yates, 1999).



Obr. 1: Anomálie sklivce „membranózní“ typ STL.

Obr. 2: Anomálie sklivce - „korálkový“ typ STL.

Převzato z: Snead, Yates, 1999.

Myopie je nejběžnější oční onemocnění s velkou variabilitou a vysokou prevalencí mezi etnickými skupinami, od 10-20 % v Africe, 30-40 % v Evropě a USA, až po 70-90 % v Asii. Je hlavní příčinou slepoty a to zejména kvůli komplikacím jako rhegmatogenní odchlípení sítnice a choroidální neovaskularizace. Mnoho pacientů se STL trpí kongenitální myopií již v raném věku, která je obvykle non-progresivní, s vysokými dioptriemi, v rozmezí -8 až -18 D. Tato refrakční vada je často asociována s astigmatizmem. Je však důležité si uvědomit, že téměř čtvrtina pacientů nevykazuje žádné významné refrakční vady a proto nemůže být jejich nepřítomnost spolehlivým diagnostickým nástrojem pro vyloučení onemocnění (Snead et al., 2011).

U mnoha postižených byla jasně popsána asociace s kongenitální kataraktou (Seery et al., 1990).

Faciální dysmorphie

Sticklerův syndrom je obvykle diagnostikován během dětství vzhledem k přítomné charakteristické faciální hypoplazii. K typickým a výrazným obličejovým rysem u dětí se STL patří hypoplazie střední části obličeje, prominující oči, malý nos a mikro/retrognácie. Tyto příznaky jsou nejvýraznější v dětství a s rostoucím věkem jsou méně vyjádřené (Snead, Yates, 1999). Až 51 % STL pacientů se narodí s tzv. Pierre-Robinovou sekvencí, která zahrnuje rozštěp patra, dopředu posunutý kořen jazyka a velmi malou spodní čelist, a může vést k problémům s dýcháním a krměním v kojeneckém věku a v extrémních případech až k zadušení (Antunes et al., 2012, Schreiner, 1973). Autoři několika studií uvádějí, že u asi 13-

35 % dětí s PRS se následně potvrdí STL (Karempelis et al., 2020, Izumi et al., 2012). Což vede k závěru, že STL by měl být zvažován u všech novorozenců s PRS, zvláště u těch s rodinnou anamnézou rozštěpu patra a u pacientů s dominantně dědičnou myopií, odchlípením sítnice, a/nebo mírnou spondyloepifyzární dysplazií (Jones et al., 2013). PRS je závažnou a život ohrožující komplikací u dětí a včasná diagnóza je nezbytná pro specializovanou léčbu, která je kritická pro prevenci nevratných následků této patologie. Rozštěp patra byl popsán podle různých studií až u 60 % postižených jedinců (Zechi-Ceide et al., 2008, Hoornaert et al., 2010). Přibližně třetina pacientů má další subtilní palatální abnormality včetně submukózních rozštěpů nebo uvula bifida (Stickler et al., 2001, Liberfarb et al., 2003).

U STL pacientů byla také popsána hypodoncie - snížený počet zubů v důsledku malerupce (chybného prořezávání) zubů a hypoplazie skloviny (Herrmann et al., 1975). Většina dětí se STL nemá dostatek prostoru pro růst plného počtu dospělých zubů kvůli abnormálně malé čelisti.

Je nutné podotknout, že všechny uvedené příznaky jsou tak variabilní, že je jako samostatný znak nelze použít v diagnostickém měřítku.

Porucha sluchu

U STL je porucha sluchu jedním z hlavních klinických příznaků. Jedná se nejčastěji o **senzorineurální ztrátu sluchu**, dále kombinovanou a převodní ztrátu sluchu, která se vyskytuje u dětí v raném věku a u pacientů s asociovaným defektem patra (Nowak, 1998, Acke et al., 2012). Určitý stupeň sluchového postižení byl nalezen až u 40 % postižených jedinců (Snead, Yates, 1999). Dle novějších poznatků je uváděné procento o něco vyšší - až 60 % pacientů se STL trpí sensorineurální poruchou sluchu (Admiraal et al., 2002, Szymko-Bennett et al., 2001). U různých typů STL existují rozdíly v prevalenci ztráty sluchu a každý z genotypů vykazuje odlišné schéma. Asi polovina pacientů s typem STL1 trpí mírnou až středně těžkou poruchou sluchu (Acke et al., 2012). U STL2 a OSMEDA (dříve STL3) typů se jedná o frekventovanou asociaci se ztrátou sluchu již v mladém věku, která je mnohem závažnější (Admiraal et al., 2002).

Ztráta sluchu může být jednostranná nebo oboustranná, částečná i úplná. Poměrně časté jsou záněty středního ucha a velká tvorba ušního mazu u postižených osob. Stupeň poruchy sluchu je variabilní a může být progresivní. Míra postižení sluchu se u postižených osob liší a může se časem zhoršovat. U pacientů se STL byla pozorována abnormální mobilita

tympanické membrány (tensor tympani) (Szymko-Bennett et al., 2001), která je tvořena vlákny kolagenu typu II. Zvuková energie absorbovaná membránou je přenášena do tří sluchových kůstek ve středoušní dutině, které jsou vzájemně kloubně spojené. Defekt kolagenu typu II přítomného v těchto spojích pravděpodobně ovlivňuje morfologii kolagenních fibril v tympanické membráně, a je asociován s převodní poruchou sluchu (Snead et al., 2011).

Patogeneze sensorineurálního poškození sluchu u pacientů se STL není přesně známa a doposud nebyly publikovány žádné radiologické a histopatologické studie temporální kosti u jednotlivců se STL (Szymko-Bennett et al., 2001).

Vzhledem k velké fenotypové variabilitě a vysoké prevalenci ztráty sluchu u pacientů se STL se doporučuje pro potvrzení diagnózy pravidelné sledování a hodnocení sluchu (Acke et al., 2012).

Poruchy pohybového aparátu

Více než 80 % dětí a dospělých s diagnózou STL trpí muskuloskeletálními poruchami, což má značný dopad na kvalitu života u těchto pacientů (Stickler et al., 2001). Příznaky zahrnují tenké končetiny se svalovou hypoplasí (často připomínající marfanoidní habitus, ačkoliv výška je u většiny pacientů normální). V klinické praxi existují velké rozdíly projevů, z nichž žádný není pro STL zcela unikátní. Téměř 90 % pacientů má abnormality páteře (zploštělé obratle, skolióza, kyfóza, jen zřídka vyžadující chirurgii) a z toho 85 % dospělých trpí také chronickou bolestí zad (Rose et al., 2001).

Některé děti mají zvětšené kloubní hlavice u dlouhých kostí v důsledku epifyzární dysplázie. Pacienti se STL mají časté degenerativní postižení kloubů, které začíná většinou jako **kloubní hypermobilita**, často vede k nestabilitě, subluxaci nebo dislokaci a část pacientů dospěje k nutnosti výměny kyčelního nebo kolenního kloubu do věku 30 let. U mladších pacientů s hypermobilitou kloubů by měla být diagnóza STL zvažována zejména při současné přítomnosti myopie či jiných očních příznaků. S přibývajícím věkem se hypermobilita redukuje nebo zcela zmizí a degenerativní artropatie s různou závažností se může rozvinout v třetí nebo čtvrté dekádě (Rai et al., 1994).

Jiné poruchy

V rozsáhlé studii Liberfarba a spol. (Liberfarb et al., 1986) byl nalezen **prolaps mitrální chlopně (MVP)** u téměř poloviny pacientů se STL, důsledkem čehož bylo

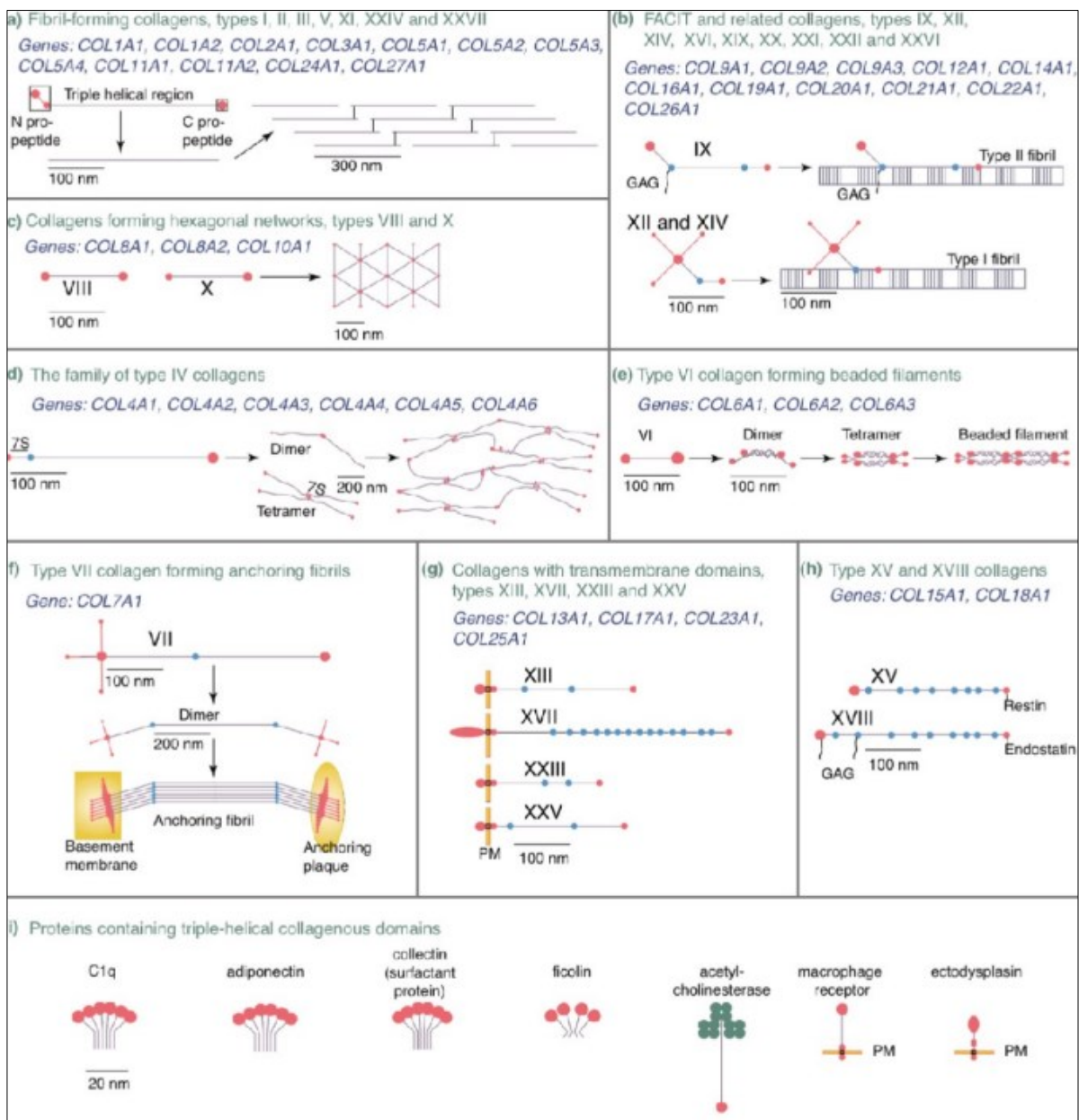
doporučeno provádění screeningu chlopenních vad (echokardiografie) a indikace antibiotické profylaxe před každým chirurgickým zákrokem u pacientů s prokázaným STL. Zvýšený výskyt MVP u pacientů se STL ve srovnání s běžnou populací však mohl odrážet vyšší míru falešně pozitivních výsledků vyplývajících z diagnostických kritérií, které byla v dané době doporučena a také je možné, že do dřívějších studií bez dostupné molekulárně genetické diagnostiky STL mohly být zahrnuty i jiná geneticky heterogenní pojivová onemocnění se zvýšeným výskytem MVP (Levine et al., 1988). Dříve uváděná zvýšená prevalence vrozených srdečních vad u pacientů se STL však byla recentně negována (Ahmad et al., 2003), což potvrzují jednoznačně i poslední studie (Poulson et al., 2004, Higuchi et al., 2017, Čopíková et al., 2020).

Epilepsie jako další z klinických příznaků STL byla poprvé publikována Savastem a spol. v roce 2015 (Savasta et al., 2015), kteří jako první popsali epilepsii u 3 dětí s abnormálním EEG a s diagnózou STL1. Nicméně, žádné další studie s výskytem epilepsie nebyly publikovány, a proto lze předpokládat, že epilepsie nepatří mezi hlavní diagnostické klinické příznaky STL a může se tedy jednat o přidruženou komplikaci anebo o jiný typ onemocnění řadící se mezi kolagenopatie, do kterých spadá rozsáhlé spektrum syndromů (viz Tab. 2) včetně Legg-Calve-Perthes syndromu, u kterého byla asociace s výskytem epilepsie popsána.

2.4 Kolageny a jejich funkce

Sticklerův syndrom patří mezi tzv. kolagenopatie a je způsoben mutacemi v genech podílejících se na tvorbě určitého typu kolagenu. Kolagen je nejhojnějším proteinem extracelulární matrix a představuje 25 - 30 % všech bílkovin v lidském těle. Je hlavním strukturálním elementem všech pojivových tkání a byl také nalezen v intersticiální tkáni prakticky všech parenchymálních orgánů, kde přispívá ke stabilitě tkání a orgánů a udržuje jejich strukturální integritu. Poznání molekulární struktury, biosyntézy, uspořádání a přeměny kolagenů je důležité pro pochopení embryonálních a fetálních vývojových procesů, stejně jako pro pochopení patologických procesů spojených s mnoha lidskými chorobami (Gelse et al., 2003). Podle několika publikovaných komplexních studií je dnes známo nejméně 29 různých kolagenů, které se navzájem liší velikostí, strukturou a funkcí, a jsou kódovány 44 různými geny (souhrn Obr. 3) (Brodsky, Persikov, 2005, Ricard-Blum, 2011), přičemž nejhojnější a nejrozsáhlejší z rodiny kolagenů s podílem 90 % jsou fibrilární kolageny, mezi

kteře patří mimo jiné také kolagen typu II. Některé typy kolagenu (konkrétně typ XVII) byly také nalezeny u zralého nervového systému, kde jsou exprimovány v neuronech (Seppänen, et al. 2007).



Obr. 3: Členové superrodiny kolagenu a jejich známé supramolekulární struktury.

Superrodina kolagenu může být rozdělena do devíti podrodin: (A) Kolageny tvořící fibrily - patří např. gen **COL2A1** (fenotyp STL1), **COL11A1** (fenotyp STL2), gen **COL11A2** (fenotyp OSMEDA - původně STL3); (B) FACIT kolageny (kolageny asociované s fibrilami s přerušením trojšroubovice patří např. gen **COL9A1** (fenotyp STL4), gen **COL9A2** (fenotyp STL5) a gen **COL9A3**; (C) kolageny tvořící hexagonální síť; (D) kolageny typu IV lokalizované na bazální membráně; (E) filamentární kolageny - kolagen typ VI; (F) kolageny tvořící ukotvující fibrily - kolagen typ VII; (G) kolageny s transmembránovou doménou; (H) kolageny obsahující endostatin - kolageny typu XV a XVIII; (I) další vysoce heterogenní skupina, která zahrnuje proteiny, které mají kolagenní domény, ale nebyly definovány jako kolageny. (Kolagenové domény jsou znázorněny fialově, N a C-

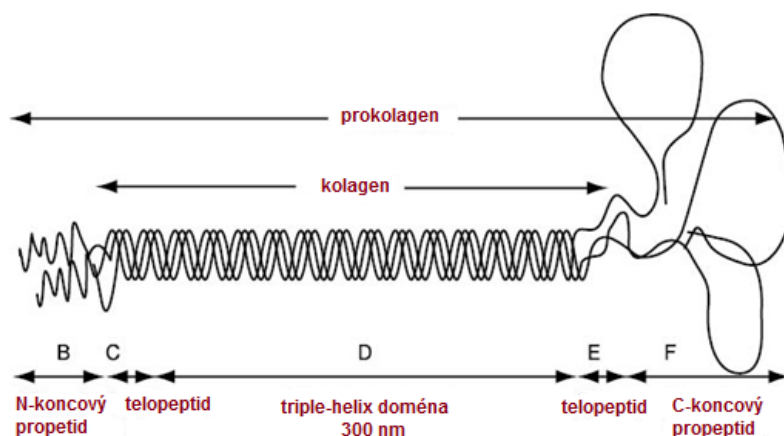
terminální non-kolagenní domény jsou v tmavě růžové a non-kolagenní domény, které přerušují trojšroubovici, jsou ve světle modré barvě).

Převzato a upraveno: Myllyharju, Kivirikko, 2004.

Z dosavadních studií je zřejmé, že kolageny hrají aktivní roli ve vývoji nervového systému a specificky v jeho formaci, nicméně jejich přesná funkce zůstává nejasná. Geny kódující kolagen se skládají z více než 50 exonů a svědčí pro to, že nynější molekula (fylogeneticky velmi stará) vznikla na podkladě zmnožení základního pragueu. Struktury shodné s kolagenem byly např. zjištěny i ve složce komplementu C1q* (Musil, 1990).

(*Pozn. autora: C1q je složkou komplexu proteinu komplementu C1, je to protein, který se účastní zahájení klasické cesty aktivace komplementu vazbou na protilátku).

I přes poměrně vysokou strukturální rozmanitost mezi jednotlivými typy kolagenu obsahují všechny kolageny charakteristickou **trojšroubovicovou doménu** (THD; triple-helical domain) složenou ze tří polypeptidových řetězců, tzv. α řetězců. Každý z těchto α řetězců v rámci molekuly formuje levotočivou závitnici. Strukturálním předpokladem pro sbalení do trojzávitnice je glycin, nejmenší AMK, v každé třetí pozici polypeptidového řetězce, což vede k vzniku struktury s $(\text{Gly-X-Y})_n$ opakováním, která charakterizuje domény všech kolagenů (Hubert et al., 2009). Kolageny obsahují nápadně mnoho glycinu (více než 30 %), dále prolin (13 %) a hydroxyprolin (9 %). Z běžných AMK není v kolagenu přítomen tryptofan a cystein. Je zajímavé, že některé AMK se na pozicích 2 a 3 nacházejí se stejnou frekvencí (isoleucin, kyselina aspartamová, alanin, serin, valin), zatímco jiné upřednostňují nebo se nacházejí výhradně v poloze 2 nebo 3. Tedy leucin, prolin, kyselina glutamová a fenylalanin se vyskytují přednostně v poloze 2, arginin, treonin, 4-hydroxyprolin a hydroxylyzin upřednostňují polohu 3 (Deyl, Adam, 1982). Glycinové zbytky, hydroxyprolin a hydroxylysin se podílejí na stabilizaci trojšroubovice (Kivirikko, 1993). Hydroxylace prolinových zbytků je důležitým předpokladem k vytvoření trojitě šroubovice, na kterou se dále připojují sacharidové zbytky (galaktosa, glukosa) a vytváří se trojitá šroubovice **prokolagenu** (Obr. 4). Jen prokolagenové molekuly, které mají toto rigidní uspořádání, mohou být buňkou vyloučeny do extracelulárního prostoru, kde probíhá odštěpení C-koncové a N-koncové části peptidového řetězce. Takto vzniklé kolagenové molekuly jsou uspořádány do kolagenových vláken (fibril). Molekulární uspořádání do fibril je následně stabilizováno vnitřním zpevněním zesíťováním, tj. tvorbou kovalentních příčných vazeb (crosslinking), které přispívají k mechanické pružnosti kolagenních fibril (Obr. 5) (Gelse et al., 2003, Karlson et al., 1987).



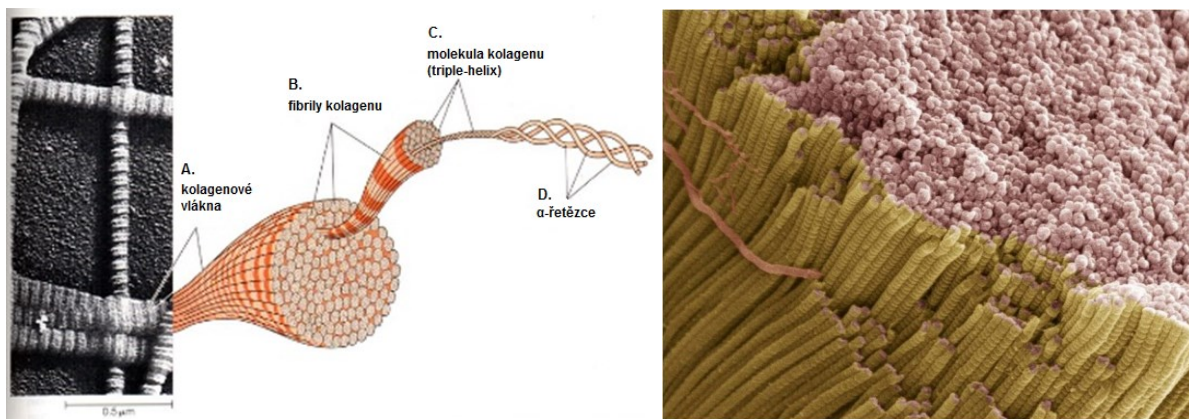
Obr. 4: Grafické znázornění prokolagenu typ I (prekurzor kolagenu) s jednotlivými doménami.

B: N-koncový propeptid; C: telopeptid; D: triple-helikální doména; E: telopeptid; F: C-koncový propeptid; C + D + E tvoří kolagen.

Převzato a upraveno: Prockop et al., 1979.

Nejhojnějším kolagenem je fibrilární kolagen, zejména kolagen typ I, který je hlavní součástí pojivové tkáně. Kolagen typu II je hojně zastoupen ve sklivci a hyalinní chrupavce. Pro každý typ kolagenu může existovat jeden nebo několik α řetězců, které se mohou skládat do homotrimerů tvořených třemi identickými řetězci (např. kolageny typu II, III, VII, X), nebo heterotrimerů, které jsou tvořeny dvěma a více různými polypeptidovými řetězci (kolageny typu I, IV, V, VI, IX a XI). To znamená, že pro definovaný typ kolagenu existují různé izoformy s odlišnými funkcemi (Hubert et al, 2009).

Biologický význam kolagenu je obrovský. Patologické a degradující formy kolagenu jsou příčinou řady nemocí pojivových tkání, které se skupinově označují jako kolagenopatie. Pro tyto choroby je charakteristické, že postihují orgány, jako jsou klouby, srdce, cévy, svaly nebo kůže. Mutace v trojšroubovicové kolagenové doméně vedou k různým onemocněním. Nejčastější mutací je jednonukleotidová substituce, která vede k záměně glycinu a tím k rozpadu opakujícího se motivu Gly-X-Y. Jednonukleotidová substituce glycinu destabilizuje trojšroubovici narušením vodíkových můstků (Brodsky, Persikov, 2005).



Obr. 5: Schéma organizace kolagenů tvořících fibrily.

- A. Kolagenová vlákna.
- B. Kolagenová vlákna obsahují mnoho fibril, každá z fibril představuje svazky molekul kolagenu, nazývané také tropokolagen.
- C. Každá molekula kolagenu představuje trojšroubovici (triple-helix), která se skládá ze
- D. tří navzájem propojených α řetězců.
- E. Kolagenová vlákna uspořádaná do fibril - znázorněno pomocí SEM (skenovací elektronový mikroskop).

Zdroj: <http://www.sciencephoto.com/media/186032/view>

Převzato a upraveno: Alberts et al. 2003.

2.5 Klinická a molekulárně genetická klasifikace STL

Klinická heterogenita onemocnění je doprovázena genetickou heterogenitou - dodnes je známo 6 genových lokusů zodpovědných za fenotypovou variabilitu syndromu. STL se dělí do několika typů podle genu, jehož mutace jsou za daný typ zodpovědné (Tab. 1). Jednotlivé typy se navzájem liší charakteristickými klinickými příznaky a symptomy, zejména přítomností konkrétních očních abnormalit a závažností ztráty sluchu. Všechny typy vykazují mendelovský typ dědičnosti, a to nejčastěji AD nebo vzácně AR.

Tab. 1: Klasifikace a klinické příznaky jednotlivých typů Sticklerova syndromu.

STL typ	Gen	Výskyt	Typ dědičnosti	Hlavní klinické příznaky
STL1	<i>COL2A1</i>	80-90 % STL	AD	myopie, odchlípení sítnice, vitreoretinální degenerace – „membranózní typ“, glaukom, katarakta, sensorineurální a/nebo převodní ztráta sluchu, hypoplazie střední části obličeje, Pierre-Robinova sekvence, rozštěp patra, mírná spondyloepifyzární dysplázie, platyspondylie, kyfóza, skolióza, časná osteoartrtida, kloubní hypermobilita
STL2	<i>COL11A1</i>	10-20 % STL	AD	myopie, odchlípení sítnice, vitreoretinální degenerace – „korálkový typ“, glaukom, katarakta, sensorineurální ztráta sluchu, hypoplázie střední části obličeje, Pierre-Robinova sekvence, rozštěp patra, mírná spondyloepifyzární dysplázie, astenické končetiny, časná osteoartrtida, kloubní hypermobilita
OSMEDA (původně STL3)	<i>COL11A2</i>	vzácný	AD	absence očních anomálií (dříve též tzv. non okulární typ STL), sensorineurální ztráta sluchu, hypoplazie střední části obličeje, Pierre-Robinova sekvence, rozštěp patra, epifyzární dysplázie, předčasná osteoartrtida, bolesti kloubů, mírná platyspondylie
STL4	<i>COL9A1</i>	1 popsaná rodina	AR	mírná až těžká myopie, astigmatismus, odchlípení sítnice, katarakta, sensorineurální ztráta sluchu, epifyzární dysplázie, platyspondylie, genu valgum
STL5	<i>COL9A2</i>	2 popsané rodiny	AR	vysoká myopie, odchlípení sítnice, vitreoretinální degenerace, katarakta, sklovitá anomálie, sensorineurální ztráta sluchu, hypoplázie střední části obličeje, malá čelist, bez kloubních příznaků
STL6	<i>COL9A3</i>	2 popsané rodiny	AR	mírná až středně těžká porucha sluchu, myopie, zploštělý obličej, mentální postižení
STL?	<i>LOXL3</i>	2 popsané rodiny	AR	vysoká myopie, malý vzrůst, periferní retinální degenerace, mírná převodní porucha sluchu, mikrognácie s rozštěpem patra, bez kloubních příznaků (RTG)

STL je příkladem lokusové heterogenity, zároveň všechny geny zodpovědné za STL vykazují značnou alelickou heterogenitu, čili mutace v těchto genech mohou být příčinou značného počtu nejrůznějších alelických poruch (Tab. 2). Jedná se o celé spektrum poruch od platyspondylické dysplázie, která vede k pre- a perinatálním úmrtím, přes trpaslictví podobné

achondroplazii, až po nesydromovou poruchu sluchu bez dalších příznaků. STL se nachází přibližně uprostřed této škály.

Tab. 2: Vybraná onemocnění způsobená poruchami genů spojených se Sticklerovým syndromem (tzv. alelické choroby).

STL typ	Název genu	D	Alelické choroby	Stručný souhrn hlavních příznaků
STL1 (AD)	COL2A1	AD	Achondrogenese typ II (ACG2), Hypochondrogenese (HCG)	závažná BD, letální prenatálně či krátce po porodu
		AD	Platyspondylická letální skeletální dysplázie, typ Luton / Torrance (PLSDT)	závažná BD s extrémním zkrácením končetin, letální, výjimečně možné přežití do dospělosti
		AD	Spondyloepifyzární kongenitální dysplázie (SEDC)	SED, myopie, RD
		AD	Spondyloepimetafyzární dysplázie, typ Strudwick (SMED)	SED, myopie, rozštěp patra, anomálie páteře
		AD	Kniestova dysplázie	BD s krátkým trupem, plochý obličej, CHL, myopie, RD, katarakta, rozštěp patra, tracheomalacie, hernie, kostní a kloubní anomálie
		AD	Spondyloperiferní dysplázie	BD se zkrácenými končetinami a SNHL
		AD	Česká dysplázie	NV, abnormity páteře, TEP kyčle v dětství, dysplázie 4-5 mekarpu/metatarsu
		AD	Mnohočetná epifyzární dysplázie s myopií a převodní ztrátou sluchu (EDMMD)	MV, CHL, myopie, katarakta, epifyzární dysplázie, brachydaktýlie
		AD	Morbus Legg-Calve-Perthes (LCPD)	LCPD, malý vzrůst, kulhání, od 6-9 let
		AD	Spondyloepifyzární dysplázie (SED), typ Stanescu	NV, ztuhlost krku a kontraktury kloubů od dětství
		AD	Osteoartritida s mírnou chondrodysplázií (OSCDP)	MV, osteoartritis od puberty
AD	Ávaskulární nekróza hlavice femuru typ 1 (ANFH1)	ANFH od 20-50 let, osteoporóza, skolióza		
STL2 (AD)	COL11A1	AR	Fibrochondrogenese 1	letální BD s rhizomelií a omfalokélou
		AD	Marshallův syndrom	velmi podobný STL, závažnější příznaky
		AD	Hluchota, autozomálně dominantní 37 (DFNA37)	mírná až střední progredující SNHL (U-audio)
STL3 * (AD)	COL11A2	AD, AR	Fibrochondrogenese 2	BD se zkrácenými končetinami a rozšířenými metafyzami, zploštělý obličej, restrikce dýchání, makrocefalie, platyspondylie, hypoplastická pánev
		AD	Hluchota, autozomálně dominantní 13 (DFNA13)	vrozená neprogredující nesyndromová SNHL s maximem ve středních frekvencích
		AR	Hluchota, autozomálně recesivní 53 (DFNB53)	těžká prelingvální SNHL, rodiče presbykuzie
		AR	Otospondylomegapifyzární dysplázie, autozomálně recesivní (OSMEDB), dříve též Weissenbacherův-Zweymüllerův syndrom	CHL nebo SNHL, SED se zvětšenými epifyzami, Pierre-Robinova sekvence, rozštěp patra, zploštělý obličej, předčasná osteoartritida, kontraktury, platyspondylie, malá akra, rekurentní pneumonie
STL4 (AR)	COL9A1	AD	Mnohočetná epifyzární dysplázie 6 (EDM6)	EDM, časná osteoartritida
STL5 (AR)	COL9A2	AD	Mnohočetná epifyzární dysplázie 2 (EDM2)	EDM, hraničně MV, kratší ruce

STL6 (AR)	<i>COL9A3</i>	AD	Mnohočetná epifyzární dysplázie 3 (EDM3) s nebo bez myopatie	EDM, osteoartritida, slabost proximálních svalů
STL ? (AR)	<i>LOXL3</i>	AR	-	-

STL - Sticklerův syndrom, AD - autozomálně dominantní, AR - autozomálně recesivní, D - dědičnost, BD - kostní dysplázie (klinicky trpaslictví s abnormitami kostí, z angl. bone dysplasia), SED - spondyloepifyzární dysplázie (klinicky trpaslictví s krátkým trupem i končetinami, s deformitami v oblasti páteře a epifýz dlouhých kostí), MV - malý vzrůst, NV - normální vzrůst, TEP - totální endoprotéza, SNHL - sensorineurální porucha sluchu (z angl. sensorineural hearing loss), CHL - převodní porucha sluchu (z angl. conductive hearing loss), RD - odchlípení sítnice.

* recentně přejmenován na OSMEDA

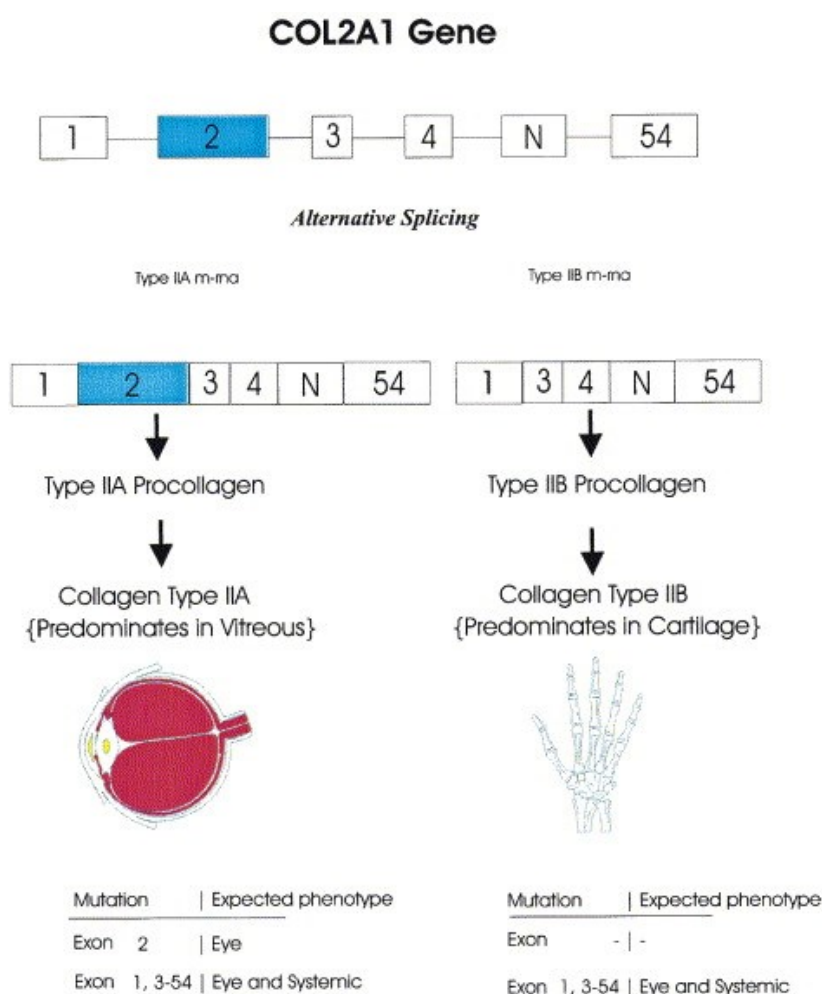
2.5.1 Sticklerův syndrom typ 1

Nejčastější formou je **STL1** (MIM #108300) typ s AD dědičností, který je způsoben defektem genu *COL2A1* (MIM +120140), ve kterém byly patogenní mutace nalezeny až u 80 % - 90 % případů s klinickou diagnózou STL (Robin et al., 2000).

Pacienti se STL1 vykazují jak extraokulární tak okulární manifestaci. K typickým příznakům patří kloubní hypermobilita, rozštěp patra, hypoplazie střední části obličeje, malá čelist a různý stupeň sluchového postižení (Baitner et al., 2000, Stickler et al., 2001), z očních komplikací je časté odchlípení sítnice, těžká myopie, rozvoj presenilní katarakty a glaukom (Snead, Yates, 1999). Typ STL1 je také charakterizován přítomností tzv. membránozní anomálie sklivce, a dělí se na dvě podskupiny: membránozní a predominantně okulární typ.

Většina dosud charakterizovaných mutací v genu *COL2A1*, které zapříčiňují STL, vede k tvorbě předčasného translačního terminačního kodonu, a tudíž k snížení množství kolagenu typu II (Annunen et al., 1999). Výsledkem mutací v genu *COL2A1* je, že buňky produkují jenom polovinu z normálního množství kolagenových řetězců. Tyto nedostatky vedou ke snížené produkci kolagenu u chrupavek a dalších tkání, ke ztrátě sluchu, degeneraci sítnice a k dalším symptomům STL. Mutace v genu *COL2A1* jsou také asociovány s obrovským rozsahem jiných fenotypových abnormalit (viz Tab. 2), a to od letálního disproportionálního trpaslictví s krátkými končetinami až po velmi mírný fenotyp s myopií a předčasnou artritidou. Specifické mutační spektrum a diverzita následků pro strukturu a funkci molekuly kolagenu typu II takto může vysvětlovat odlišnosti ve fenotypu (Godfrey, Hollister, 1988).

V některých studiích byly popsány případy STL s převažujícími očními nálezy bez klinicky zjevných systémových příznaků, zahrnujících kloubní a sluchové poruchy, nebo obličejové abnormality. Tato převážně okulární forma STL je charakterizována vrozeným abnormálním sklivcem a získanou degenerací sítnice, což může vést k odchlípení sítnice (Parma et al., 2003). Pacienti v těchto studiích měli detekovány mutace v exonu 2 genu *COL2A1*, šlo většinou o mutace vytvářející předčasný terminační kodon (PTC), a také delece a duplikace vedoucí k předčasnému terminačnímu kodonu v důsledku posunu čtecího rámce (Richards et al., 2000, Donoso et al., 2002, Parma et al., 2002, Donoso et al., 2003). Bylo prokázáno, že exon 2 genu *COL2A1* podléhá alternativnímu sestřihu a má tkáňově specifickou expresi (Obr. 6).



Obr. 6: Schéma odlišné exprese genu *COL2A1* v důsledku alternativního sestřihu.

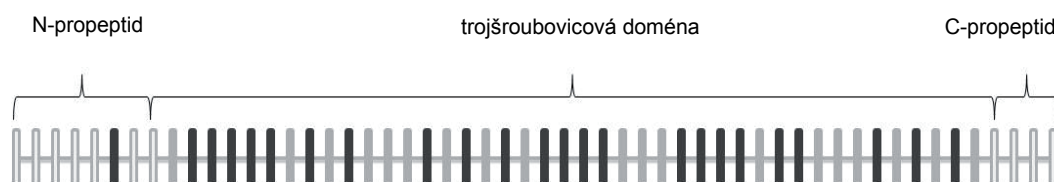
Převzato z: Donoso et al., 2003.

Kolagen typu II je syntetizován jako prokolagen a během jeho maturace dochází k odštěpování C-terminálního a N-terminálního propeptidu. N-terminální propeptid existuje ve dvou variantách (IIA a IIB), které vznikají alternativním sestřihem genu *COL2A1*. Jednotlivé formy prokolagenu se liší přítomností exonu 2 a také místem

exprese. Typ IIA obsahuje exon 2 (tzv. dlouhá izoforma) a je exprimován především chondroprogenitorovými buňkami, zatímco typ IIB (krátká izoforma) exon 2 postrádá a je exprimován diferencovanými chondrocyty (Lui et al., 1995, Ryan, Sandell, 1990, Sandell et al., 1991). Ve zdravé dospělé kloubní chrupavce není prokolagen IIA přítomen a nedochází ani k jeho expresi (Aigner et al., 1999).

Dlouhá izoforma *COL2A1* genu včetně exonu 2 je exprimována hlavně ve sklivci, avšak oba typy prokolagenu, IIA a IIB, jsou exprimovány v rané fázi vývoje (Sandell et al., 1991, Bishop et al., 1994). Proto mutace přítomné v exonu 2 mohou způsobit fenotyp STL s minimálními nebo žádnými extraokulárními projevy (Richards et al., 2000, Parma et al., 2002, Donoso et al., 2002, Donoso et al., 2003). PTC mutace jsou normálně vystaveny posttranskripčnímu procesu nonsense-mediated mRNA decay (NMD), což je kontrolní mechanismus, který selektivně degraduje mRNA, obsahující předčasně zařazený terminační kodon (Hillman et al., 2004). Bylo také zjištěno, že v důsledku PTC mutace může také dojít k vynechání exonu (exon skipping) v procesu nonsense-mediated altered splicing (NAS) (Dietz, 1997, Valentine, 1998, Cartegni et al., 2002).

Kolagen typu II je homotrimer složený z tří identických $\alpha 1(\text{II})$ řetězců, je hlavním komponentem hyalinní chrupavky, vyskytuje se přednostně v lidském sklivci, a je také exprimován v meziobratlové ploténce a vnitřním uchu (Maumenee, 1979, Vikkula et al., 1992, Oganessian et al., 1997). Je kódován genem *COL2A1*, který se nachází v lokusu 12q13.11 a sestává z 54 exonů (Obr. 7). Prvních 8 exonů kóduje tzv. signální peptidovou sekvenci (aminokyseliny 1-25) a N-propeptid (aminokyseliny 26-181). Poslední 4 exony tvoří oblast C-propeptidu (aminokyseliny 1242-1487). Exony mezi (8-51) formují THD (aminokyseliny 201-1214), přičemž každý exon začíná v první pozici aminokyselinou glycin. Pro zajímavost stojí, že všechny geny kódující tři hlavní kolageny tvořící fibrily (kolageny typu I, II a III) mají stejný počet exonů, který je stejný u člověka, kuřete a hlodavců, a svědčí pro společného předka ve vývoji struktury genu.



Obr. 7: Schematické znázornění rozmístění exonů do jednotlivých funkčních domén v genu *COL2A1*.

Převzato a upraveno podle: Hoornaert et al., 2010.

Pozoruhodným znakem 31kb dlouhého genu *COL2A1* je, že většina exonů tvořících „triple helical domain“ má délku 54 bp (černé obdélníčky), přičemž zbylé exony této domény jsou buď dvakrát nebo třikrát delší (šedé

obdélníčky = násobek 54 bp), zatímco exony tvořící terminální oblasti propeptidu mají jinou délku (bílé obdélníčky).

Všechny detekované mutace v *COL2A1* genu zapříčiňující STL jsou obvykle nukleotidové substituce, malé delece nebo inserce, a vedou k vzniku předčasného terminačního kodonu a tím k ukončení translace (Kuivaniemi et al., 1997). Mutace typu missense se vyskytují asi v 9 % případů, a většinou jde o záměnu argininu za cystein, což vede k mírnějšímu fenotypu (Husar-Memmer et al., 2013).

Podle databáze LOVD (Leiden Open Variation Database, viz 3.4.2) bylo dodnes nalezeno více než 466 mutací v genu *COL2A1* s fenotypem STL1 (<https://databases.lovd.nl>, 26.4.2020). K nejčastěji identifikovaným patří mutace typu missense/nonsense, sestřihové mutace, delece, inserce/duplikace a kompletní přestavby genu *COL2A1* (Dupont et al., 2013). Mutace jsou rozmístěny v rámci celého genu a do nedávné doby nebyly identifikovány žádné hot spoty, ačkoliv některé typy mutací, jako je záměna argininu za stop kodon, jsou rekurentní (Nishimura et al., 2005, Richards et al., 2010). Až v nejnovější studii byly hot spoty mutací vyskytujících se v genu *COL2A1* popsány. Ve vyšetřovaném souboru 663 pacientů s *COL2A1* mutacemi asociovanými s různými fenotypy (STL, Kniestova a česká dysplázie, SEDC a avaskulární nekróza hlavice femuru), se nejčastěji vyskytovaly mutace c.3106C>T (celkem 13x), c.1957C>T (celkem 12x), c.1693C>T a c.2710C>T (obě celkem 11x) (Zhang et al., 2020). *De novo* mutace byly pozorovány u pacientů s nejzávažnějšími fenotypy, zatímco familiární mutace jsou většinou spojeny s mírnějšími fenotypy (Barat-Houari et al., 2016).

Většina detekovaných mutací v genu *COL2A1* se nachází v THD a fenotypově jsou asociovány s vyšším podílem výskytu myopie, zatímco nonsense mutace mimo THD směřují k vyšší prevalenci výskytu glaukomu. To naznačuje, že mutace lokalizovaná mimo THD může způsobit různé okulární fenotypy (Zechi-Ceide et al., 2008, Barat-Houari et al., 2016). Mutace nacházející se v N- nebo C-terminální oblasti propeptidu kolagenu typu II mohou také ovlivnit tvorbu kolagenu, jsou však vzácné (Richards et al., 2002, Zankl et al., 2004, Nishimura et al., 2005, Kannu et al., 2011).

Substituce glycinu v repetici Gly-X-Y genu představuje až 34 % ze všech mutací v *COL2A1*, a představuje nejčastější typ záměny u kolagenopatií typu II. Tento typ záměny byl také popsán asi u 5 % pacientů se STL (Hoornaert et al., 2010), čili u přibližně poloviny STL pacientů s missense mutacemi v *COL2A1* (Husar-Memmer et al., 2013). Substituce glycinu v THD genu *COL2A1* vedou také u většiny popsaných mutací k fenotypu s malým vzrůstem (Hoornaert et al., 2006). Tyto záměny vyvolávají strukturální změny poloviny $\alpha 1$ řetězců vedoucích k abnormální konformaci a destabilizaci trojšroubovice. Studie z roku 2012

potvrdila zajímavou fenotypovou asociaci, a to, že pacienti se substitucí glycinu za cystein bývají vyššího vzrůstu než pacienti s jinou substitucí glycinu, zatímco pacienti se sestřihovými mutacemi jsou relativně vysoké postavy (Terhal et al., 2012).

K méně častým typům mutací patří substituce argininu za cystein, které představují odlišnou a osobitou třídu missense mutací v *COL2A1* genu a mohou vést k neobvyklým fenotypům asociovaných s normálním nebo malým vzrůstem, ale nikdy ne k závažnému a perinatálně letálnímu stavu (Hoornaert et al., 2006). Například rekurentní záměna p.(Arg275Cys) je specifická pro Českou dysplázii metatarzálního typu. Substituce argininu za cystein může být příčinou SEDC - mutace p.(Arg989Cys), ale může také vést k mírnějšímu fenotypu s artropatií jako hlavním klinickým projevem (Hoornaert et al., 2007).

Jiné typy poruch pojivové tkáně mimo STL jsou asociovány s odlišnými typy mutací v *COL2A1* genu (viz Tab. 2). Například malé in-frame delece, často mezi exony 12 a 24, vedou k fenotypu Kniestovy dysplázie (MIM #156550). Glycinové substituce na různých místech v rámci THD kolagenu vedou k dalším kolagenopatiím typu II (Spranger et al., 1994) - viz Tab. 2. Ve studii Van der Houta a spol. bylo zjištěno, že fenotyp rodiny s kompletní delecí alely *COL2A1* není odlišný od fenotypu pacientů, u kterých detekovaná mutace měla za následek zkrácení řetězců molekuly kolagenu (Van der Hout et al., 2002), pravděpodobně na podkladě mechanismu NMD. To naznačuje, že při molekulární diagnostice STL by se měl také klást větší důraz na možný výskyt rozsáhlých delecí, které nejsou běžně dostupnými PCR metodami detekovány.

2.5.2 Sticklerův syndrom typ 2

Sticklerův syndrom typ 2 (**STL2**, MIM #04841), označován také jako tzv. „koráلكový“ typ, je též AD dědičný, je zapříčiněn heterozygotními mutacemi v genu *COL11A1* (MIM *120280) a předpokládá se, že se vyskytuje u 25 % pacientů se STL. Na rozdíl od membránového sklívce STL1 typu, „koráلكový“ sklívec není vrozený. Oční nálezy u STL1 jsou často závažnější ve srovnání se STL2 (Snead, Yates, 1999). Dalším hlavním rozdílem mezi těmito dvěma typy je sluchové postižení. Pacienti se STL2 mají častěji středně těžké až těžké sluchové postižení, které je obvykle vrozené nebo diagnostikované v dětství, zatímco pacienti se STL1 mohou mít normální sluch nebo se v průběhu života může vyvinout mírná porucha sluchu (Annunen et al., 1999). Fenotypově se však jeví podobnost klinických příznaků u obou typů, a postižení pacienti mají často hypoplazii střední části obličeje, rozštěp

patra, senzorineurální ztrátu sluchu, myopii a mírnou artropatii. Podobnost fenotypů STL1 a STL2 je způsobena podobnou strukturou a funkcí genů způsobujících onemocnění, *COL2A1* a *COL11A1* (Annunen et al., 1999).

Homozygotní a složeně heterozygotní mutace v genu *COL11A1* jsou také asociované s autozomálně recesivní fibrochondrogenézou typu 1 (MIM #228520) (Tompson et al., 2010). Dále jsou heterozygotní mutace zodpovědné za AD nesyndromovou senzorineurální hluchotu typu 37 (DFNA37, MIM #618533) (Booth et al., 2019) a arthro-oftalmopatii s orofaciální, sluchovou a oční manifestací - Marshallovým syndromem (MIM #154780), jehož klinický fenotyp se překrývá s fenotypem STL (Annunen et al., 1999), viz Tab. 2. Dodnes není úplně jasné, jestli tyto dva syndromy lze oddělovat, nebo je považovat za jedno fenotypové spektrum. Pacienti s Marshallovým syndromem mají mnohem častěji malý vzrůst, méně závažné oční nálezy, předčasnou ztrátu sluchu a mnohem výraznější maxilární hypoplazii než pacienti se STL (Griffith et al., 1998, Annunen et al., 1999, Griffith et al., 2000, Poulson et al., 2004).

Kolagen typu XI je heterotrimer složený ze tří různých α řetězců - $\alpha 1(XI)$, $\alpha 2(XI)$ a $\alpha 3(XI)$, které jsou kódovány navzájem geny *COL11A1*, *COL11A2* a *COL2A1* (Eyre & Wu, 1987, Henry et al., 1988, Bernard et al., 1998). Kolagen XI se nachází hlavně ve tkáních, které exprimují kolagen II, jako je například hyalinní chrupavka a sklivec, ale je také exprimován v širokém spektru nechrupavkových tkání včetně mozku, šlach, srdeční chlopně, kůže a endochondrální kosti (Mendler et al., 1989, Nah et al., 1992). Je nezbytný pro správné sbalení proteinu, organizaci a rozvoj chrupavky (Eyre, Wu, 1987, Gregory et al., 2000). Gen *COL11A1* sestává z 68 exonů, má velikost větší než 150 kb a nachází se na chromozomu 1p21 (Henry et al., 1988, Annunen et al., 1999).

2.5.3 OSMEDA (Sticklerův syndrom typ 3)

Sticklerův syndrom typ 3 (**STL3**), tzv. non-okulární typ, je AD vzácná forma STL způsobená mutacemi v genu *COL11A2* (MIM *120290), která se nyní označuje jako **OSMEDA** (otospondylomegaepifyzární dysplázie, MIM #184840) s AD dědičností. K hlavním klinickým příznakům patří normální postava, hypoplazie střední části obličeje, rozštěp patra, senzorineurální ztráta sluchu a předčasná osteoartritida. Postižení pacienti nevykazují žádnou oční abnormalitu, což je způsobené tím, že gen *COL11A2*, který je kódován kolagenem typu XI, není exprimován v oku, protože je zde nahrazen podobným

polypeptidem, a to kolagenem typu V. Pacienti s OSMEDA nevykazují typické oční nálezy a fenotyp se projevuje pouze v systémových funkcích s vyšší prevalencí sensorineurální ztráty sluchu než u pacientů s klasickým STL (Mayne et al., 1993, Vikkula et al., 1995, Vuoristo et al., 1995). Homozygotní a složeně heterozygotní mutace v genu *COL11A2* jsou také asociované s AR otospondylomegaepifyzární dysplázií (OSMEDB, MIM #215150), fenotypově se překrývající se STL a Marshallovým syndromem (MIM #154780) (Kääriäinen et al., 1993, Vikkula et al., 1995, van Steensel et al., 1997), mutace jsou dále zodpovědné za Weissenbacherův-Zweymullerův syndrom (MIM #184840), AD nesyndromovou sensorineurální hluchotu typu 13 (DFNA13, MIM #601868) a AR nesyndromovou sensorineurální hluchotu typu 53 (DFNB53, MIM #609706), viz Tab. 2.

Gen *COL11A2* je umístěn na chromozomu 6p21.2, má velikost 28 kb, a sestává z 66 exonů. Je exprimován v chrupavce, ale ne v dospělých játrech, kůži a šlachách (Kimura et al. 1989, Vuoristo et al., 1995).

2.5.4 Sticklerův syndrom typ 4

Mutace v genu *COL9A1* (MIM *120210) jsou příčinou **STL4** (MIM #614134) s AR typem dědičnosti a vyskytují se vzácně. Poprvé byly tyto mutace identifikované a publikované u rodin se STL z Turecka a Maroka. Z popsaných klinických příznaků dominovaly u 4 z 10 sourozenců marocké rodiny tyto příznaky: proporcionálně malý vzrůst, střední až těžká sensorineurální ztráta sluchu, mírná epifyzární dysplázie viditelná na rentgenu a mírná až těžká myopie s vitreoretinopatií, která se projevovala jako opticky prázdný sklivec obsahující fibrilární kondenzáty. Sklivec však neměl podobu, která byla nalezena v případě membránového nebo korálkového typu STL. Abnormální sklivec přítomný u těchto dětí byl nejpravděpodobněji výsledkem absence kolagenu typu IX, který za normálních okolností inhibuje zkapalnění a degeneraci sklivce. Žádný z postižených sourozenců neměl odchlípení sítnice (Van Camp et al., 2006). U všech 4 postižených sourozenců byla nalezena homozygotní nonsense mutace v *COL9A1* genu. Rodiče a ostatní 4 nepostižení sourozenci byli nosiči mutace v heterozygotním stavu. Nikopoulos et al. popsali podobné klinické příznaky u dvou sester z turecké rodiny a 1 chlapce z marocké rodiny. Všichni měli přítomnou myopii, anomálii sklivce, sensorineurální ztrátu sluchu, epifyzární dysplázií a exsudativní rhegmatogenní odchlípení sítnice, přičemž jde doposud o jedinou

publikovanou studii rodiny s výskytem odchlípení sítnice asociované s AR typem STL4 (Nikopoulos et al., 2011).

Gen *COL9A1* se nachází na chromosomu 6q13, sestává z 38 exonů a kóduje jeden ze tří alfa řetězců kolagenu typu IX ($\alpha 1(\text{IX})$, $\alpha 2(\text{IX})$, $\alpha 3(\text{IX})$), který je minoritní (5-20 %) kolagenovou složkou hyalinní chrupavky. Kolagen typu IX se obvykle nachází v tkáních obsahujících kolagen typu II, fibrilární kolagen. Studie u knockout myši ukázaly, že syntéza alfa 1 řetězce je nezbytná pro sestavení heterotrimerní molekuly kolagenu typu IX, a že nedostatek kolagenu typu IX je spojen s časným nástupem osteoartritidy. Kolagen typu IX je také exprimován v tektoriální membráně a v kochle vnitřního ucha (Thalmann, 1993). Mutace v tomto genu jsou asociovány také s osteoartritidou u lidí, s mnohočetnou epifyzární dysplázií typu 6 (EDM6, MIM #614135) a určitou formou chondrodysplázie - viz Tab. 2.

2.5.5 Sticklerův syndrom typ 5

STL5 (MIM #614284) typ s AR typem dědičnosti je způsoben mutacemi v genu *COL9A2* (MIM *120260) genu a byl popsán Bakerem et al. u jedné velké 5-generační indické rodiny (Baker et al., 2011). Postižení členové vykazovali těžkou myopii, vitreoretinální degeneraci, odchlípení sítnice a mírnou sensorineurální ztrátu sluchu. Žádný z rodinných příslušníků neměl rozštěp patra, i přes malý vzrůst v dětství, výška v dospělosti odpovídala zbytku rodiny. U dvou postižených sourozenců byla identifikována homozygotní 8 bp delece, která byla přítomná v heterozygotní konstituci u nepostiženého bratra a rodičů.

Gen *COL9A2* je lokalizován na chromozomu 1p34.2 a obsahuje 32 exonů. Mutace v tomto genu jsou také asociovány s mnohočetnou epifyzární dysplázií EDM2 (MIM #600204) - viz Tab. 2.

2.5.6 Sticklerův syndrom asociován s mutacemi v genech *COL9A3* a *LOXL3*

Mutace v genu *COL9A3* (MIM *120270) jsou zodpovědné za **STL6**. Poprvé byly popsány u 3 bratrů z marocké rodiny s klinickými příznaky STL – mírnou sensorineurální ztrátou sluchu, nespecifickými metakarpálními a femorálními změnami epifýz a mentálním postižením. Žádné vitreoretinální abnormality nebyly u těchto postižených detekovány (Faletra et al., 2014). Hanson-Kahn a spol. publikovali v roce 2018 druhý případ AR výskytu STL způsobeného mutací v genu *COL9A3* (Hanson-Kahn et al., 2014). Klinické příznaky

byly podobné dříve popsanému případu a zahrnovaly mírnou až středně těžkou sensorineurální ztrátu sluchu, vysokou myopií, a vrozeně šavlovité tibie a femury. Gen *COL9A3* je lokalizován na chromozomu 20q13.33 a obsahuje 33 exonů.

Nedávno objevený nový kandidátní gen *LOXL3* (MIM *607163) je pravděpodobně zodpovědný za novou, avšak poměrně vzácnou AR formu STL. Gen *LOXL3* kóduje enzym lysyl oxidázu, která se účastní procesu zesíťování kolagenu a elastinu v pojivové tkáni. Mutace v exonu 12 c.2027G>A (p.Cys676Tyr) byla poprvé nalezena pomocí exomového sekvenování u 2 sourozenců ze Saudské Arábie s těžkou myopií, mikrognácií s rozštěpem patra a mírnou převodní ztrátou sluchu (Alzahrani et al., 2015). Dalším publikovaným případem je nález mutace c.1036C>T p.(Arg346Trp) v *LOXL3* genu v homozygotní konstituci u dítěte a jeho otce s těžkou myopií a malým vzrůstem (Chan et al., 2019).

2.6 Klinická vs. molekulární diagnostika STL

Pro STL bylo navrženo několik schémat diagnostických kritérií, avšak dosud neexistuje žádný konsenzus pro klinická diagnostická kritéria pro jednotlivé typy syndromu.

Diagnóza STL se podle **Sneada a Yatese** (Snead a Yates, 1999) zohledňovala: a) u novorozenců s PRS, b) u kojenců se spondyloepifyzární dysplázií asociovanou s myopií nebo hluchotou, c) u pacientů s pozitivní rodinnou anamnézou výskytu rhegmatogenního odchlípení sítnice, a d) u sporadických případů odchlípení sítnice spojené s kloubní hypermobilitou, rozštěpy rtů a patra anebo hluchotou. Avšak tato kritéria nebyla dostačující, protože se zakládala na souborech pacientů diagnostikovaných pouze na základě klinického vyšetření, bez možnosti molekulárně genetického potvrzení.

Další diagnostická kritéria pro Sticklerův syndrom byla formulována o rok později (Robin et al, 2000) a zahrnovala i první skórovací systém, který se stal jedním ze základů indikačních kritérií pro naši studii:

1. Orofaciální abnormality (2 body):

- rozštěp patra (otevřený rozštěp, submukózní rozštěp, uvula bifida): majoritní klinický příznak, 2 body
- charakteristické faciální abnormality (malární hypoplazie, široký nebo plochý kořen nosu, mikro/retro-gnácie): 1 bod

2. Oční abnormality (2 body maximum):

- charakteristické retinální abnormality (trhliny na sítnici, odchlípení sítnice): majoritní klinický příznak, 2 body

3. Sluchové postižení (2 body maximum):

- vysokofrekvenční sensorineurální porucha sluchu: majoritní klinický příznak, 2 body

věk < 20 let: ztráta ≥ 20 dB při 4-8 kHz

věk 20-40 let: ztráta ≥ 30 dB při 4-8 kHz

věk > 40 let: ztráta ≥ 40 dB při 4-8 kHz

- hypermobilní tympanická membrána: 1 bod

4. Skeletální abnormality (2 body maximum):

- abnormality kyčelního kloubu: 1 bod

- osteoartrtida před dosáhnutím 40 let: 1 bod

- skolióza, spondylolistéza, kyfotické deformity, kloubní hypermobilita: 1 bod

5. Rodinná anamnéza/molekulární data: (neplatí pro rodiny s AR STL)

- postižený příbuzný prvního stupně s nálezem AD mutace v *COL2A1*, *COL11A1* nebo *COL11A2* genu asociované se STL: 1 bod

Diagnóza Sticklerova syndromu byla stanovena při dosažení:

≥ 5 bodů + ≥ 1 majoritní klinický příznak s 2-bodovým ohodnocením

+ absence klinických příznaků naznačujících závažnější skeletální dysplázii nebo jiný syndrom.

Liberfarb a spol. navrhli pro stanovení diagnózy STL vlastní bodový systém (Liberfarb et al., 2003). Dva body se udělují za přítomnost každého z následujících nálezů: rozštěp patra, odchlípení sítnice a sensorineurální ztráta sluchu. Jeden bod se uděluje za charakteristickou faciální hypoplazii, hypermobilní tympanické membrány, pozitivní rodinnou anamnézu, opožděnou osifikaci hlavice femuru, radiograficky prokázanou osteoartrtidu před dovršením 40 let, deformity páteře, a identifikaci kauzální mutace. Pro stanovení diagnózy STL je nezbytné skóre 5. Liberfarb a spolupracovníci takto publikovali 25 subjektů s molekulárním potvrzením mutací v *COL2A1* genu, z nichž všechny splnily tato diagnostická kritéria s průměrným diagnostickým skóre 7,3 z možných 9.

Rose a spol. (Rose et al., 2001, 2005) navrhli diagnostická kritéria založená na klinickém hodnocení údajů u pacientů vyšetřených v Národním institutu pro zdraví (Bethesda, Maryland), u nichž byla klinická diagnóza STL molekulárně geneticky potvrzena nálezem specifických mutací v *COL2A1* genu (Tab. 3).

Tab. 3: Diagnostická kritéria pro STL podle Rose a spol. (Rose et al., 2001).

Převzato z: Rose et al., 2001

Major	Minor
Vitreoretinal degeneration ¹ Cleft palate/bifid uvula	Myopia ≥ -5 diopters Degenerative joint disease onset ≤ 40 years
High frequency hearing loss ² Typical hip anomaly ³	Joint laxity Typical facies ⁴ Positive family history ⁵

Diagnostic criteria for Stickler syndrome used in this study. All patients met at least three criteria with at least one major manifestation. These are not validated for the diagnosis of Stickler syndrome but are under evaluation for this purpose.

¹ Includes juvenile vitreous degeneration and spontaneous retinal detachment.

² Threshold ≥ 40 db at 6 khz.

³ Slipped capital femoral epiphysis or Legg-Perthes like disease.

⁴ Malar hypoplasia, enophthalmos, flat facial profile, micro/retrognathia.

⁵ At least one first degree relative who independently meets diagnostic criteria in a pattern consistent with autosomal dominant inheritance.

Hoornaert a spol. (Hoornaert et al., 2010) vyvinuli tzv. "scoring system" na základě binární regresní analýzy. Parametry a jim přiřazené hodnoty, které byly hodnoceny v tomto modelu, zahrnovaly: abnormality sklivce, abnormality sítnice, plochý obličej, mikrognácii, odchlípení sítnice, kataraktu, nízký nosní můstek, rozštěp patra, pozitivní rodinnou historii, myopii, převodní ztrátu sluchu, předčasnou artropatii, hypermobilitu, epifyzární dysplázii a sensorineurální ztrátu sluchu.

Tab. 4: Skórovací systém podle Hoornaerta a spol. (Hoornaert et al., 2010).

Převzato z Hoornaert et al., 2010.

Characteristics	Score
Retinal abnormalities	5
Positive family history	5
Vitreous abnormalities	4
Cleft palate	4
Retinal tear and/or detachment	3
Low nasal bridge	1
Micrognathia	1
Total score	23

Na základě regresního koeficientu každé rozlišovací charakteristiky byl navržen specifický bodovací systém. Nejvyšší skóre (skóre 5) bylo přičítáno abnormalitám sítnice a pozitivní rodinné anamnéze, skóre 4 bylo přiřazeno rozštěpům patra a abnormalitám sklivce, odchlípení sítnice představovalo skóre 3, zatímco nosní můstek a mikrognacie obdržely

nejnižší skóre (skóre 1) (Tab. 4). Když Hoornaert a spol. aplikovali tento systém na každého pacienta se Sticklerovým syndromem, vyšší skóre pozorovali u pacientů s mutací *COL2A1* ve srovnání s těmi, kteří mutaci neměli. Vypočtené skóre se pohybovalo od 0 do 21 s teoretickým maximem 23. Až 75 % pacientů s mutací *COL2A1* mělo celkové skóre ≥ 9 . Přítomnost vitreoretinální anomálie a odchlípení sítnice mělo celkové skóre 12, čímž vyzdvihlo důležitost důkladného oftalmologického vyšetření u pacientů se STL.

Tato kritéria ale nepokrývala celou šíři příznaků STL. Z důvodu vysoké heterogenity onemocnění je klinická diagnostika poměrně obtížná a v současnosti je založená na klinickém obrazu podpořeném molekulárně genetickou analýzou. I když jsou přítomny všechny obvyklé symptomy STL, mohou se vyskytovat mutace i v jiných genech, tzv. non-STL genech.

Molekulárně genetická diagnostika STL nebyla dlouho k dispozici z důvodu velikosti, složitosti a počtu genů zúčastněných v patogenezi STL, proto hlavní roli hrála klinická diagnostika na základě diagnostických kritérií. Molekulární diagnostika je založena na sekvenační analýze všech kódujících a přilehlých exon/intronových oblastí nejčastějšího kauzálního genu *COL2A1*. Nejčastěji identifikovanými jsou nonsense mutace v genu *COL2A1* a missense mutace, delece, inserce a sestřihové varianty u obou genů *COL2A1* a *COL11A1*. Všechny geny asociované se STL jsou charakteristické vysokým počtem kódujících exonů (v průměru 48 exonů) a Sangerova sekvenační analýza je poměrně zdlouhavá a finančně náročná. V současné době, díky tzv. sekvenování nové generace (NGS) je možné masivní paralelní sekvenování všech genů asociovaných se STL i jejich fenotypově příbuzných syndromů v jedné době.

2.7 Prevence a management

Doposud neexistuje žádná kauzální léčba tohoto onemocnění, avšak symptomatická léčba může kontrolovat příznaky a tím sloužit jako prevence možných komplikací.

Pacienti, kteří si jsou vědomi symptomů spojených s odchlípením sítnice často předejdou komplikacím tím, že vyhledají rychlé řešení a léčbu, když se objeví první symptomy (Robin et al., 2000). Mezi potenciální intervence, které můžou zabránit odchlípení sítnice a slouží jako prevence, patří kryoterapie, laserová terapie a technika tzv. "scleral buckling". V současnosti neexistuje žádný konsenzus ohledně osvědčených postupů a nejsou

dostupné ani žádné aktuální pokyny pro profylaktickou intervenci u této skupiny postižených jedinců (Carroll et al., 2011). Znalost tohoto onemocnění také umožnila postiženým pacientům podstoupit laserovou fotokoagulaci, u které bylo prokázáno, že je účinná při prevenci odchlípení sítnice (Leiba et al., 1996).

Vzhledem k tomu, že novorozenci se STL mohou mít Pierre-Robinovou sekvenci a postižení dýchacích cest, je zaveden porodní plán, který umožňuje okamžitý přístup specialistů, a neonatální péče je tak vysoce úspěšná při zvládnání symptomů a poskytování lepší kvality života (Robin et al., 2000).

Pacienty se STL je nutné neustále sledovat a na každé zhoršení problémů rychle reagovat. Sluch by měl být u postižených pacientů kontrolován každých 6 měsíců a to do věku 5 let a pak alespoň jednou ročně. Podobně je to i s očním vyšetřením. Obecně je třeba se vyhýbat činností, jako jsou míčové či kontaktní sporty, které mohou vést k traumatickému odchlípení sítnice a/nebo zranění kloubů. Včasná diagnostika a léčba očních poruch může zabránit totální slepotě. Potřebu konkrétní péče a sledování většinou řídí klinický genetik, který komunikuje se všemi odborníky a specifikuje rizika, kterých by se preventivní vyšetření mělo týkat. Protože je STL multisystémové onemocnění, optimální management vyžaduje efektivní koordinaci interdisciplinární spolupráce týmu specialistů. Důležitou součástí péče je také genetické poradenství, které v případě potvrzení konkrétní mutace může nabídnout nejen vyšetření dalších členů rodiny, ale také prenatální či preimplantační genetickou diagnostiku v postižených rodinách. Molekulární potvrzení STL by mělo zdokonalit zdravotní management onemocnění. Znalost přesné molekulární příčiny do budoucna otevírá možnosti pro cílenou genovou terapii.

3. Usherův syndrom

Usherův syndrom (USH), je vzácné, avšak závažné, geneticky heterogenní onemocnění, které postihuje současně zrak a sluch. Poprvé syndrom popsal (ale nepojmenoval) v roce 1858 německý oftalmolog Alfred von Graefe ve své studii u 3 příbuzných pacientů, jako kombinaci hluchoty a oční poruchy zvané retinitis pigmentosa (RP), a předpokládal dědičnou příčinu. Později, v roce 1914, dostalo toto onemocnění název po skotském oftalmologovi Charlesovi Usherovi, který popsal dědičný původ tohoto onemocnění.

Jde o nejčastější genetickou příčinou hluchoslepoty u dětí školního věku. Syndromem trpí přibližně 3 - 6 % populace s vrozenou vadou sluchu, 8 - 33 % pacientů s RP, a je v téměř 50 % případů příčinou hluchoslepoty (Vernon, 1969, Boughman et al., 1983). Prevalence USH je v současné době odhadována v rozvinutých zemích na 3 - 4 na 100 000 živě narozených dětí s frekvencí přenašečů 1 na 100 (Boughman et al., 1983, Rosenberg et al., 1997). Je rozšířen také zejména v severním Švédsku a východní a severní části Finska, kde je odhadovaná prevalence 10 - 21/100 000 (Hallgren, 1959, Nuutila, 1970). Syndrom je však častější v regionech s malými, izolovanými, často inbredními populacemi, jako např. Izrael (Samaritáni), Pákistán (Hutterité), Francie (Poitou-Charentes), Akadiánská populace v Louisianě ve Spojených státech (Boughman et al., 1983, Hallgren 1959, Bonné-Tamir et al., 1994).

Klinicky se syndrom dělí do tří hlavních typů, kde kombinace pigmentové degenerace sítnice s různým stupněm sluchové ztráty může být provázená vestibulární dysfunkcí vedoucí k problémům s udržení rovnováhy.

Studie USH má nesporně velký význam v oblasti výzkumu slepoty a hluchoty i pro pochopení základních molekulárních mechanismů některých vývojových a funkčních podobností existujících mezi retinálními a kochleárními sensorickými buňkami, tj. fotoreceptorovými a vláskovými buňkami. Molekulární analýza USH může také vést k objevu nových biologických procesů, na kterých se podílí oba typy smyslových buněk.

Dle tiskové zprávy Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR zde byla v centru PIGMOD dne 20. 5. 2020 provedena první unikátní operace sítnice zavádějící do oka vektor genové terapie na speciálně odchovaných modelových prasatech s mutací genu *USH1C* pro harmonin. Model byl vypracován ve spolupráci s univerzitami v Mnichově a Mainzu a centru PIGMOD se podařilo odchovat dva vrhy těchto modelových zvířat. Operaci provedl MUDr.

Miroslav Veith, primář Oftalmologické kliniky Fakultní nemocnice Královské Vinohrady. Jednalo se o poměrně krátký a bezpečný operační výkon, a pokud se prokáže úspěšnost této léčby v kombinaci s použitou operační technikou, lze tento typ operace minimálně po technické stránce provádět na více pracovištích i v ČR (zdroj: <http://www.iapg.cas.cz/cs/aktuality/Genova-terapie-by-mohla-pomoci-v-lecbe-Usheroва-syndromu/>). Tím se otevírá cesta k možnosti léčby pro pacienty s *USHIC*. Podrobnější vědecká publikace dosud není k dispozici pro citování.

Kauzální genová terapie poruchy zraku u USH1B je ve fázi klinické studie, celkově však lze říci, že kauzální léčba USH doposud není dostupná. Pro postižené jedince je nezbytné maximálně využívat zrakové a sluchové vnímání tak, aby se stabilizovaly funkční schopnosti těchto životně důležitých smyslů. Lékaři často pacientům s USH předepisují vysoké dávky vitamínů, především provitaminu A. Jejich účinek však dosud nebyl výrazně prokázán a je předmětem dalšího zkoumání (LORM Společnost pro hluchoslepé z.s. [online]. LORM: © 2015 [cit. 8.5.2020]. Dostupné z: <http://www.lorm.cz>). Hlavním důvodem, proč je v dnešní době nutné odlišit pacienty s nesyndromovou poruchou sluchu od pacientů s USH, je nutnost včasné bilaterální kochleární implantace u pacientů s USH a to buď synchronní, nebo v co nejkratším časovém intervalu po sobě. V případě jednostranné implantace zůstávají pacienti s USH plně odkázáni na asistenci, zejména při pohybu venku, protože nemají možnost směrového slyšení a tím orientace v prostoru.

3.1 Klinický obraz

Všichni pacienti s USH mají v klinickém obrazu progresivní RP, která se z počátku projevuje jako ztráta nočního vidění (šeroslepost) a postupné omezení zorného pole, což nakonec vede až ke slepotě, zatímco stupeň ztráty sluchu a vestibulární funkce se liší mezi jednotlivými klinickými typy. V některých studiích byly pozorovány i určité duševní poruchy provázející USH, jako psychóza (Rijavec, Grubic, 2009, Hess-Röver et al., 1999, Jumaian, Fergusson, 2003), kognitivní deficit (Sharp et al., 1994), mentální anorexie (Chapman et al., 1998), či ADHD (Rijavec, Grubic, 2009).

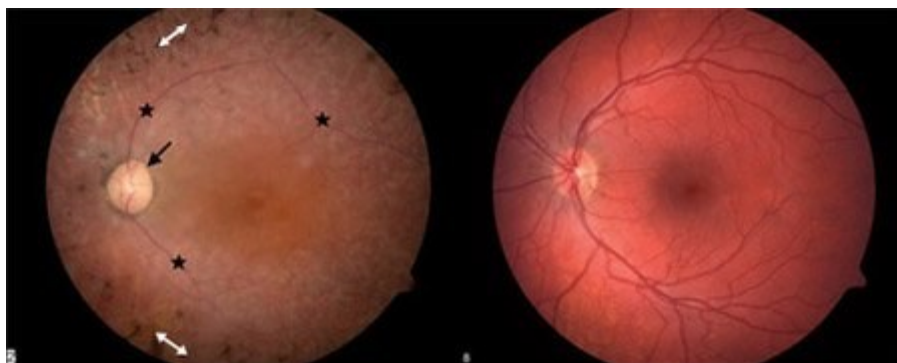
Retinitis pigmentosa

Retinitis pigmentosa (RP) patří do skupiny heterogenních dědičných onemocnění sítnice s primárním postižením tyčinek. Celosvětově RP postihuje 1 osobu z 3000 až 7000 a je charakterizována ztrátou nočního a periferního vidění v důsledku degenerace buněk fotoreceptorů (Ferrari et al., 2011, Daiger et al., 2013). Termín retinitis je poněkud zavádějící a sémanticky nesprávný, protože retinitis odkazuje na zánět sítnice, který je pro tento syndrom neobvyklý. Termín pigmentosa zase odkazuje na charakteristické melaninové uložení v sítnici v pokročilejších fázích RP. Intraretinální depozice pigmentu a arteriolární zúžení charakterizuje vzhled fundu u pacientů s RP a jsou předpokladem pro diagnózu.

RP se může vyskytovat buď jako samostatné onemocnění nebo jako součást řady syndromů, u kterých se k očnímu postižení přidružuje nejčastěji hluchota. Autozomálně recesivní RP je nejrozšířenější formou onemocnění a představuje 50 - 60 % případů (Hartong et al., 2006) a je asociována s více než 37 geny, mezi které patří i *USH2A*, kdy nesyndromová RP 39 (MIM #613809) je alelickou chorobou k USH. Nástup nesyndromové RP je nejčastější v období dospívání nebo mladé dospělosti, nejčastěji ve věku 10 - 30 let, a většina forem je progresivní, často vedoucí k úplné ztrátě zraku.

V klinickém obrazu je onemocnění charakterizováno jako progresivní dystrofie tyčinek, která se nejdříve projevuje jako šeroslepost doprovázená úbytkem zorného pole, kde v pozdějších fázích dochází také k odumírání čípků a tím ke snížení centrální zrakové ostrosti. Právě postupná ztráta centrálního vidění vede postupně k úplné nevidomosti pacientů s USH, která je dosud bez známé léčby (Edwards et al., 1998). Příčinou slepoty u USH pacientů je progresivní retinální degenerace, jejímž prvním příznakem je nejčastěji šeroslepost v předškolním věku. Během dětství a dospívání progreduje a může končit až úplnou ztrátou zraku. Dalším typickým očním projevem u USH pacientů je také světloplachost.

RP vykazuje poměrně velkou klinickou variabilitu, a to i mezi příslušníky jedné rodiny. Klinická diagnostika při vyšetření očního pozadí se zakládá na přítomnosti shluků pigmentu tvarem připomínající kostní buňky. K dalším diagnostickým znakům patří přítomnost zúžení tepen na sítnici, atrofie terče zrakového nervu, zákaly čočky a změny při elektroretinografickém (ERG) vyšetření. (Obr. 8).



Obr. 8: Fotografie sítnice pacienta s Usherovým syndromem v porovnání s normální sítnicí zdravého člověka.

Černá šipka znázorňuje atrofii terče zrakového nervu, hvězdičky znázorňují zúžené cévy a obousměrná šipka znázorňuje přítomnost shluků pigmentu tvarem připomínající kostní buňky.

Převzato z: https://www.medicinenet.com/usher_syndrome/article.htm#what_is_usher_syndrome.

Jak RP progreduje, zorné pole se zužuje, což je stav známý také jako trubicovité (tunelové) vidění, dokud nezůstává pouze centrální vidění, neboli schopnost vidět pouze přímo vpřed. (Obr. 9).



Obr. 9: Tunelové vidění u pacientů s Usherovým syndromem.

Vlevo pohled při normálním vidění, vpravo pohled při onemocnění retinitis pigmentosa v důsledku zúžení zorného pole.

Převzato z: <https://nethealthbook.com/eye-diseases-and-eye-related-topics/retinal-problems>.

Sluchové postižení

Poškození sluchu v pásmu od lehké vady až po hluchotu (podle typu USH) je prvním diagnostickým příznakem onemocnění. Sluchová vada je přítomná již od narození nebo raného dětství. Většina dětí s USH se narodí se středně těžkou až těžkou ztrátou sluchu, v závislosti na typu USH. Vzhledem k tomu, že je vada vrozená, jsou takto postižení jedinci

na začátku diagnostikování jako sluchově postižení, teprve později bývají přeřazeni do kategorie hluchoslepých.

Geny podílející se na patogenezi USH hrají důležitou roli ve vývoji a udržování struktur vnitřního ucha a také v udržování rovnováhy. Jsou zodpovědné za tvorbu proteinů důležitých jak pro samotnou tvorbu, tak i následné udržování vláskových buněk, což jsou sekundární smyslové buňky zodpovídající za příjem sluchových podnětů (Junquiera et al., 1997). Nachází se v Cortiho orgánu ve vnitřním uchu, ale i ve vestibulárním systému. Vláškové buňky vytvářejí elektrické signály, které jsou přenášeny sluchovým nervem do mozku. Ztráta sluchu je způsobena abnormálním vývojem vláskových buněk ve vnitřním uchu v důsledku defektu těchto genů, což vede k tomu, že vnitřní ucho není správně vyvinuto již při narození, nebo je časem poškozeno. Proto, pokud tyto vláškové buňky správně nefungují, což je případ USH, projeví se tento stav nedoslýchavostí až hluchotou.

Porucha rovnováhy

Poškození vnitřního ucha v důsledku abnormálního vývoje vestibulárních vláskových buněk může mít za následek kromě ztráty sluchu i problémy s rovnováhou. Vestibulární systém je zodpovědný za zasilání informací o rovnováze do mozku. Vestibulární dysfunkce je přítomná u typů USH1 a USH3. Vestibulární deficit je zdá se vrozený, nebo se alespoň vyskytuje ve velmi raném věku, protože děti s USH1 typem mají mírně opožděné milníky vývoje týkající se sedu a chození. Dle Möllera et al., (1989), žádný z pacientů nezačal chodit před dovršením věku 18 měsíců. Věk, kdy začne dítě chodit, se zdá být vhodným prediktorem klinického typu USH, protože jen málo dětí s typem 2 má opožděný nástup samostatné chůze o tolik, jako děti s USH1 (Kimberling, Möller, 1995).

Vestibulární testování je důležitou součástí vyšetření neslyšícího dítěte, pokud nebyl USH vyloučen jako možná diagnóza. Může být použito jako vodítko k vyloučení USH1 v raném věku u vrozeně neslyšícího dítěte, aniž by muselo podstoupit oftalmologické vyšetření, zejména ERG u malých dětí, které i tak většinou bývá v raném věku neprůkazné.

3.2 Klinická klasifikace

Klinická heterogenita syndromu je i v tomto případě doprovázená poměrně vysokou genetickou heterogenitou - dodnes je dle literatury známo nejméně 15 USH genů.

Existence genetické heterogenity s nejméně dvěma odlišnými formami USH byla stanovena na základě odlišností mezi studovanými rodinami s ohledem na závažnost ztráty sluchu a na přítomnost poruchy vestibulárního systému (Fishman et al., 1983, Forsius et al., 1971, Hallgren, 1959, Nuutila, 1970). Na základě fenotypové klasifikace navržené Davenportem a Omennem (Davenport, Omenn, 1977) a klinických příznaků publikovaných konsorciem pro USH (Smith et al., 1994), byly definovány tři základné klinické typy USH s AR způsobem dědičnosti (USH1, USH2 a USH3), které se používají dodnes. Tyto hlavní klinické typy jsou dále rozděleny na další podtypy na základě jejich genetické příčiny. Jednotlivé typy se navzájem liší závažností a progresí ztráty sluchu a přítomností nebo absencí vestibulárních symptomů spolu se zrakovým postižením, kde RP je společná pro všechny tři typy (Tab. 5). V každé z těchto forem může být RP také doprovázena kataraktou (Auffarth et al., 1997). Je důležité zmínit, že ne všichni pacienti s USH zcela oslepnou, ačkoliv se prevalence slepoty zvyšuje s věkem. Přibližně 40 % pacientů ztratí zrak v páté dekádě, 60 % v šesté dekádě a 75 % v sedmé dekádě života, zatímco u pacientů, kteří nejsou v pozdějším věku slepí, dojde k těžkému poškození zraku (Pennings, 2004). Někteří pacienti s USH vykazují fenotypovou variabilitu a nemohou tak být zařazeni do žádného ze tří hlavních klinických typů. Tito pacienti jsou nakonec diagnostikováni jako atypický USH (Otterstedde et al., 2001).

Vzhledem ke genetické heterogenitě USH je tato choroba přímo předurčena pro komplexní a paralelní analýzu všech známých genů pomocí sekvenování nové generace (NGS).

Tab. 5: Klinická klasifikace Usherova syndromu.

Typ	Porucha sluchu	Ztráta zraku v důsledku RP	Vestibulární funkce
USH1	těžká vrozená oboustranná ztráta sluchu	nástup progresivní RP v období raného dětství	vestibulární areflexie
USH2	středně těžká až těžká vrozená ztráta sluchu	nástup RP v první nebo druhé dekádě života	normální
USH3	normální při narození, nástup progresivní ztráty sluchu v dětství nebo v čase dospívání	variabilní nástup RP	variabilní

3.2.1 Usherův syndrom typ 1 (USH1)

Usherův syndrom typ 1 (USH1) je charakterizován těžkou bilaterální kongenitální percepční nedoslýchavostí až hluchotou, konstantní přítomností vestibulární dysfunkce a prepubertálním nástupem progresivní RP (obvykle kolem 10. roku života). Tento typ je zároveň nejzávažnější formou USH a tvoří 30 - 40 % všech případů (Hope et al., 1997, Espinós et al., 1998, Spandau, Rohrschneider, 2002). Vestibulární dysfunkce se klinicky projevuje jako opoždění ve vývoji motoriky. Postižené děti ve věku 6 měsíců nedokážou sedět bez opory a často nezačnou chodit dříve než v 18. měsíci života (Möller et al., 1989). Retinopatie se jeví jako ztráta nočního vidění a zúžení zorného pole během dětství, a nakonec jako ztráta zrakové ostrosti, která rychle progreduje a vede ke slepotě. Histopatologické studie u 2 pacientů s USH1 ukázala, že tito pacienti s dlouhodobou zvukovou deprivací mají pouze drobné degenerativní změny dorsálního a ventrálního kochleárního jádra, centrální sluchový systém je neporušený a proto je pro ně kochleární implantace prospěšná (Wagenaar et al., 1999).

U pacientů s klinicky stanovenou diagnózou USH1 byly také popsány další symptomy jako je anomálie cílů se sníženou pohyblivostí spermií a bronchiektázie (Bonneau et al., 1993, Hunter et al., 1986).

3.2.2 Usherův syndrom typ 2 (USH2)

USH2 typ je charakterizován prelingvální středně těžkou až těžkou nedoslýchavostí. První klinické příznaky RP se objevují kolem puberty, přičemž nejčastěji uváděnou první oční komplikací je noční slepota (věk manifestace u USH2 se částečně překrývá s věkem manifestace u USH1) (Petit, 2001). Průměrný věk při vzniku noční slepoty je 15 let a průměrný věk diagnózy RP je 24 let (Tsilou et al., 2002). Progrese zrakového postižení vykazuje vyšší variabilitu než u USH1 (Wagenaar, 2000). Vzhledem k překrývání klinických projevů zrakových symptomů u typů 1 a 2 nejsou tyto symptomy v jednotlivých případech považovány za spolehlivé prediktory typu USH (Hope et al., 1997, Iannaccone et al., 2004).

U několika předchozích komparativních studií bylo u pacientů s USH1 a USH2 analyzováno zhoršení zrakové ostrosti a zorného pole (Fishman et al. 1983, Edwards et al. 1998, Seeliger et al. 1999, Tsilou et al. 2002, Pennings et al. 2004). Například ve studii Tsiloua a Seelingerera se závažnost oční symptomatologie významně nelišila u USH1 a USH2 (Tsilou et al., 2002, Seeliger et al., 1999). Výsledky těchto studií je ale obtížné srovnat, protože se lišily počtem vyšetřených pacientů a použitím různých metod k analýze dat.

Novější studie skupiny 328 postižených jedinců s USH1 a USH2 potvrdila signifikantní rozdíl v nástupu RP u pacientů s USH1 v porovnání s pacienty s USH2. Také zraková ostrost byla významně zhoršena u postižených pacientů s USH1 v porovnání s pacienty s USH2 ve věku 50 let a více (Sadeghi et al., 2006). Na rozdíl od ostatních klinických typů USH je funkce vestibulárního systému v tomto případě neporušena. USH2 je nejčastějším klinickým typem USH a představuje více než polovinu všech pacientů (Spandau, Rohrschneider, 2002, Pennings et al., 2004). Stupeň sluchového postižení u pacientů s USH2 se zvyšuje z mírné ztráty sluchu pro nízkofrekvenční zvuky až na těžkou ztrátu sluchu pro vysokofrekvenční zvuky, přičemž má tendenci zůstat stabilní. Ztráta sluchu je vrozená, ale může být detekována v pozdějších obdobích, když ztěžuje komunikaci (Millán et al., 2011).

3.2.3 Usherův syndrom typ 3 (USH3)

Existence této formy na základě fenotypové klasifikace navržené Davenportem a Omennem (Davenport a Omenn, 1977) byla původně považována za nejasnou z důvodu nízké incidence, kde pacienti tvořili pouze 2 % z celkového počtu USH. Proto nebyl typ USH3 přijímán jako další hlavní klinický typ USH až do doby, než byly USH konzorciem publikovány klinické znaky pro třetí typ (Smith et al., 1994). Tento typ je v evropské populaci poměrně vzácný (< 3 % případů), výjimkou je finská populace, kde se v důsledku efektu zakladatele s výskytem 40 % případů jedná o nejčastější typ (Spandau et al., 2002, Pakarinen et al., 1995). Další studie také potvrdily, že výskyt USH3 v Birminghamu (UK) představuje až 20 % případů USH (Hope et al., 1997).

USH3 je charakterizován variabilním nástupem ztráty sluchu a RP spolu s variabilními vestibulárními příznaky. Sensorineurální ztráta sluchu je postlingvální a progresivní a může se objevit mezi první a třetí dekadou života. V počátečních stádiích je stupeň sluchového postižení podobný jako u USH2 typu, se závažnějším zhoršením při vysokých frekvencích. Míra progresu je variabilní, ale ve většině případů se jedná o těžkou ztrátu sluchu. Nicméně, sluch je během prvních fází vývoje natolik rozvinutý, že umožňuje správný vývoj řeči. U pacientů s USH3 je tedy nutné provést několik po sobě následujících audiometrických vyšetření s cílem získat přesnou klinickou diagnózu (Millán et al., 2011). RP se manifestuje nejprve jako světloplachost s progresí ztráty vidění, která postupně vede až k totální slepotě. U pacientů s USH3 byl pomocí refrakčních testů pozorován také vysoký podíl hypermetropie s vysokým stupněm astigmatismu (Pakarinen et al., 1995). Tento nález je mnohem častější u USH3 než u celkové populace. Progrese zrakového postižení se nejčastěji vyskytuje ve věku

do 40 let, přičemž k závažnému zhoršení zrakové ostrosti dochází v průměrném věku 37 let a k zúžení zorného pole dochází v průměrném věku 30 let (Tsilou et al., 2002).

3.3 Molekulární genetika

USH vykazuje značnou genetickou heterogenitu. Dle dostupných literárních zdrojů a údajů z RetNet (<https://sph.uth.edu/Retnet/sum-dis.htm#B-diseases>), je dnes celkově známo 18 lokusů asociovaných s USH a 15 identifikovaných USH genů, což svědčí pro značnou lokusovou a alelickou heterogenitu onemocnění. Dle Mathura a spol. (Mathur et al., 2015) se jedná o devět lokusů asociovaných s USH1, tři lokusy s USH2 a dva lokusy s USH3 typem. Z těchto lokusů bylo identifikováno 13 genů, které zahrnují celkem šest USH1 genů, tři USH2 geny, dva USH3 geny a dva geny asociované s atypickým USH (Tab. 6) (Santana et al., 2019).

S USH1 jsou spojené geny *MYO7A*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15*, *USH1G* a *CIB2*, přičemž nejčastěji se vyskytují mutace v *MYO7A* genu, a to až ve 40 % všech případů USH1 (Bonnet et al., 2016, Bujakowska et al., 2014). Role genu *CIB2* v patogeneze USH1 byla ve studii Booth et al. (2018) zpochybněna. Mezi USH2 geny patří *USH2A*, kde podíl patogenních variant představuje až 91 % ze všech USH2, dále *ADGRV1* (*GPR98*) a *WHRN* (*DFNB31*) geny (Bonnet et al., 2016). Vzácně se vyskytující USH3 typ je způsoben mutacemi ve dvou genech: *CLRN1* and *HARS* (Mathur et al., 2015). Gen *HARS* je coby USH3 gen často rozporován, protože u pacientů nesoucích mutace v tomto genu se často klinicky rozvine epizodická psychóza, spolu s progresivní ztrátou sluchu a RP, což mohou být klinické příznaky jiných vzácných syndromů (Rabbani et al., 2012). Publikované mutace v genech *PDZD7* (Krawitz et al., 2014), *ABHD12* a *CEP250* byly popsány v asociaci s atypickým USH (Bonnet et al., 2016). U pacientů s atypickým USH se ztrátou sluchu a mírnou RP byla identifikována homozygotní nonsense mutace v genu *CEP250* (MIM *609689) spolu s heterozygotní nonsense mutací v genu *C2ORF71* (MIM *613425). Ačkoliv gen *C2ORF71* je AR RP gen (Audo et al., 2011, Collin et al., 2010, Nishimura et al., 2010), není jasné, zda jeho heterozygotní mutace také přispívají k rozvoji onemocnění u těchto atypických USH pacientů (Mathur et al., 2015). Gen *PDZD7* je považován za modifikátorový gen u pacientů s *USH2A* mutacemi, kde byla zároveň popsána poměrně vzácná digenní dědičnost. Ebermann et al. (2010) popsali jedince s USH2 s heterozygotními patogenními variantami v genech

ADGRV1 a *PDZD7*, a dále Yoshimura et al. (2014) popsali jedince s USH1 s heterozygotními patogenními variantami v *MYO7A* a *PCDH15* genech. Dále byla popsána digenní dědičnost u USH1 pacientů s mutacemi v genech *CDH23* a *PCDH15* (Zheng et al., 2005). Velká meta-analýza genetiky USH Jouret et al. (2019) dospěla k závěru, že data o digenní dědičnosti „nepodporují existenci digenní dědičnosti u USH“ a naznačují, že u postižených jedinců ve výše zmíněných studiích mohly existovat genetické varianty nezjistitelné v té době dostupnými metodami genetického testování.

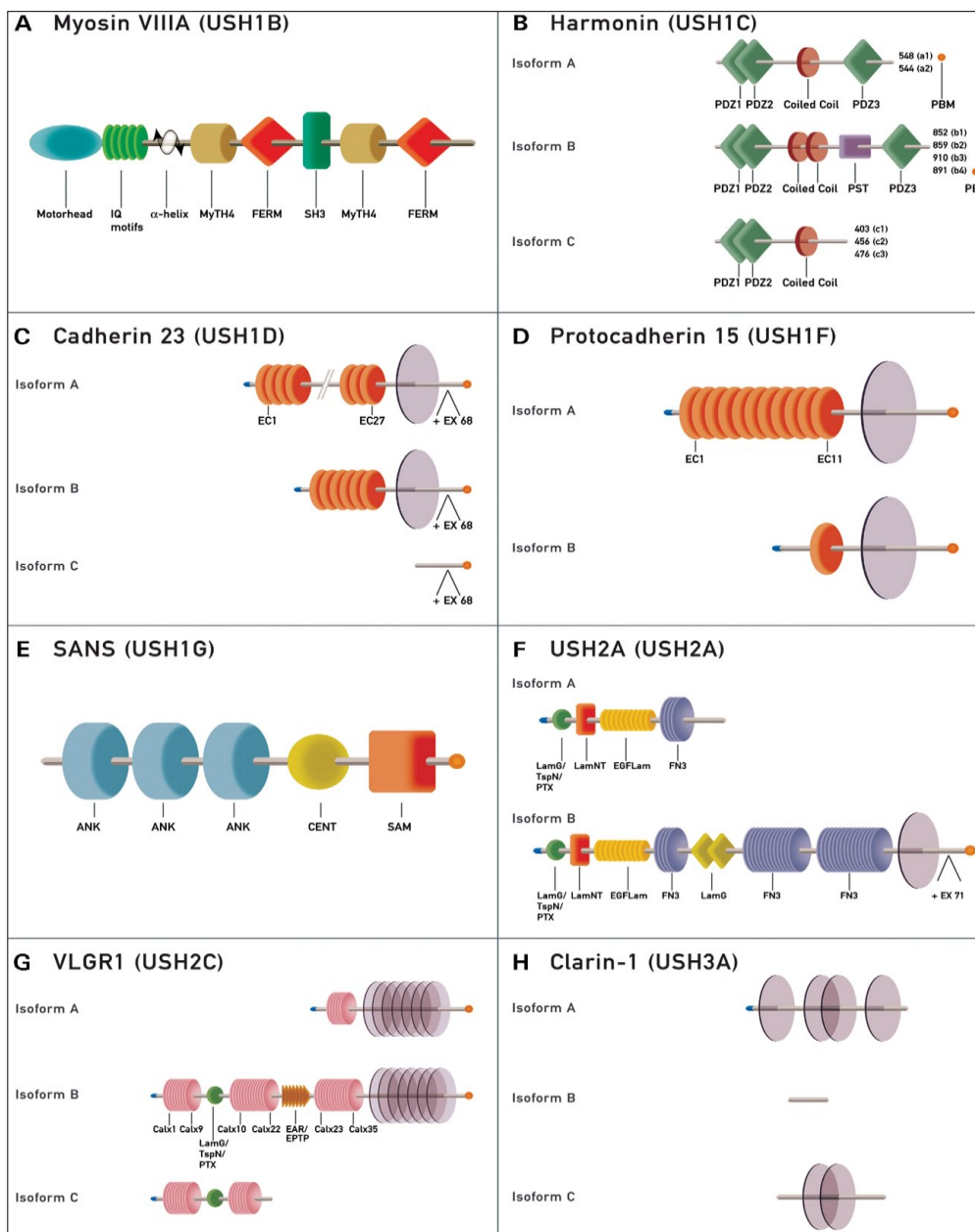
Komplikovat situaci může i další fakt - například, popsaná mutace p.Cys759Phe v genu *USH2A* se vyskytuje u 4,5 % případů recesivní formy RP bez ztráty sluchu, a představuje tak nejčastější příčinu nesyndromové slepoty, která byla popsána u 224 vzorků nepříbuzných severoameričanů (Rivolta et al., 2000). Rovněž mutace všech šesti USH1 genů mohou zapříčinit také recesivní nesyndromovou hluchotu (Tamagawa et al., 2002, Bork et al., 2001, Ahmed et al., 2003, Maria Oonk et al., 2015, Seco et al., 2016). Také se ukázalo, že mutace v genu zodpovědného za typ USH1B způsobují symptomy podobné USH1 nebo USH3, stejně jako u dominantní nesyndromové hluchoty (Liu et al., 1997, 1998). Celkově lze říci, že klinická i molekulárně genetická klasifikace USH je velmi komplikovaná a ne vždy zcela přesná.

USH proteiny jsou převážně lokalizovány ve stereociliích a synaptických oblastech vláskových buněk vnitřního ucha (Adato et al., 2005, Reiners et al., 2005, van Wijk et al., 2006, Siemens et al., 2002, Boëda et al., 2002, Senften et al., 2006), a také ve fotoreceptorových buňkách.

Proteiny kódované USH geny patří do různých tříd proteinů s odlišnými funkcemi (Obr. 10). Myosin VIIA (*USH1B*) patří mezi tzv. motorické proteiny, harmonin (*USH1C*), SANS (*USH1G*) a whirlin (*USH2D*) patří mezi tzv. "scaffold" proteiny (scaffold = angl. lešení), cadherin 23 (*USH1D*) a protocadherin 15 (*USH1F*) jsou transmembránové proteiny podílející se na stavbě mezibuněčných spojů, usherin (izoforma B) (*USH2A*) a *VLGR1b* (*USH2C*) jsou transmembránové proteiny s velkými extracelulárními doménami, a clarin-1 (*USH3A*) je protein se čtyřmi transmembránovými doménami. Všechny tyto proteiny mají jednu nebo několik protein-proteinových interakčních domén.

Tab. 6: Molekulární klasifikace Usherova syndromu.

USH typ	USH lokus	Gen	Protein	Reference	Podíl na daném typu USH
USH1	USH1B	<i>MYO7A</i>	myosin VIIa	Weil et al., 1995, Astuto et al., 2000	53-63 %
	USH1C	<i>USH1C</i>	harmonin	Bitner-Glindizcz et al., 2000, Verpy et al., 2000	1-15 %
	USH1D	<i>CDH23</i>	cadherin 23	Bolz et al., 2001, Bork et al., 2001	7-20 %
	USH1E	-	-	Chaïb et al., 1997	Vzácný
	USH1F	<i>PCDH15</i>	protocadherin 15	Ahmed et al., 2001, Alagramam et al., 2001	7-12 %
	USH1G	<i>USH1G</i>	SANS (scaffold protein containing ankyrin repeats and sam domain)	Kikkawa et al., 2003, Weil et al., 2003	0-4 %
	USH1H	-	-	Ahmed et al., 2009	neznámý
	USH1J	<i>CIB2</i>	calcium- and integrin-binding protein 2	Riazuddin et al., 2012	neznámý
	USH1K	-	-	Jaworek et al., 2012	neznámý
USH2	USH2A	<i>USH2A</i>	usherin	Eudy et al., 1998, van Wijk et al., 2004	57-79 %
	USH2C	<i>ADGRV1 (GPR98)</i>	adhesion G protein-coupled receptor V1	Weston et al., 2004, Yagi et al., 2005	6.6-19 %
	USH2D	<i>WHRN (DFNB31)</i>	whirlin	van Wijk et al., 2006, Ebermann et al., 2007	0-9.5 %
USH3	USH3A	<i>CLRN1</i>	clarin 1	Joensuu et al., 2001, Adato et al., 2002	100 %
	USH3B	<i>HARS</i>	histidyl-tRNA synthetase	Abbott et al., 2017	neznámý
USH atypický	-	<i>PDZD7</i>	PDZ domain-containing 7	Ebermann et al., 2010	neznámý



Obr. 10: Přehled USH proteinů a jejich různých izoformem.

(A) Myosin VIIA protein, sestávající ze 7 domén (motor head doména, calmodulin-binding IQ doména, dvě FERM domény, dvě MyTH4 domény a SH3 doména). (B) USH1C protein, harmonin, s třemi různými izoformami, každá sestává ze dvou PDZ domén (PDZ1 and 2) a jedné coiled-coil domény. Izoforma A a B obsahuje navíc PDZ3 doménu. (C) Cadherin 23 (USH1D) je reprezentován třemi různými izoformami. Izoforma A sestává z 27 Ca^{2+} vázajících extracelulárních cadherinových domén (EC1-27), transmembránové domény (šedé disky) a krátké intracelulární domény. Izoforma B je podobná izoformě A, avšak obsahuje jenom posledních šest EC domén. Izoforma C sestává z jediné intracelulární domény a C-terminální PBM domény (PDZ binding motif). (D) Protocadherin 15 (USH1F) sestává z jedenácti EC domén (izoforma A), nebo jedné EC domény (izoforma B), transmembránové domény a C-terminální PBM domény. (E) SANS (USH1G) protein sestává ze tří ANK (ankyrin) domén, centrální oblasti (CENT), a SAM domény (sterile alpha motif (SAM) a C-

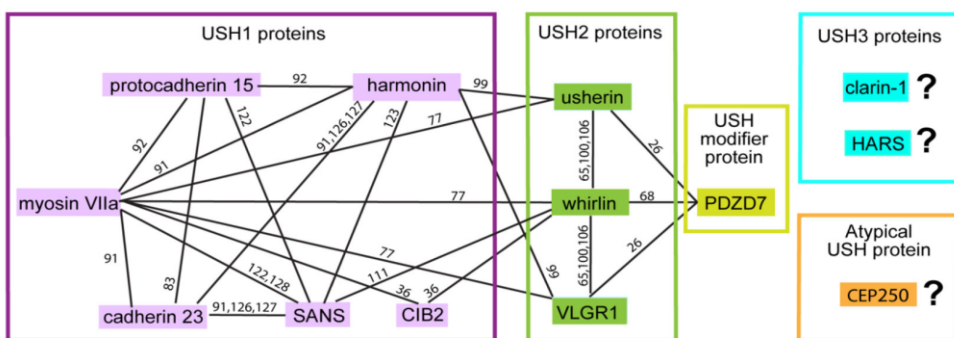
terminální PBM domény. **(F)** Isoforma A usherinu (USH2A) sestává z N-terminální thrombospondin/pentaxin/laminin G-like domény, laminin N-terminální (LamNT) domény z deseti laminin-type EGF-like (EGF Lam) domén a čtyř fibronectin type III (FN3) domén. Isoforma B obsahuje navíc dvě LamG (laminin G) domény, 28 FN3 domén, a transmembránovou doménu a jednu intracelulární C-terminální PBM doménu. **(G)** Isoforma B VLGR1 (USH1C) proteinu obsahuje thrombospondin/pentaxin/laminin G-like doménu, 35 Ca²⁺-binding calcium exchanger β (Calx) domén, sedm EAR/EPTP opakování, sedm transmembránových domén a intracelulární C-terminální PBM doménu. **(H)** Clarin-1, USH3A protein se skládá ze čtyř transmembránových domén (izoforma A) a jedné transmembránové domény (izoforma C).

Převzato z: Kremer et al., 2006.

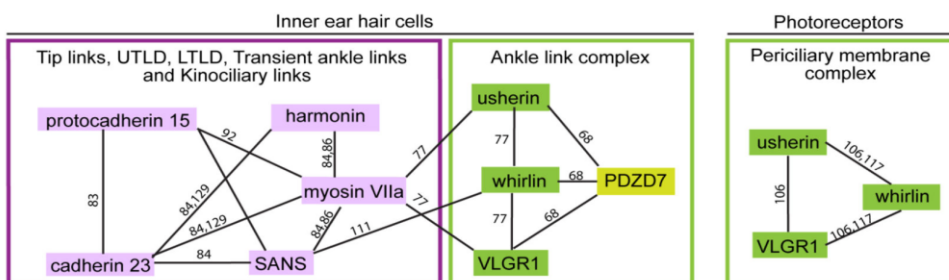
Proteiny USH1 a USH2 jsou integrovány do proteinového komplexu, neboli sítě, známé jako Usherovský interaktom (z angl. „interactome“) (Obr. 11). Centrální jádro je tvořeno doménami PDZ, které jsou homologní u harmoninu a whirlinu (van Wijk et al., 2006) a proteinem SANS asociovaným s mikrotubuly, a se zbývajícími proteiny USH připojenými k tomuto jádru. Ačkoliv jsou PDZ domény whirlinu a harmoninu zcela homologní, byly nalezeny rozdíly v protein - proteinových interakcích. Oba PDZ1 a 2 domény whirlinu se vážou na USH2A izoformu b, zatímco tento protein se váže pouze na PDZ1 doménu harmoninu (Reiners et al., 2005). Harmonin interaktor NBC3, vážící se na PDZ1 doménu, neinteraguje s whirlinem (van Wijk et al., 2006). Tato síť je přítomná v různém složení a na různých místech během různých stadií vývoje vnitřního ucha a sítnice. Ačkoliv přesná funkce komplexu je stále neznámá, bylo navrženo několik předpokládaných funkcí. Bylo prokázáno, že tento komplex je zásadní při prodlužování stereocilií a uspořádání vláskových buněk do svazků (Tilney et al., 1998, Kikkawa et al., 2005, Lefevre et al., 2008). Ve fotoreceptorech se předpokládá funkce při transportu vezikul, které obsahují nezbytné proteiny pro tvorbu, udržování a funkci vnějšího segmentu. Existují také náznaky, že USH proteinová síť se podílí na tvorbě synapsí a na synaptickém přenosu ve vláskových a fotoreceptorových buňkách (Maerker et al., 2008, Reiners et al., 2005).

Mnoho proteinů USH také interaguje s jinými proteiny, které jsou přítomny ve vnitřním uchu a sítnici. Tyto dodatečné interagující proteiny mohou zapříčinit USH, nesyndromovou ztrátu sluchu nebo retinální atrofii. Jeden z těchto již zmiňovaných proteinů, který je kódován genem *PDZD7*, je zapojen do patogeneze USH. Mutace v *PDZD7* působí jako negativní modifikátory fenotypu (Ebermann et al., 2010). Lokalizace USH proteinů ve vláskových buňkách Cortiho orgánu a ve fotoreceptorových buňkách tak hraje důležitou roli v neurosenzorické funkci jak vnitřního ucha, tak sítnice.

A. Biochemicky známé interakce.



B. In vivo známé interakce.



Převzato a upraveno z: Mathur, Yang, 2015.

Obr. 11: USH proteinový komplex.

Na obrázku jsou znázorněny známé protein-proteinové interakce.

(A) Interakce mezi USH1 proteiny (označené fialovou barvou), mezi USH2 proteiny (zelená barva) a PDZD7 proteiny nalezené a potvrzené různými *in vitro* biochemickými metodami. Interakce mezi dvěma USH3 proteiny (modré označení), atypickým USH (*CEP250*) a dalšími USH proteiny ještě nebyly přesně objasněny.

(B) Interakce mezi USH proteiny detekovanými a potvrzenými genetickými studiemi ve vláskových buňkách vnitřního ucha (vlevo) a ve fotoreceptorových buňkách (vpravo). Čísla představují reference (viz článek Mathur et al., 2015).

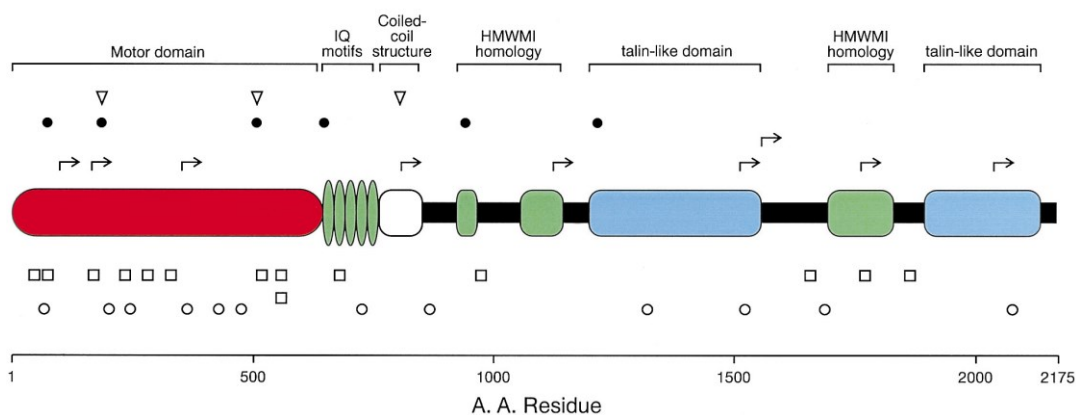
3.3.1 USH1 geny

Dodnes bylo identifikováno 6 genů, které jsou zodpovědné za USH typu 1: *MYO7A* (MIM *276903), *USH1C* (MIM *605242), *CDH23* (MIM *605516), *PCDH15* (MIM *605514), *USH1G* (MIM *607696), a *CIB2* (MIM *605564), kde prevalentní jsou mutace v genu *MYO7A* s výskytem asi 29 - 50 % všech USH1 případů u různých populací (Bharadwaj et al., 2000, Ouyang et al., 2005, Roux et al., 2006, Jaijo et al., 2006). Gen *CDH23* je druhým nejčastěji mutovaným genem s prevalencí 19 - 35 % USH1 případů (Ahmed et al., 2003, Ouyang et al., 2005, Roux et al., 2006, Oshima et al., 2008). Mutace v genu *PCDH15* se vyskytují v 11 - 19 % USH1 případů, kde značná část je způsobená velkými genomovými přestavbami (Ouyang et al., 2005, Roux et al., 2006, Guédard et al., 2007, Aller et al., 2010).

Zbývající geny vykazují mutaci méně často - *USH1* s výskytem 6 - 7 % (Ouyang et al., 2005, Roux et al., 2006) a *USH1G* u 7 % *USH1* pozorovaných v populacích z USA a Velké Británie (Ouyang et al., 2003). Avšak například v kohortách *USH1* pacientů z Francie a Španělska byl proveden screening genu *USH1G* bez nálezu jakékoliv patologické mutace (Roux et al., 2006, Aller et al., 2007). Existují však jisté výjimky distribuce mutací ve specifických populacích z důvodu tzv. efektu zakladatele. Příkladem je mutace c.216G>A v *USH1C*, která byla nalezena prakticky ve všech případech *USH1* ve francouzsko-kanadské populaci akademického původu (Ebermann et al., 2007), ale nebyla nalezena v jiných populacích. Dalším příkladem je mutace c.733C>T p.(R254X) v genu *PCDH15* (Ben-Yosef et al., 2003), která se vyskytuje u více než 58 % *USH1* rodin aškenázské populace.

Všechny *USH1* geny jsou exprimovány ve vláskových buňkách vnitřního ucha a fotoreceptorech sítnice. Proteiny kódované těmito geny jsou nezbytné pro vývoj a funkci vnitřního ucha a hrají klíčovou roli ve vývoji vláskových buněk (Richardson et al., 2011).

Metodami pozičního klonování identifikovali Weil et al. (1995) jeden z prvních genů *MYO7A* v kandidátní genové oblasti pro typ *USH1B* (*USH1B*, MIM #276900) na chromosomu 11q. Gen *MYO7A* se skládá ze 48 exonů a kóduje protein klasifikovaný jako nekonvenční myosin. Nekonvenční myosiny patří do evolučně konzervované třídy proteinů řazených mezi tzv. molekulární motory, které jsou za pomoci hydrolýzy ATP schopny vytvářet sílu a aktivní směrovaný pohyb v buňce. Předpokládá se, že jejich vysoce odlišné ocase (koncová část proteinu) jsou připevněny k různým makromolekulárním strukturám, které se pohybují podél aktinových vláken, což jim umožňuje přepravovat určitý typ molekul (Weil et al., 1995). Dosud bylo v genu *MYO7A* popsáno několik typů mutací: missense, nonsense, sestřihové mutace, inserce a malé delece (Obr. 12). Od původní publikace z roku 1995 bylo u *USH1B* pacientů detekováno více než 81 různých mutací rozmístěných po celém genu *MYO7A* bez výskytu hot spot mutací, přičemž asi polovinu z nich tvoří missense mutace nebo in-frame inserce/delece (Cuevas et al., 1998, 1999, Espinos et al., 1998a, Janecke et al., 1999, Lévy et al., 1997, Liu et al., 1997a, Liu et al., 1997b, Liu et al., 1998, Weil et al., 1995, Weston et al., 1996). Bylo také prokázáno, že mutace genu zodpovědného za *USH1B* formu se vyskytují ve dvou formách nesyndromové ztráty sluchu - u AR hluchoty, *DFNB2* (Liu et al., 1997c, Weil et al., 1997) a AD hluchoty, *DFNA11* (Liu et al., 1997c). Navíc u pacientů s atypickým *USH* se symptomy podobnými *USH3* fenotypu byly také detekovány mutace v genu *MYO7A* (Liu et al., 1998).



Obr. 12: Schematické znázornění molekuly myosinu VII s nálezem různých typů mutací.
nonsense (□), missense (○), frameshift (▶), splice site (●) inzerce/delece (▽).
Převzato z: Eudy, Sumegi, 1999.

Forma USH1B (MIM #276900) způsobená mutacemi v genu *MYO7A* je nejzávažnější formou syndromu s vrozenou ztrátou sluchových funkcí, s postižením zrakových funkcí během první dekády života a s vestibulární areflexií. Produkt *MYO7A* genu hraje v buňkách fotoreceptorů a RPE důležitou roli v transportu opsinu a je nezbytný pro normální průběh Waldova cyklu (Lopes et al., 2011). Na rozdíl od vláskových buněk vnitřního ucha není vývoj fotoreceptorů postižen a k jejich odumírání dochází až v průběhu života v důsledku hromadění metabolitů a následné dysfunkci synapsí (Boye et al., 2013). Prevalence této formy v evropské populaci je odhadována 4,2 případů na 100 000 obyvatel (Espinosa et al., 1998).

USH1C (USH1C, MIM #276904) je genetickým typem USH, který byl popsán v akademické populaci Louisiany a u libanonské rodiny. Verpy a spol. (Verpy et al., 2000) v studii myší knihovny cDNA odvozené ze smyslových buněk vnitřního ucha prokázali, že gen zodpovědný za typ USH1C kóduje protein obsahující PDZ doménu. Tento protein kódovaný genem *USH1C* pojmenovali „harmonin“ z řeckého slova „harmonia“, což znamená „sestavování“. Prokázali, že ve vnitřním uchu myši exprimují harmonin pouze senzoričké vláskové buňky. Gen *USH1C* se nachází na chromozomu 11p15.1, skládá se z 28 kódujících exonů a kóduje protein obsahující PDZ doménu (viz 3.3), který se účastní protein-proteinových interakcí při organizaci multiproteinových komplexů, například receptorů a iontových kanálů v plazmatické membráně (Montell, 2000). Dle db LOVD (viz 3.4.2) bylo doposud identifikováno více než 250 patogenních variant v genu *USH1C*, z toho 22 % představují varianty v sestřihovém místě a dalších 75 % tvoří varianty v kódující oblasti genu *USH1C* (<https://databases.lovd.nl/shared/genes/USH1C>). Většina dosud identifikovaných mutací v genu *USH1C* (kromě p.(Pro608Arg) a c.2227-1G>A) je lokalizována v prvních 13 exonech, které jsou přítomny ve všech *USH1C* transkriptech. *USH1C* má celkem 4 různé

transkripty vzniklé procesem alternativního sestřihu, které kódují různě dlouhé izoformy proteinu (Khateb et al., 2012). U akademické populace s podtypem USH1C nebyla nalezena žádná mutace v kódující sekvenci genu *USH1C*. Verpy a spol. (Verpy et al., 2000) ale detekovali kauzální mutaci - intronovou expanzi VNTR v intronu 5 genu *USH1C*, u které se předpokládalo, že inhibuje transkripční a/nebo posttranskripční procesy. V evropské populaci také detekovali u několika jedinců se společným haplotypem další kauzální mutaci c.238-239ins, u níž se předpokládá efekt zakladatele (Zwaenepoel et al., 2001).

Jako první identifikovali gen ***CDH23*** zodpovědný za typ USH1D (MIM #601067) Bolz a spol. (Bolz et al., 2001) u postižených jedinců kubánské rodiny, kteří trpěli vrozenou hluchotou s vysoce variabilním stupněm degenerace sítnice. U postižených jedinců zjistili 2 různé mutace v genu *CDH23*. Závažný průběh onemocnění sítnice byl pozorován u jedinců homozygotních pro mutaci sestřihového místa, zatímco mírná RP byla přítomna u jedinců nesoucích homozygotní missense mutaci. U pacientů s kombinací dvou mutací byla pozorována variabilní exprese retinálního fenotypu. Bolz a spol. (Bolz et al., 2001) také identifikovali 2 mutace v genu *CDH23* u německého pacienta s USH. Gen *CDH23* se nachází na chromozómu 10q21.1, skládá se z 69 kódujících exonů s rozsahem více než 300 kb (Bolz et al., 2001) a kóduje protein cadherin 23. Je lokalizován v regionu obsahujícím lokusy pro nesyndromovou AR hluchotu DFNB12 a USH1D. Bialelické mutace v genu *CDH23* vedou k fenotypu DFNB12, USH1D, ale také k presbyakuzii (Bork et al., 2001). U presbyakuzie byl jako u jednoho z prvních genů spojovaných se ztrátou sluchu popsán efekt modifikujícího genu - *ATP2B2* pro Ca(2+)-ATPázu, jehož mutace p.(Val586Met) způsobuje těžkou ztrátu sluchu u pacientů s homozygotní mutací v genu *CDH23* (Schultz et al., 2005). Zároveň byla i u této jednotky popsána digenní příčina ztráty sluchu - mutace v genu *CDH15* spolu s mutací v genu *CDH23* můžou také způsobit fenotyp USH1D (Yan et al., 2010), a byl také popsán případ digennického působení *CDH23* a *GJB2*, které vedlo k fenotypu podobnému DFNB12 (de Brouwer et al., 2003). Zajímavostí také je, že jedinci homozygotní pro missense mutaci v genu *CDH23* mají mírnou formu RP (téměř nedetekovatelnou u jednoho pacienta). Mírná retinopatie byla také pozorována v rodině s mutací v sestřihovém místě (Bolz et al., 2001). USH1D se zdá být druhou nejčastější genetickou formou USH1 (Astuto et al., 2000).

Mutace v genu ***PCDH15*** (lokus 10q21.1) jsou příčinou USH typu 1F (MIM #602083) a také DFNB23 (MIM #609533) (Ahmed et al., 2008), byly prokázány i jako příčina digenní formy DFNB12 (MIM #601386) (Yan et al., 2010, Zheng et al., 2005) a hrají zřejmě roli v predispozici ke hlukem vyvolané ztrátě sluchu a presbyakuzii (Sakaguchi et al., 2009).

Předpokládá se, že spolu s typem USH1D jsou druhou nejčastější příčinou USH typu 1. Ačkoliv se lokus USH1F částečně překrývá s lokusem DFNB23, dosud nebylo publikováno žádné onemocnění způsobené mutacemi v genu *PCDH15* u DFNB23 rodin (Pennings, 2004). Gen *PCDH15* se skládá ze 48 exonů a kóduje protein protocadherin 15, který je členem cadherinové superrodiny. Protocadherin 15 obsahuje nejméně jednu transmembránovou doménu, cytoplazmatickou doménu a 11 extracelulárních Ca^{2+} vázících domén, které se pravděpodobně podílejí na buněčné adhezi závislé na Ca^{2+} . Hraje zásadní roli při udržování normální funkce sítnice a kochley. Mutační analýza 33 exonů genu *PCDH15* prokázala čtyři různé typy mutací, které byly detekovány u dvou konsangvinních pákistánských rodin (jedna sestřihová a jedna missense mutace), v rodině Hutteritů z Alberty (delece) a indických rodin s USH1F (nonsense mutace) (Ahmed et al., 2001, Alagramam et al., 2001b).

Ve studii Zheng et al. popsali 3 případy (ze 76) digenní dědičnosti u USH1 pacientů s mutacemi v genech *PCDH15* a *CDH23*. Všichni pacienti trpěli vrozenou hluchotou bez progresu, vestibulární dysfunkcí a různým nástupem RP (u pacienta z Velké Británie byl nástup RP v dětství, u pacienta evropského původu ve věku 8 let a u americké pacientky původem z Afriky se objevila RP ve věku 30 let). Tato studie prokázala, že oba proteiny (protocadherin 15 a cadherin 23) úzce interagují a jsou rozhodující pro normální organizaci svazku stereocilií. Digenické heterozygotní myši vykazovaly degeneraci stereocilií a ztrátu vláskových buněk (Zheng et al., 2015). V studii Schrauwen et al. byl popsán další případ digenní dědičnosti u rodiny s dvěma heterozygotními missense mutacemi v genu *PCDH15* a *USH1G* avšak s fenotypem nesyndromové hluchoty. Postižení pacienti měly oboustrannou hluchotu, a neměli žádné oční potíže, a ani vestibulární dysfunkci (Schrauwen et al., 2018).

Mutace v genu *USH1G* jsou zodpovědné za typ USH1G (MIM #606943). Gen *USH1G* se nachází na chromozomu 17q25.1, skládá se z 3 kódujících exonů a kóduje tvorbu proteinu SANS, který je produkován sensorickými vláskovými buňkami (Kikkawa et al., 2003). Výsledky studie Weila a spol. (Weil et al., 2003) naznačily, že SANS je zapojen do funkční proteinové sítě tvořené harmoninem, cadherinem 23 a myosinem VIIa, které jsou zodpovědné za správnou soudržnost rostoucích svazků vláskových buněk. Myosin VIIA jako první transportuje izoformu b proteinu harmoninu k stereociliím, ten pak váže cadherin 23 na aktinová filamenta rostoucích stereocilií. Toto propojení se zdá být kritické pro správnou formaci svazků vláskových buněk. Porucha v tomto procesu proto vede k pozorované dezorganizaci těchto svazků (Boěda et al., 2002) a následná dysfunkce tohoto komplexu může zapříčinit RP. Doposud však není známa přesná funkce SANS v sítnici (Weil et al., 2003).

Prvním popsáním případem USH1G byla velká rodina z Tuniska, u které Weil se spolupracovníky (Weil et al., 2003) identifikovali homozygotní mutaci v *USH1G* genu. Také identifikovali další homozygotní mutace a mutace ve složeně heterozygotním stavu v *USH1G* genu u postižených členů rodin z Německa a Jordánska.

Homozygotní mutace v genu *CIB2* (calcium and integrin binding family member 2) vedou k fenotypu USH1J (MIM #614869), avšak mohou také zapříčinit AR hluchotu DFNB48 (MIM #609439). Gen *CIB2* se skládá z 6 kódujících exonů a je lokalizován na chromozomu 15q25.1. Kódovaný protein je vápník vázající regulační protein, který interaguje s DNA dependentními protein kinázovými katalytickými podjednotkami a podílí se na udržování správné funkce fotoreceptorových buněk. První identifikována mutace byla původně publikována jako mutace v genu *PKDF117* u postižených členů velké konsangvinní turecké rodiny s USH1J typem (Ahmed et al., 2009). Riazuddin et al. (2012) identifikovali další homozygotní mutaci v *CIB2* genu.

3.3.2 USH2 geny

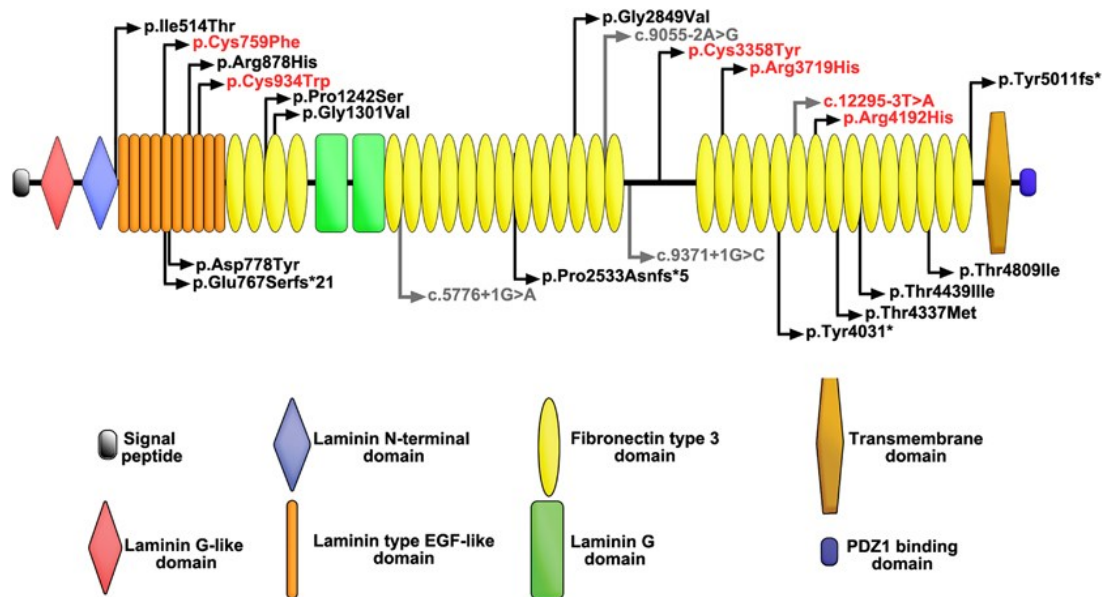
USH typu 2 způsobují mutace ve třech identifikovaných genech: *USH2A* (MIM *608400), *ADGRV1* (MIM *602851) a *WHRN* (MIM *607928), přičemž 55 - 90 % všech případů představují mutace v *USH2A* genu (Aller et al., 2006, Baux et al., 2007, Dreyer et al., 2008, McGee et al., 2010).

V roce 1995 Kimberling a spol. (Kimberling et al, 1995) identifikovali první lokus pro USH lokalizovaný na chromozomu 1q41. O tři roky později, Eudy a spol. (Eudy et al., 1998) identifikovali mutace v *USH2A* genu, které jsou příčinou typu USH2A (MIM #276901). Gen *USH2A* byl tak druhým USH genem identifikovaným pomocí metody pozičního klonování. V roce 2004 van Wijk a spol. identifikovali dalších 51 exonů genu *USH2A*, které dohromady kódují novou, dlouhou izoformu proteinu usherinu. Gen *USH2A* má dvě sestříhové izoformy: krátkou izoformu a, která obsahuje 21 exonů a dlouhou izoformu b tvořenou dalšími přidanými 51 exony na 3' konci (Obr. 10, F). Dlouhá izoforma genu *USH2A* kóduje protein dlouhý 5202 AMK, který je specificky exprimován ve fotoreceptorových a vyvíjejících se kochleárních vláskových buňkách. Protein usherin je nezbytný pro dlouhodobou údržbu fotoreceptorů sítnice a vývoj kochleárních buněk (van Wijk et al., 2004, Liu et al., 2007). Doposud bylo identifikováno více než 9000 variant v genu *USH2A* (<https://databases.lovd.nl/shared/genes/USH2A> ke dni 18.7.2019). Podle db HGMD se předpokládá, že více než 470 variant je patogenních. Mnohé z nich jsou však nesynonymní varianty a jejich patogenita

zůstává nejasná bez funkčního ověření nebo přesvědčivých genetických dat. Většina z těchto variant byla nalezena v jednom nebo v několika málo případech, kromě c.2299delG p.(Glu767Serfs*21) a c.2276G>T p.(Cys759Phe). Nejčastěji detekovanou mutací v *USH2A* genu je c.2299delG, která představuje 15 - 31 % případů (Dreyer et al., 2008, Garcia-Garcia et al., 2011, Le Quesne Stabej et al., 2012), přičemž se vyskytuje u asi 20 % rodin z Evropy a USA (Weston et al., 2000). Navíc je tato mutace přítomna v homozygotním stavu nejen u pacientů s USH2, ale také u pacientů USH3-like, kteří vykazují pozdní nástup progresivní hluchoty, která je občas spojena s vestibulární dysfunkcí (Liu et al., 1999).

Zajímavostí je slovinská populace, kde mutace c.2299delG celkem chybí, zatímco missense mutace c.11864G>A p.(Trp3955*) v *USH2A* byla zjištěna s frekvencí 84 % a jde přitom o nejčastější slovinskou *USH2A* mutaci (Bonnet et al., 2016, Zupan et al., 2019). Vysokou frekvenci této mutace u homozygotů ve slovinském genofondu *USH2A* lze vysvětlit jako efekt zakladatele, pravděpodobně v důsledku migrací ze sousedních populací. Mutace c.11864G>A byla popsána i v jiných evropských populacích, avšak s nízkou frekvencí, např. ve Francii 2,5 % a Itálii 6,5 %, s výjimkou německé populace, kde dosahuje 23 % (Bolz et al., 2013).

Bylo také prokázáno, že *USH2A* gen je zodpovědný za nejméně 8 % nesyndromové AR RP, kde majoritní mutací je c.2276G>T, která je asociována s AR RP bez ztráty sluchu (Rivolta et al., 2000, Bernal et al., 2003). To naznačuje existenci alel, které jsou pravděpodobně specifické pro toto nesyndromové onemocnění (specifické pro izolované poruchy sítnice), avšak doposud nebyl tento jev podrobně zkoumán.



Obr. 13: Protein usherin.

Schematické znázornění struktury proteinu usherinu s jednotlivými doménami a lokalizace pravděpodobně patogenních variant nalezených v kohortě 186 vyšetřených pacientů ve studii Lenassiho a spol. (Lenassi et al., 2015). Mutace dříve publikované u pacientů s USH2A typem jsou znázorněny pod schématem. Předpokládané „alely specifické pro onemocnění sítnice“ jsou znázorněné červeně.

Převzato z: Lenassi et al., 2015.

Mutace genu *ADGRV1* (adhesion g protein-coupled receptor v1), označovaného také jako *GPR98*, se vyskytují u 3 - 5,6 % případů (Besnard et al., 2012, Weston et al., 2004) a jsou zodpovědné za formu USH2C (MIM #605472). Gen *ADGRV1* se nachází na chromozomu 5q14.3 a skládá se z 90 kódujících exonů.

Homozygotní a složeně heterozygotní mutace genu *WHRN* (whirlin, označován také jako *DFNB31*) nejsou příčinou jenom typu USH2D (MIM #611383), ale také nesyndromové AR hluchoty DFNB31 (MIM #602084) (Tlili et al., 2005). Ebermann a spol. (Ebermann et al., 2007) našli dvě mutace u německé rodiny trpící formou USH2. Pozdější mezinárodní studie však v souboru 195 pacientů s USH nezjistila žádné patogenní mutace v tomto genu (Aller et al., 2010). Mutace v genu *WHRN* jsou vzácnou příčinou recesivní ztráty sluchu a USH s výskytem 0 % - 1,3 % (Besnard et al., 2012, Le Quesne Stabej et al., 2012).

3.3.3 USH3 geny

Nejméně častý klinický typ USH3 je asociován s mutacemi v genu *CLRN1* (clarin 1, MIM *606397), který byl donedávna jediným popsaným genem zodpovědným za USH3 (Joensuu et al., 2001). Tento gen je lokalizován na chromozomu 3q25.1 (Adato et al., 2002, Joensuu et al., 2001), skládá se ze šesti exonů a mutace v tomto genu způsobují genetický typ USH3A (MIM #276902). Mutace c.300T>G p.(Tyr176*), také známa jako Fin_{major}, je nonsense mutací zodpovědnou za většinu případů USH3 mezi Finy a analýza haplotypu naznačuje, že jde o zakladatelskou mutaci ve finské populaci (Ness et al., 2003, Joensuu et al., 2001, Fields et al., 2002). Další popsaná prevalentní mutace v genu *CLRN1* c.144T>G byla nalezena jenom v populaci aškenázských židů (Ness et al., 2003, Adato et al., 2002, Fields et al., 2002). Mutace v genu *CLRN1* mohou také zapříčinit formu nesyndromové RP - RP61 (MIM #614180) (Khan et al., 2011).

Další klinický typ USH3B (MIM #614504) je asociován s mutacemi v genu *HARS* (histidyl-tRNA synthetase 1, MIM *142810), které poprvé popsali Puffenberger a spol. (Puffenberger et al. 2012) ve své studii u dvou pacientů.

Eisenberger a spol. (2012) a Yoshimura a spol. (2015) (Eisenberger et al., 2012, Yoshimura et al., 2015) identifikovali bíalelické patogenní varianty genu *ABHD12* u pacientů, kteří byli původně klinicky diagnostikováni jako typ USH3-like. Oba autoři diagnostikovali tyto pacienty na základě souboru příznaků, které zahrnovaly polyneuropatii, ztrátu sluchu, ataxii, RP a kataraktu s časným nástupem (zkratka PHARC), a doporučili, aby se PHARC bral v úvahu při diferenciální diagnostice USH, zejména u pacientů USH3-like s progresivní poruchou sluchu a rovnováhy. Zajímavostí je studie Suna a spol. (Sun et al., 2018), kteří provedli screening 119 klinicky diagnostikovaných pacientů s USH a identifikovali bíalelické patogenní varianty v *ABHD12* jenom u jednoho jedince. V další studii Li a spol. (Li et al., 2019) identifikovali u dvou postižených členů čínské rodiny s klinickou diagnózou USH3 nonsense variantu c.249C>G v genu *ABHD12* v homozygotním stavu pomocí metody celoexomového sekvenování. Gen *ABHD12* je exprimován ve vnitřním uchu a v retině a jeho možné interakce s USH proteiny vyžadují další zkoumání (Nolen et al., 2020, Fiskerstrand et al., 2010). Kauzalita genu *ABHD12* u pacientů s USH3 je tudíž i nadále sporná, a je předmětem dalšího zkoumání.

3.4 Prognóza, terapie a diagnostika

Ačkoliv je genová terapie ve stadiu experimentálních a pro gen *MYO7A* i klinických studií, zatím není k dispozici žádný lék, který by progresi onemocnění zastavil a navrátil zrak takto postiženým pacientům. Terapeutický přístup je omezen na zpomalení degenerativního procesu zvýšenou ochranou před slunečním světlem (zejména UV zářením), léčbu komplikací (katarakta, edém makuly) a pomoc pacientům vyrovnat se se sociálním a psychologickým dopadem zrakového postižení. Projevy i průběh onemocnění jsou individuální. Léčba USH je tedy v tuto chvíli symptomatická a podpůrná.

V rámci vitamínoterapie předepisují v USA často někteří oftalmologové pacientům s USH vysoké dávky vitamínů, především vitamínu A, který může zpomalit, avšak ne zastavit progresi RP. Dosavadní studie naznačily možnou roli vitamínů nebo minerálních látek při prevenci progresu RP a údaje ze studií obecně podporují souvislost mezi výživovými faktory, zejména faktory s vitamínem A, a riziky RP (Berson et al., 1993, Massof et al., 1993, Sibulesky et al., 1999, Berson et al., 2012). I když se tedy nejedná o léčbu v pravém slova smyslu, může podávání vitamínu A alespoň trochu zpomalit zhoršování vidění. Vzhledem k tomu, že podávání vysokých dávek vitamínu A má určitá rizika a vzhledem k tomu, že zpomalení progresu onemocnění bylo velmi mírné, není tento postup v řadě Evropských zemích aktivně lékaři doporučován. Také ženám s RP, které plánují rodičovství nebo jsou těhotné, se nedoporučuje doplňovat vitamín A, protože vysoké dávky vitamínu A mohou být spojeny s vrozenými vývojovými vadami dětí (Zhao et al., 2019). Z uvedeného vyplývá, že účinek vitamínoterapie u USH pacientů nebyl doposud výrazně prokázán a je předmětem dalšího zkoumání.

Nadějný přístup v léčbě onemocnění oka, obzvláště u chorob sítnice, představuje genová terapie, při které se přidává do buněk správný (chybějící) protein a tím dochází k „nahrazení genu“. Velkým úspěchem v této oblasti je jeden z nejdražších léků na světě - Luxturna®, který se používá k léčbě dědičné retinální dystrofie, která je způsobena mutacemi v genu *RPE65*. Lék Luxturna obsahuje léčivou látku voretigen neparvovec, což je modifikovaný adeno-asociovaný virus (AAV), který obsahuje funkční kopii genu *RPE65*. Pomocí jednorázové subretinální injekce voretigenu neparvovec podávané do každého oka je takto funkční gen dopraven AAV vektorem do buněk sítnice. Tento produkt genové terapie je schválen v několika zemích po celém světě pro léčbu ztráty zraku u dětí a dospělých s

potvrzenou bílelickou mutací v *RPE65* a s dostatečným množstvím životaschopných buněk sítnice (Russell et al., 2017, Kang, Scott, 2020).

Jednou z probíhajících klinických studií je výzkum nejzávažnější formy syndromu s vrozenou ztrátou sluchových funkcí, s postižením zrakových funkcí během první dekády života a s vestibulární areflexií - USH1B (MIM #276900), která je způsobená mutacemi v *MYO7A* genu, jehož produkt hraje v buňkách fotoreceptorů a retinálního pigmentového epitelu (RPE) důležitou roli v transportu opsinu. V rámci metod genové terapie se jednalo o aplikaci virového vektoru do subretinálního prostoru (mezi vrstvu fotoreceptorů a vrstvu buněk RPE), kde pro přenos *MYO7A* genu byly zvoleny konkrétně lentivirové vektory, které mají větší kapacitu pro přenášený gen, avšak nižší účinnost transdukce ve fotoreceptorech než vektory AAV. Na myším modelu bylo prokázáno obnovení transportu opsinu (Hashimoto et al., 2007), což vedlo v roce 2012 k zahájení klinické studie fáze I/IIa s lékem UshStat, která byla ale sponzorem v roce 2019 zastavena.

Vědci se v současné době snaží identifikovat další geny, které způsobují USH a určují funkce těchto genů. Mezi současné diagnostické strategie pro USH patří:

- a) MLPA pro detekci velkých delecí v jednotlivých genech,
- b) cílené NGS sekvenování panelu popsanych kauzálních genů,
- c) celoxomové sekvenování (WES),
- d) celogenomové sekvenování (WGS).

Nejvíce využívaným přístupem v současnosti je NGS, které umožňuje efektivní sekvenaci celého genomu, exomu nebo specifických oblastí genomu. Avšak i tato metoda má své limity, a nedokáže přesně zjistit určité typy genomických změn, které mohou způsobit onemocnění, jako jsou translokace nebo inverze, opakující se expanze (např. trinukleotidů nebo hexanukleotidů), změny ve většině regulačních oblastí (promotorové oblasti) nebo změny hluboko v intronech.

Výzkum v oblasti patogeneze USH povede ke zlepšení genetického poradenství a včasnou a přesnou diagnózu, což vytváří prostor pro interdisciplinární přístup při tvorbě rehabilitačního a vzdělávacího programu pro tyto pacienty s duálním sensorickým postižením. Použití nových molekulárně genetických technik NGS u souboru českých a slovenských pacientů s USH umožní u častěji se opakujících typů upřesnit klinický popis a dále dovolí získat unikátní molekulárně epidemiologická data týkající se onemocnění USH v ČR a SR.

II. CÍLE PRÁCE

V době zahájení této práce nebyla rutinní diagnostika Sticklerova a Usherova syndromu v ČR a SR dostupná a jedinou možností bylo vyšetření zasílané do zahraničí. Doposud nebyla provedena žádná studie, která by určila prevalenci STL a USH a nebyly dostupné ani spolehlivé údaje o výskytu STL a USH v ČR a SR. Hlavním cílem této práce je získat nové vědomosti o molekulární podstatě hluchoslepoty a prevalenci mutací v kauzálních genech pro její nejčastější hereditární formy. Cílem práce je zpřesnění klinické i laboratorní diagnostiky těchto syndromů. Tato práce má ambici rovněž přispět ke zlepšení informovanosti zejména odborné veřejnosti o možnostech diagnostiky těchto vzácných syndromů.

Shrnutí hlavních cílů této práce:

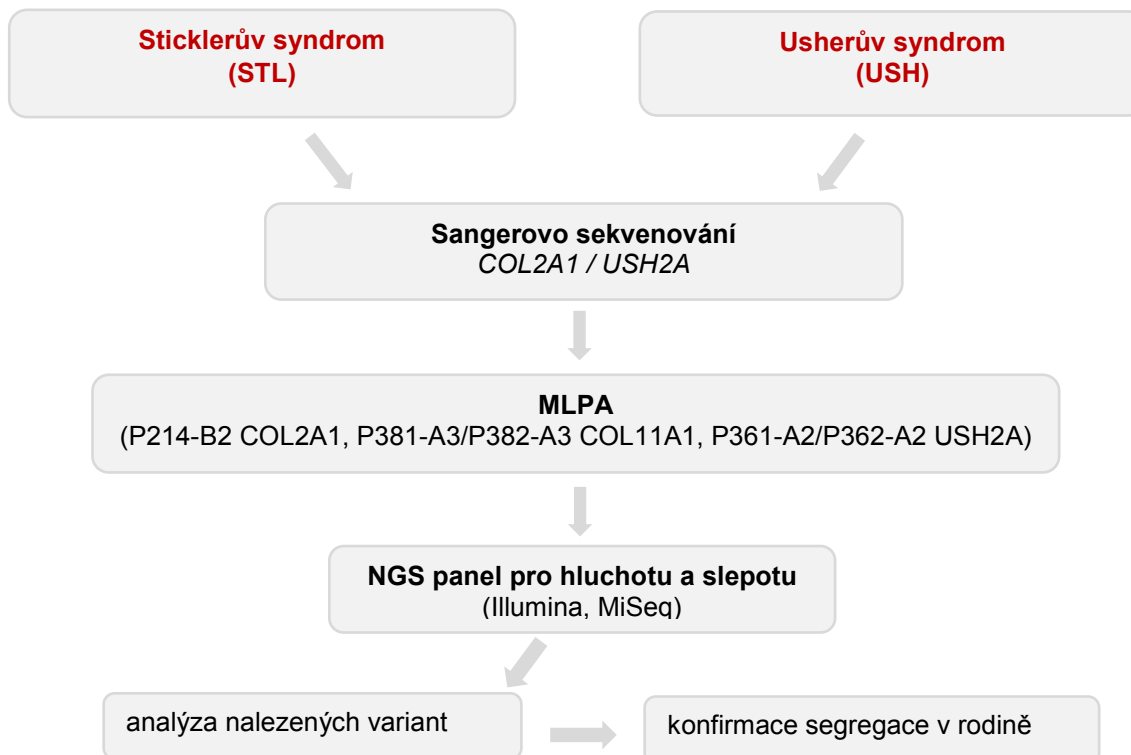
1. Zjistit absolutní a odhadnout relativní počet pacientů s klinicky stanovenou diagnózou Sticklerova (STL) a Usherova (USH) syndromu v ČR a SR.
2. Shromáždit a molekulárně geneticky vyšetřit soubor pacientů s přesvědčivými klinickými příznaky STL a USH a získat tak nové a originální poznatky o molekulární podstatě obou syndromů.
3. Na základě výsledku provedených vyšetření stanovit frekvenci a spektrum mutací v genech pro oba syndromy.
4. Zjistit frekvenci a spektrum variant v dosud popsaných genech na jednotlivých typech obou syndromů u českých a slovenských pacientů a stanovit tak roli jednotlivých genů v patogenezi obou syndromů.
5. Korelovat nalezené mutace s klinickým obrazem u jednotlivých pacientů a na základě výsledků zpřesnit klinická kritéria pro výběr pacientů k molekulárně genetické analýze obou syndromů a zlepšit klinickou diagnostiku a tím i záchyt STL a USH.
6. Vypracovat doporučený optimální postup pro efektivní klinickou i DNA diagnostiku těchto vybraných vzácných onemocnění asociovaných s kombinovanou poruchou sluchu a zraku a na jeho základě dále vyhledávat další pacienty a rodiny vhodné pro molekulárně genetickou diagnostiku STL a USH.

III. MATERIÁL A METODY

1. Strategie genetického testování (workflow)

V době, kdy byla zahájena tato studie, nebylo NGS sekvenování prakticky dostupné, proto bylo provedeno nejdříve testování nejčastějších kauzálních genů pomocí Sangerova sekvenování, a to konkrétně genu *COL2A1* pro STL a genu *USH2A* pro USH.

V případě negativního výsledku Sangerova sekvenování jsme pokračovali s detekcí rozsáhlých delecí a duplikací v genech *COL2A1* a *COL11A1* pro STL a v genu *USH2A* pro USH pomocí metody MLPA. V případě negativního výsledku vyšetření pomocí metody MLPA a splnění striktních diagnostických kritérií, byli postupně všichni pacienti zařazeni do testování dalších genů v námi navrženém specifickém panelu genů pro hluchotu a slepotu pomocí metody NGS (výčet všech genů viz Příloha 3). Všechny výsledky analýzy byly podrobně zkoumány pomocí dostupných údajů z různých genetických databází (HGMD a jiné), predikčních programů a údajů v literatuře. Varianty, které byly vyhodnocené jako patogenní nebo pravděpodobně patogenní, byly confirmovány pomocí Sangerova sekvenování. Následovalo dovyšetření příbuzných v rodině na sledování segregace nalezené varianty a konečné potvrzení diagnózy.



Obr. 14: Strategie genetického testování pro STL a USH.

2. Soubor vyšetřených pacientů

Sběr vzorků DNA a dat o pacientech s klinickou diagnózou STL a USH probíhal kontinuálně od roku 2014 a v současné době stále probíhá. K potvrzení diagnózy na molekulární úrovni byl použit reprezentativní soubor 75 pacientů s diagnózou STL a 80 pacientů s diagnózou USH, kteří byli doporučeni klinickými genetiky k molekulárně genetickému vyšetření v letech 2014 - 2020 z různých genetických pracovišť v České a Slovenské republice (Praha, Hradec Králové, Jihlava, Zlín, České Budějovice, Liberec, Ústí nad Labem, Brno, Ostrava, Olomouc, Bratislava, Košice), se kterými jsme zahájili spolupráci. Všichni pacienti museli splňovat diagnostická kritéria pro klinické příznaky daného syndromu a absolvovali genetickou konzultaci, kde jim byla vysvětlena podstata molekulárně genetického vyšetření a našeho výzkumu, se kterým vyjádřili souhlas podpisem informovaného souhlasu. Přednostně byli vyšetřováni pacienti s pozitivní rodinnou anamnézou, v případě sporadického výskytu byli zařazeni pouze pacienti s jasnými a přesvědčivými klinickými příznaky obou syndromů. U některých pacientů trvalo klinické podezření již velmi dlouhou dobu, avšak diagnóza nebyla potvrzena na úrovni DNA z důvodu nedostupnosti genetického testování těchto syndromů v ČR a SR. Po dokončení molekulárně genetických vyšetření následovala genetická konzultace se sdělením a vysvětlením výsledků vyšetření všem pacientům a jejich rodinám. U pacientů s prokazatelně patogenními mutacemi byla v rámci genetické konzultace nabídnuta možnost dovyšetření rodinných příslušníků v riziku. Všem osobám nesoucím patogenní mutace v heterozygotním stavu bylo také nabídnuto prekoncepční genetické poradenství.

Ke všem analýzám byla použita genomová DNA izolovaná z leukocytů z periferní krve odebrané od všech jednotlivců a příslušných rodinných příslušníků po získání informovaného souhlasu s genetickým testováním. Pacienti zařazení do testování panelů genů pro hluchotu a slepotu pomocí NGS podepsali souhlas s využitím jejich DNA vzorku pro další výzkumné účely a se skladováním DNA pro tyto účely. Výzkum byl schválen etickou komisí 2. LF UK. V případě detekce varianty v jednom ze STL a USH genů u pacienta byli testováni další členové rodiny pro sledování segregace varianty v rodině s daným fenotypem (opět pouze s informovaným souhlasem).

V průběhu druhého roku této studie jsme zjistili, že na pracovišti oční genetiky VFN působí tým zabývající se též výzkumem USH, který získal grant GAUK ve stejném roce a na stejnou dobu, jako náš tým („Molekulárně genetická charakteristika Usherova syndromu u

pacientů českého původu“, GAUK č. 4315/2015, hl. řešitel MUDr. B. Kousal, školitel doc. MUDr. P. Lišková, Ph.D., pracoviště Oční klinika 1. LF UK a VFN v Praze). Vzhledem k tomu, že je USH velmi vzácné onemocnění a práce dvou oddělených týmů na takto úzké problematice na půdě jedné univerzity by byla kontraproduktivní, navázali jsme úzkou vzájemnou spolupráci s tímto pracovištěm a postupovali jsme nadále společně. První výsledky naší spolupráce s pracovištěm VFN však byly úspěšně završené publikací „SD-OCT imaging as a valuable tool to support molecular genetic diagnostics of Usher syndrome type 1.“ v časopise JAAPOS (Kremlíkova Pourová et al., 2018), ve které jsem spoluautorkou. V publikaci jsou uvedeny výsledky naší spolupráce, dedikace však je uvedena ke grantu GAUK 4315/2015, neboť hlavním tématem článku byly oční nálezy. Z této spolupráce je zároveň připravována i souhrnná publikace do časopisu s vyšším IF, která bude referovat o více než 30 pacientů českého původu s Usherovým syndromem. V této disertační práci jsou sděleny výsledky pacientů s USH syndromem, kteří byli molekulárně geneticky vyšetřeni na našem pracovišti. Některá specifická vyšetření (například haplotypové analýzy) pacientů s USH byla provedena ve spolupráci s laboratoří Centra oční genetiky, jak je vždy na příslušném místě v textu uvedeno. Na těchto vyšetřeních se podílela zejména Ing. Lubica Ďudáková, Ph.D.

Během PhD studia jsem od počátku samostatně prováděla sběr klinických dat, izolaci DNA, návrhy oligonukleotidových primerů, PCR, Sangerovo sekvenování, návrh panelu NGS, analýzy NGS včetně analýzy dat, interpretaci nálezů a formulovala jsem závěry do molekulárně genetických výsledkových zpráv, publikací a této disertační práce. Od začátku roku 2017 dosud, tedy po dobu mé mateřské dovolené, navázali na mou práci a prováděli analýzy ve spolupráci se mnou kolegové z Oddělení molekulární genetiky Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol pod záštitou MUDr. Anny Křepelové, CSc a to zejména Mgr. Věra Románková, Mgr. Pavel Votýpka a technický personál laboratoře. Cennou technickou podporu poskytl též MUDr. Marek Turnovec. U 3 rodin (S13, S17 a U13) proběhlo vyšetření některých jejích členů ve spolupráci s Mgr. Janou Pospíšilovou, Ph.D, a Ing. Arpádem Bódayem z Laboratoře molekulární genetiky Agel a.s. Moje školitelka se podílela zejména na výběru, klinickém vyšetření a hodnocení pacientů, získávání souhlasu pacientů s účastí ve studii, sdělování výsledků, korelaci genotypu s fenotypem a korekci mnou sepsaných rukopisů.

3. Metody molekulárně genetické analýzy

3.1 Izolace DNA

Genomová DNA byla izolována ze vzorku periferní krve ve zkumavce s EDTA pomocí automatického izolátoru MagNA Pure (Roche, Basel, Švýcarsko) podle návodu uvedeného výrobcem. Přijaté vzorky DNA z jiných genetických pracovišť byly extrahovány pomocí DNA mini kitu (QIAamp® DNA Mini kit, Qiagen, Maryland, USA). DNA pro prenatalní testování byla izolována z kultivovaných a nativních buněk choriových klků (CVS) nebo plodové vody. Kvalita a koncentrace DNA byla kontrolována pomocí spektrofotometru NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA).

3.2 Sangerovo sekvenování

Tzv. „sekvenování první generace“ je dodnes nejčastěji používanou metodou molekulárně biologických analýz a představuje zlatý standard k určení přesného nukleotidového pořadí fragmentu DNA amplifikovaného pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Tato metoda byla využita ke genetické analýze genu *COL2A1* a *USH2A* v době zahájení této práce (2014), kdy sekvenování pomocí Sangerova ještě nebylo plně nahrazené sekvenováním NGS, tak jak je tomu dnes. Kromě toho bylo Sangerovo sekvenování také použito k verifikaci nalezených variant z NGS sekvenování, a dále pro ověření přítomnosti nalezených variant u příbuzných v segregáčních analýzách.

Oligonukleotidové primery pro každý exon byly navrženy pomocí softwaru Vector NTI® (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Sekvence použitých primerů pro *COL2A1* a *USH2A* geny jsou uvedeny v Příloze 1 a 2. Veškeré oligonukleotidy byly syntetizovány firmou Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany). K amplifikaci DNA byl navržen vlastní, maximálně účinný teplotní protokol pomocí polymerázové řetězové reakce. PCR produkty byly naamplifikovány v objemu 20 µl pomocí PCR mixu obsahujícího 1x FastStart PCR pufr, 1,5mM MgCl₂, všechny čtyři dNTP, 200 µM každý (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA), 50 pmol forward a revers primeru, 60 ng DNA, 1 U FastStart Polymerázy a PCR-grade vodu (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Pro každou PCR byla rovněž připravena reakce bez templátu, která sloužila jako kontrola kontaminace pracovního prostředí a použitých reagensů. PCR produkty byly analyzovány gelovou elektroforézou a vizualizovány

barvením pomocí GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, CA, USA) na 1 % agarózovém gelu a dále přečištěny pomocí FastAP Thermosensitivní Alkalické Fosfatázy a Exonukleázy I (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA), aby se eliminovaly neinkorporované PCR primery a dNTPs. Poté byly produkty sekvenovány pomocí BigDye Terminator v3.1 sekvenačního kitu (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) s použitím sekvenačních primerů, které byly shodné s amplifikačními primery tak, jak je uvedeno v Příloze 1 a 2. Po sekvenační reakci bylo provedeno odstranění nadbytečných terminátorů kitem BigDye XTerminator™ Purification Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) podle návodu uvedeného výrobcem. Sekvenační produkty byly analyzovány za použití kapilární elektroforézy na přístroji ABI 3500 (s použitím 50 cm kapiláry) a programu Sequencing Analysis v5.3 (vše Applied Biosystems, Forster City, CA, USA).

Všechny identifikované varianty byly hodnoceny dle současného stavu znalostí pomocí dostupných populačních databází a *in silico* predikčních programů (blíže popsáno v kapitole 3.4.2). Každá nově identifikovaná varianta byla potvrzena sekvenováním druhého nezávislého PCR produktu a její přítomnost v české populaci byla ověřena v dostupných databázích, včetně databáze českého Národního centra lékařské genomiky. Sekvenogramy do kazuistik v Příloze 4 a 5 byly vytvořeny pomocí volně stažitelného softwaru ChromasPro (<http://technelysium.com.au/wp/chromaspro/>).

Tab. 7: Složení PCR mixu.

Zásobní roztok	Složení PCR - výsledná koncentrace	Objem na 1 vzorek (μl)
FastStart pufr 10x	1x	2
MgCl ₂ 25mM	1,5mM	1,2
dNTPs 10mM (každý)	200μM	0,4
F + R primer 10μM (oba)	2μM	2
FastStart polymeráza 5 U/μl	-	0,2
H ₂ O	-	12,2
DNA (30ng/μl)	-	2
Celkový objem	-	20

3.2.1 Mutační analýza genu *COL2A1* pro Sticklerův syndrom

Genetická analýza byla nejprve provedena přímým Sangerovým sekvenováním všech 54 kódujících exonů *COL2A1* genu, včetně přilehlých intronových sekvencí. Pomocí

speciálně navrženého PCR protokolu byly amplifikovány vyšetřované oblasti genu s využitím specifických primerů v jedné PCR reakci (Tab. 8). Celkově se jednalo o 17 PCR produktů o velikosti 243-1631 bp, které pokrývaly celou kódující oblast genu (délka produktů a použité sekvenační primery, včetně případných vnitřních sekvenačních primerů jsou uvedeny v Příloze 1). Získané sekvence byly porovnány s referenčními sekvencemi genu *COL2A1* NG_008072.1 a NM_001844.4

Tab. 8: Program pro PCR amplifikaci genu *COL2A1*.

95 °C	8 min	
95 °C	30 s	
58 °C	30 s	35 x
72 °C	45 s	
12 °C	∞	

3.2.2 Mutační analýza genu *USH2A* pro Usherův syndrom

Genetická analýza byla provedena přímým Sangerovým sekvenováním všech 72 kódujících exonů *USH2A* genu pro USH, včetně přilehlých intronových sekvencí. Vzhledem k tomu, že se jedná o rozsáhlý gen (800503 bp), byla nejprve vždy provedena genetická analýza nejčastěji se vyskytujících variant v genu pro *USH2A*. Byly navrženy 3 postupné mutační screeniny. Nejprve jsme screeningem 1 vyšetřili exony 6, 7, 13 a 20, ve kterých se nejčastěji nacházejí patogenní mutace včetně rekurentních mutací c.2299delG (nejčastější mutace) a c.4338_4339delCT (2. nejčastější mutace) dle literárních zdrojů (Liu et al. 1999, Ebermann et al., 2009, Leroy et al. 2001, Pennings et al. 2004, Aller et al. 2006, Dreyer et al. 2008). V případě negativního výsledku (bez nálezu mutace) jsme pokračovali s dovyšetřením dalších exonů v screeningu 2, konkrétně se jednalo o exony 4, 9, 14, 32, 53, 61, 64, ve kterých byly popsány kauzální mutace pro USH2, z nichž nejčastější je mutace c.11864G>A v exonu 61 (van Wijk et al., 2004, Le Quesne Stabej et al., 2012). V případě negativního výsledku screeningu 2 jsme pokračovali se screeningem 3 - analýzou zbylých exonů genu *USH2A*, konkrétně exony 2, 3, 5, 8, 10-12, 15-19, 21-31, 33-52, 54-60, 62, 63, 65-72. Pomocí speciálně navrženého PCR protokolu (Tab. 9) byly amplifikovány postupně vyšetřované oblasti genu s využitím specifických primerů. Celkově se jednalo o 68 PCR produktů o velikosti 337-1616 bp (délka produktů a použitý sekvenační primer jsou uvedeny v Příloze 2). Všichni pacienti byly také vyšetřeni na přítomnost časté mutace lokalizované

hluboko v intronu 40: c.7595-2144A>G. Tato intronová varianta vytváří vysoce kvalitní sestříhové donorové místo a vede k inzerci pseudoexonu (PE40) do zralého transkriptu, u kterého se předpokládá, že povede k předčasnému ukončení translace a vzniku zkráceného nefunkčního proteinu usherinu (Vache et al., 2012).

Všechny získané sekvence byly porovnány s referenční sekvencí genu *USH2A* NG_009497.2, NM_206933.4.

Tab. 9: Program pro PCR amplifikaci genu *USH2A* (všechny 3 mutační screeniny).

95 °C	8 min	
95 °C	30 s	
60 °C	30 s	38 x
72 °C	30 s	
12 °C	∞	

3.3 MLPA

MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) je metoda, která se používá pro stanovení relativního počtu kopií až 60 sekvencí DNA v jediné multiplexní PCR reakci. Může sloužit k identifikaci širokého spektra genomických změn, především se však používá na detekci delecí/duplikací většího rozsahu, např. delecí/duplikací exonů jednotlivých genů nebo delecí/duplikací oblastí jednotlivých chromosomů. Principem MLPA je navázání oligonukleotidových sond na cílovou sekvenci DNA na základě jejich komplementarity. Každá sonda se skládá ze dvou oligonukleotidů. Po hybridizaci na cílové místo jsou oligonukleotidy spojeny ligací. Pouze spojené sondy jsou po denaturaci amplifikovány pomocí klasické PCR reakce za použití jednotného páru primerů. Jeden PCR primer je fluorescenčně značený a umožňuje tak vizualizaci amplifikačních produktů během separace fragmentů. Namnožené sondy jsou rozděleny kapilární elektroforézou na základě jejich různé délky, čímž se získá specifický elektroforeogram. Relativní výška každého vrcholu (píku) jednotlivých sond ve srovnání s relativní výškou píků sond v různých referenčních vzorcích DNA odráží relativní počet kopií odpovídající cílové sekvenze ve vzorku. Delece jedné nebo více cílových sekvencí vede ke snížení výšky píku, zatímco zvýšení výšky píku svědčí pro duplikaci.

Pro MLPA reakci bylo použito 5 µl DNA pacienta se vstupní koncentrací v rozmezí 50-100 ng. Po denaturaci byla tato DNA hybridizována se sondami pro jednotlivé exony genu *COL2A1* (SALSA MLPA P214 COL2A1 probemix) a *COL11A1* (SALSA MLPA P381, P382

COL11A1 probemixy) pro STL a genu *USH2A* (SALSA MLPA P361, P362 *USH2A* probemixy) pro USH, od firmy MRC Holland, Amsterdam, Nizozemsko. Výsledné DNA fragmenty byly analyzovány kapilární elektroforézou na sekvenátoru ABI 3500. Intenzita signálů jednotlivých fragmentů u patientské DNA byla porovnávána s kontrolní DNA a výsledky byly získány pomocí speciálního in-house softwaru E-mlpa (emlpa.lf2.cuni.cz/) a paralelně i pomocí volně dostupného softwaru Coffalyser (MRC Holland, Amsterdam, Nizozemsko, <https://support.mlpa.com/>).

3.4 Sekvenování nové generace (NGS)

Termín sekvenování nové generace, next-generation sequencing (NGS), označuje technologii též nazývanou masivně paralelním sekvenováním, která byla poprvé použita v komerčně dostupném zařízení v roce 2005 a od té doby postupně nahrazuje Sangerovo sekvenování. Tato univerzální technika pro charakterizaci a kvantifikaci nukleových kyselin je založena na masivním paralelním sekvenování mnoha fragmentů DNA o určité délce, z nichž je každý amplifikován samostatně a mnoho takto vzniklých kopií každého fragmentu je poté čteno různými technologiemi podle použité platformy. NGS umožňuje paralelní testování většího množství genů (cílené sekvenování), nebo celého exomu (exomové sekvenování) nebo celého genomu (celogenomové sekvenování) spolu s testováním většího množství pacientů v jednom experimentu. Zavedení metody masivního paralelního sekvenování umožnilo v oblasti genomiky nebyvalý rozvoj, jelikož bylo náhle možné osekvenovat celý lidský genom za zlomek ceny a času v porovnání s do té doby používanými metodami (Voelkerding et. al., 2009).

Pacienti byli zařazeni do testování námi navrženého panelu genů pro hluchotu a slepotu (viz Příloha 3), který byl vyvinutý pro účely genetického testování pacientů s kombinovaným postižením sluchu a zraku a tudíž i pro účely této disertační práce. Na základě studia literatury bylo vybráno celkem 231 genů prokazatelně spojených s poruchou sluchu a/nebo zraku. Panel zahrnoval všechny v dané době popsané geny asociované se STL - *COL2A1* (NM_001844.4), *COL9A1* (NM_001851.4), *COL9A2* (NM_001852.3), *COL9A3* (NM_001853.3), *COL11A1* (NM_080629.2), *COL11A2* (NM_080680.2) a *VCAN* (NM_004385.4) a s USH - *ADGRV1* (NM_032119.4), *CDH23* (NM_022124.6), *CIB2* (NM_006383.4), *CLRN1* (NM_001195794.1), *MYO7A* (NM_000260.4), *PCDH15* (NM_033056.4), *PDZD7* (NM_032429.2), *USH1C* (NM_153676.3), *USH1G*

(NM_173477.5), *USH2A* (NM_206933.4), *WHRN* (NM_015404.4). Seznam všech genů je uveden v Příloze 3.

3.4.1 Target enrichment, příprava knihovny a vlastní NGS sekvenování

K NGS sekvenování panelu genů je nejprve potřeba vytvořit návrh prób k cílenému obohacení (target enrichment) vybraných cílových oblastí zájmu. Za použití těchto prób je pak vytvořena DNA knihovna pro vlastní NGS sekvenování. Sondy byly navrženy a syntetizovány firmou NimbleGen-Roche (Basel, Švýcarsko) a byly navrženy pro použití kitu MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina, CA, USA) pro přípravu NGS knihoven SeqCap EZ choice library (NimbleGen-Roche, Basel, Švýcarsko) pro sekvenování na sekvenátoru MiSeq (Illumina, CA, USA) s délkou čtení 150 bp. Navržené sondy byly následně využity k obohacení vzorku o cílové oblasti genomu podle protokolu NimbleGen SeqCap Target Enrichment pro sekvenování na platformě Illumina. SeqCap EZ Choice Library system je metoda obohacování cílových sekvencí, která pokrývá region zájmu mnoha oligomery (80-105 bp dlouhými) DNA prób (www.nimblegene.com). Tím je zajištěno dostatečné uniformní vychytání cílových sekvencí o velikosti 7-50 Mb. Systém hybridizačních DNA prób lze využít pro jakékoli cílové sekvence v rozsahu kapacity a v jeho rámci jsme navrhli vlastní panel genů obsahujících všechny v danou dobu (rok 2018) známé geny pro hluchoslepotu, ale i izolovanou poruchu zraku a sluchu (viz Příloha 3). Návrh sond byl vytvořen tak, aby pokrýval všechny kódující exony a přilehlé oblasti genů plus 5' a 3' UTR oblasti. Próby navržené v jednotlivých krocích byly nakonec spojeny do jednoho velkého designu.

Příprava knihovny spočívá v několika za sebou následujících krocích: fragmentace genomické DNA, hybridizace navržených prób na cílené vybrané úseky DNA a amplifikaci cílových oblastí.

Důležitým faktorem při přípravě knihovny pro následné kvalitní sekvenační data je kvalita a kvantita vstupní DNA. Vstupní koncentrace genomové DNA vzorků byla 50 ng a byla změřena na přístroji Qubit® 2.0 Fluorometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) z důvodů vyšší specificity oproti měření založeném na absorbanci UV světla. Použita byla výhradně DNA bez přítomnosti EDTA (v případě zaslané již izolované DNA z jiného pracoviště byla tato ještě přečištěna a eluována do EB pufru z QIAquick Gel Extraction Kitu (neobsahuje EDTA)). Během přípravy knihovny je DNA naštěpena a na její upravené konce jsou ligací připojeny pomocné adaptéry, které umožňují PCR amplifikaci. Během této

polymerázové řetězové reakce je každý fragment mnohonásobně zkopírován a je tak připraven k samotnému sekvenování (Weiss et al., 2013). Na přípravu plně automatizované konstrukce knihovny DNA za 1,5–3 hodiny s nemechanickou fragmentací byl použit KAPA Library Preparation Kit podle přesného postupu doporučeného výrobcem. Tento systém umožňuje univerzální a efektivní fragmentaci DNA pro rychlou přípravu knihoven pro Illumina® sekvenování. Kit obsahuje všechny enzymy a reakční pufrы vyžadované pro enzymatickou fragmentaci DNA, úpravu konců (tzv. end reapiр) a A-tailing, ligaci adaptorů a amplifikaci knihovny.

Pro sekvenování nové generace byl zvolen přístroj MiSeq® od firmy Illumina, který využívá tzv. metodu sekvenování syntézou, kdy jsou po vytvoření klastrů k adaptérům na koncích fragmentů hybridizovány sekvenační primery a do průtokové komůrky je přivedena směs polymerázy a nukleotidů, které jsou označeny fluorescenční značkou. Jedná se o přístup masivně paralelního sekvenování, kdy dochází k detekci jednotlivých nukleotidů v pořadí, v jakém jsou inkorporovány do rostoucího řetězce DNA (www.illumina.com).

Ačkoliv je metoda sekvenování pomocí NGS univerzální metodou této doby, i v tomto případě se můžeme setkat s artefakty vzniklými v průběhu reakce. Proto byly všechny varianty nalezené metodou NGS následně ověřeny pomocí Sangerova sekvenování DNA u pacienta a pokud možno i u jeho rodičů, sourozenců, nebo dalších členů rodiny.

3.4.2 Softwarová analýza dat

Bioinformatické zpracování dat probíhalo v jednotlivých fázích za pomoci různých analytických nástrojů pro vyhodnocování získaných dat. Všechna data byla po doběhnutí cyklu stažena do tzv. BaseSpace (Illumina, USA), kde byla také získaná data jednotlivých sekvenačních běhů a jednotlivých vzorků DNA jako např. průměrná hloubka pokrytí, průměrná délka čtení (bp), pravděpodobnost přiřazení správného nukleotidu do dané pozice, procento čtení, které lze využít k analýze (PF - passing filter), zastoupení určitého indexu a další.

V rámci primární analýzy, kterou zajišťuje samotný sekvenátor, dochází k převedení signálu detektoru na čtyřpísmený kód jednotlivých bazí a k výpočtu kvality pro získaná data. Výstupem ze sekvenátoru Illumina MiSeq je soubor ve FASTQ (soubor sekvencí jednotlivých readů), který obsahuje informaci o kvalitě přečtení dané báze - Phred Quality Scores (Q) a většinou dosahuje hodnot 1 až 41 (http://drive5.com/usearch/manual/quality_score.html). Čím

je Q vyšší, tím je přesnost čtení bází vyšší, tedy nižší chybovost. Sekundární analýza spočívala ve filtrování a mapování jednotlivých readů, kde kvalita získaných dat byla zkontrolována pomocí nástroje FastQC, který po importování FASTQ souboru umožňuje kromě základních statistik i grafické znázornění několika kvalitativních parametrů sekvenovaného úseku. Alignment (mapování readů) proběhl přiřazením jednotlivých čtení k lidské referenční sekvenci genomu Human hg19 (GRCh37). Takovéto seřazení readů do kompletní sekvence nám následně umožňuje hledat variační rozdíly (odchyly mezi získanou a referenční sekvencí). Data byla zpracována pomocí Burrows-Wheeler Aligner (BWA) algoritmu (Li, Durbin, 2009) následovaném GATK analýzou <https://software.broadinstitute.org/gatk/>. Získané varianty byly v poslední terciární fázi analýzy filtrovány pomocí Variant Studio Software 3.0 (Illumina, CA, USA). V této fázi analýzy dochází k interpretaci zanalyzovaných dat (vstupními daty jsou BAM a VCF), kde po naimportování souboru následuje provedení buď vlastní filtrace nalezených variant (podle nedostatečné kvality či hloubky čtení), případně je možno použít automatickou filtraci, která provede filtraci podle výrobcem přednastavených parametrů kvality jako je frekvence minor alely, hloubka čtení a kvalita sekvenace. Po filtraci dat je možné přistoupit k „anotaci“. Tato funkce vyhledá a přiřadí známé informace ke každé z nalezených variant včetně odkazu na databázi variant.

Analýza dat probíhala také použitím programu Sequence Pilot (<https://www.jsi-medisys.de/>). Dále byly varianty filtrovány na základě frekvencí v uvedených v populačních databázích jako ExAC Browser (<http://exac.broadinstitute.org/>), gnomAD Browser (<http://gnomad.broadinstitute.org/>), 1000 Genomes (<http://www.internationalgenome.org/>), dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). Hodnoceny byly všechny varianty, které měly frekvenci v uvedených databázích $\leq 2\%$. Všechny nalezené varianty byly hodnoceny na základě literatury a dalších dostupných online databází (OMIM, dbSNP, ClinVar, HGMD, LOVD).

Db OMIM je komplexní a autoritativní souhrn lidských genů a genetických fenotypů, který je volně dostupný a každý den aktualizovaný. Obsahují informace o všech známých genetických poruchách a více než 15 000 genů. OMIM se zaměřuje na vztah mezi fenotypem a genotypem (<https://www.omim.org/about>).

Db SNP je bezplatný veřejný archiv pro genetické variace v rámci různých druhů vyvinutý Národním centrem pro biotechnologické informace (NCBI) ve spolupráci s Národním institutem pro výzkum lidského genomu. Ačkoli název db implikuje kolekci pouze

jedné třídy polymorfismů (tzn. jednonukleotidové polymorfismy (SNPs)), ve skutečnosti obsahuje celou řadu molekulárních variací: (1) SNP, (2) polymorfismy krátké delece a inserce, (3) mikrosatelitní markre nebo krátké tandemové repetice (STR), (4) multinukleotidové polymorfismy (MNPs), (5) heterozygotní sekvence a (6) pojmenované varianty (Sherry et al., 1999).

Db ClinVar je volně přístupný veřejný archiv publikací s informacemi o vztazích mezi lidskými variacemi a fenotypy. ClinVar zpracovává varianty nalezené ve vzorcích pacientů, tvrzení týkající se jejich klinického významu, informace o zadavateli a další podpůrná data (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/intro/>).

Databáze lidských genových mutací (HGMD®) představuje komplexní soubor publikovaných zárodečných mutací v genech, které jsou asociovány s dědičným onemocněním u člověka (Stenson et al., 2019). S novými mutačními záznamy (akumulaci vyšší než 17 000 ročně), představuje HGMD de facto centrální jednotné úložiště dědičných mutací způsobujících lidské genetické onemocnění, které celosvětově používají vědci, lékaři, diagnostické laboratoře a genetičtí poradci, a je základním nástroj pro anotaci dat sekvenování nové generace (Stenson et al., 2017).

LOVD je bezplatná, flexibilní webová db vyvinutá v Leiden University Medical Center v Nizozemsku, jejímž cílem je shromažďovat a zobrazovat varianty v sekvenci DNA. Všechny varianty nalezené u jednotlivců jsou shromažďovány v db spolu s informacemi o tom, zda by mohly být kauzálně spojeny s onemocněním (tzn. varianta nebo mutace způsobující onemocnění), či nikoli (tzn. varianta nezpůsobující onemocnění). Specializovaní lékaři (kliničtí genetiци) používají LOVD k diagnostice a poradenství u pacientů s genetickým onemocněním (Fokkema et al., 2005). Na rozdíl od databází lidského genomu, které ukazují informace o všech variantách DNA, zahrnují LOVD informace o jednotlivcích, u kterých byly varianty nalezeny. Tyto informace o pacientech jsou obvykle přístupné pouze registrovaným uživatelům (<https://www.lovd.nl/>).

Nalezené varianty, které nebyly uvedené v databázích ani v literatuře, se hodnotily pomocí online dostupných *in silico* predikčních programů:

- **SIFT** (<http://www.Blocks.fhrc.org/sift/SIFT.html>, Vaser et al., 2016),
- **PolyPhen-2** (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>, Adzhubei et al., 2010),
- **Mutation taster** (<http://www.mutationtaster.org/documentation.html>, Schwarz et al., 2014),

- **SNPs&GO** (<https://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/>, Calabrese, et al. 2009),
- **PhD-SNP** (<http://snps.uib.es/phd-snp/phdsnp.html>, Capriotti, et al. 2006),
- **PROVEAN** (<http://provean.jcvi.org>, Choi et al., 2012),
- **PANTHER** (<http://www.pantherdb.org/>, Thomas et al., 2003),
- **EIGEN** (http://www.columbia.edu/~ii2135/information_eigen.html, Ionita-Laza et al., 2016),
- **FATHMM-MKL** (<http://fathmm.biocompute.org.uk/index.html>, Shihab et al., 2013).

Nalezené sestřihové varianty byly hodnoceny pomocí softwaru Alamut Visual (Interactive Biosoftware, Francie), který má inkorporované další predikční programy pro *in silico* analýzu pro sestřihové varianty:

- **MaxEntScan** (http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html),
 - **NNSPLICE** (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html),
 - **HSF** (Human Splicing Finder, <http://www.umd.be/HSF/>, Desmet et al., 2009).
- Predikční programy pro sestřihové varianty hodnotí potenciální vliv na sestřih ve škále 0 - 100 % od nejmenší k nejvyšší pravděpodobnosti ovlivnění sestřihu.

Pravděpodobně patogenní varianty byly hodnoceny dle kritérií publikovanými ACMG (Richards et al., 2015), do tříd 1-5 dle závažnosti:

Třída 1: Benigní varianta,

Třída 2: Pravděpodobně benigní varianta,

Třída 3: Varianta nejasného významu (VUS – Variant of Unknown Significance),

Třída 4: Pravděpodobně patogenní varianta,

Třída 5: Patogenní varianta (opakovaně popsána v literatuře, případně ověřena funkčními studiemi).

Všechny předpokládané patogenní varianty byly ověřeny pomocí Sangerova sekvenování u probanda, jeho rodičů, případně dalších příbuzných v rodině, kde se sledovala také segregace dané varianty.

Všechny zjištěné varianty byly zapsány podle aktuálních doporučení HGVS (<https://varnomen.hgvs.org/>, den Dunnen et al., 2016).

3.5 HaploPainter

Pro tvorbu rodokmenů jsme využili freeware (volně dostupný software) HaploPainter V.1.043 (<http://haplopainter.sourceforge.net/>).

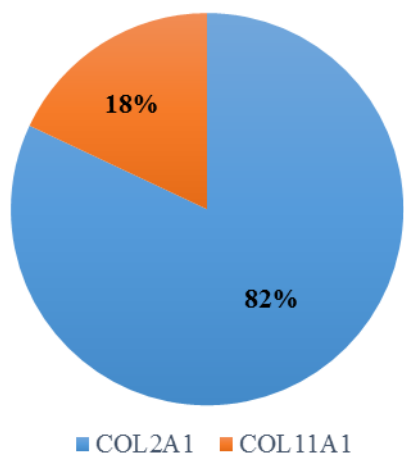
IV. VÝSLEDKY

1. Sticklerův syndrom

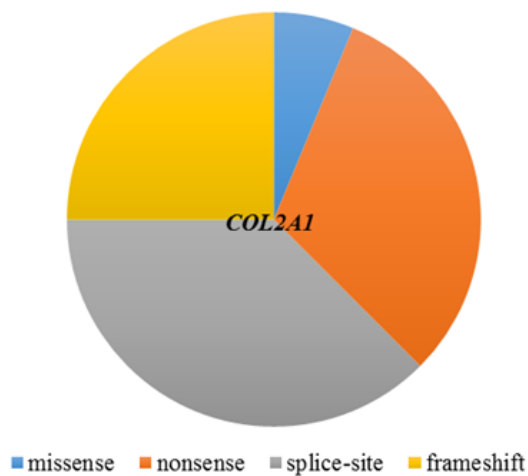
V rámci výzkumu Sticklerova syndromu bylo celkem vyšetřeno 75 vzorků DNA, z toho 45 pacientů s klinickým podezřením na STL a 30 zdravých příbuzných z 28 rodin. Z tohoto souboru jsme pomocí dostupných metod našli kauzální varianty u 39 postižených pacientů z 22 rodin a vyloučili jejich výskyt u 30 zdravých příbuzných. U 6 pacientů z 6 rodin nebyla použitými metodami zachycena žádná potenciálně kauzální varianta. Příčinu obtíží jsme tedy objasnili u 79 % rodin (22 z 28). U jediného vyšetřeného pacienta ze SR byla prokázána kauzální varianta v genu *COL2A1* (S8), ostatní rodiny byly českého původu.

Analýzou genu *COL2A1* pomocí Sangerova sekvenování jsme detekovali patogenní varianty u pacientů z rodin S1-S7 a S13. Pacienti bez prokázané kauzální varianty v genu *COL2A1* byli dále vyšetřeni pomocí metody MLPA na přítomnost duplikací/delecí v genu *COL2A1* a *COL11A1*, kde jsme však žádný patogenní nález nedetekovali, a následně pomocí námi navrženého NGS panelu genů pro hluchotu a slepotu, kde jsme identifikovali dosud nepopsané varianty v genu *COL11A1* u pacientů z rodin S19-S22. Pacienti z rodin S8-12 a S14-22 byli vyšetřeni přímo na NGS panelu. Varianty v dalších genech pro STL nebyly u žádného z pacientů indikovaných k vyšetření pro STL detekovány.

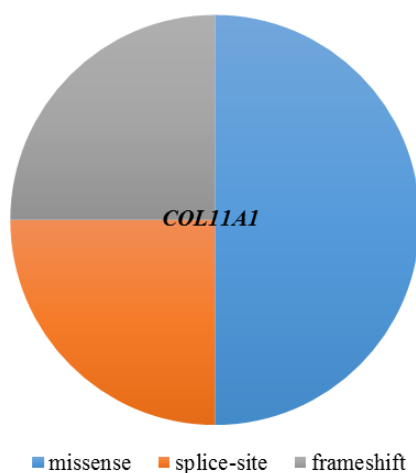
Celkově jsme našli kauzální variantu v jednom ze STL genů u 39 pacientů z 22 rodin, z toho u 28 pacientů z 18 rodin (82 %) byly nalezeny varianty v genu *COL2A1* a u 11 pacientů ze 4 rodin (18 %) varianty v *COL11A1* genu. U 8 rodin (15 pacientů) byl zjištěn familiární výskyt a ve 14 případech se jednalo o sporadický výskyt. Oběma metodami (Sangerovo a NGS sekvenování) bylo celkem nalezeno v genu *COL2A1* 15 různých variant v 18 rodinách a v genu *COL11A1* byly nalezeny 4 různé varianty ve 4 rodinách. Ze všech 19 nalezených kauzálních variant bylo 7 již dříve popsáných a 12 nově nalezených (8 nových variant v genu *COL2A1* a 4 nové v genu *COL11A1*). U nově nalezených variant byla kauzalita uznána, jen pokud byla provedena segregáční analýza v rodině, ve stejném nukleotidu byla již popsána jiná patogenní varianta, nebo pokud kauzalitě nasvědčovaly další silné argumenty jako predikce *in silico* a nebo velmi silná korelace genotypu s fenotypem. Celkový podíl detekovaných variant v genech *COL2A1* a *COL11A1* je vyznačen v Grafu 1. Zastoupení jednotlivých typů patogenních variant v genech *COL2A1* a *COL11A1* je vyznačeno v Grafu 2 a 3.



Graf 1: Podíl nalezených kauzálních variant v genech *COL2A1* a *COL11A1* v souboru českých a slovenských pacientů.



Graf 2: Podíl jednotlivých typů *COL2A1* patogenních variant.



Graf 3: Podíl jednotlivých typů *COL11A1* patogenních variant.

1.1. Spektrum a frekvence kauzálních variant v *COL2A1*

Z 16 variant detekovaných v genu *COL2A1* byla pouze jedna typu missense, a to již popsaná patogenní varianta c.2710C>T p.(Arg904Cys), všechny ostatní varianty jsou predikovány jako zkracující protein. Varianty c.1597C>T p.(Arg533*) a c.2659C>T p.(Arg887*) byly v našem souboru rekurentní (u 2 rodin každá), zatímco další dvě nonsense varianty c.2566C>T p.(Gln856*) a c.2818C>T p.(Arg940*) byly nalezeny vždy pouze jednou. Ze šesti různých sestřihových variant se vyskytovaly dvě různé varianty v jednom nukleotidu a to c.816+1, tedy v prvním nukleotidu intronu 12. V jednom případě se jedná o delecí tohoto nukleotidu c.816+1del a v druhém případě o záměnu c.816+1G>A. Ve zbylých 4 rodinách byly zachyceny 3 různé frameshift varianty. Seznam všech nalezených variant je shrnut v Tab. 10. Výsledky *in silico* predikce patogenicity všech nově popsaných missense variant v genech *COL2A1* a *COL11A1* jsou shrnuty v Tab. 11, *in silico* zhodnocení vlivu sestřihových variant na splicing je uvedeno v Tab. 12 a patogenicity variant způsobujících posun čtecího rámce a tím vznik předčasného stop kodonu v Tab. 13.

1.2. Spektrum a frekvence kauzálních variant v *COL11A1*

Ve 4 různých rodinách se značně odlišnými fenotypy jsme odhalili 4 různé dosud nepopsané varianty v genu *COL11A1*. Ve dvou případech se jednalo o missense varianty a to c.5350A>C p.(Thr1784Pro) a c.4180G>C p.(Glu1394Gln). Predikce týkající se těchto variant jsou uvedeny v Tab. 11. Zbylé dvě varianty jsou predikovány jako zkracující protein. Varianta c.2845-1G>C vede pravděpodobně k přeskočení exonu 37 při transkripci a varianta c.1560del p.(Ile521Serfs*19) způsobí posun čtecího rámce a tím vznik předčasného terminačního kodonu. Výsledky *in silico* predikcí pro missense varianty jsou uvedeny v Tab. 11, pro varianty způsobující alternativní sestřih a posun čtecího rámce v Tab. 12, resp. Tab. 13.

Tab. 10: Seznam nalezených variant v souboru českých a slovenských pacientů se STL a jejich klinický význam.

Proband	Gen	Nukleotidová záměna	Aminokyselinová záměna	Segregace v rodině	Nová/ Popsaná	Klinický význam *
S9:II-1	COL2A1	c.709-2A>G	p.?	<i>de novo</i>	Miyamoto et al., 2005	Patogenní
S7:II-4	COL2A1	c.816+1G>A	p.?	dcera	Nová	Patogenní
S10:II-1	COL2A1	c.816+1del	p.?	<i>de novo</i>	Nová	Patogenní
S12:II-1	COL2A1	c.924+1del	p.?	<i>de novo</i>	Nová	Patogenní
S4:II-1	COL2A1	c.1123-2A>G	p.?	matka, bratr	Nová	Patogenní
S3:III-1	COL2A1	c.1597C>T	p.(Arg533*)	otec	Liberfarb et al., 2003	Patogenní
S13:II-2				matka		
S11:II-1	COL2A1	c.2096_2105del	p.(Gly699Valfs*86)	<i>de novo</i>	Hoornaert et al., 2010	Patogenní
S8:II-1	COL2A1	c.2342del	p.(Lys781Argfs*7)	<i>de novo</i>	Nová	Patogenní
S2:II-2	COL2A1	c.2382del	p.(Gly795Alafs*86)	<i>de novo</i>	Hoornaert et al., 2010	Patogenní
S5:II-1				matka		
S16:II-2	COL2A1	c.2566C>T	p.(Gln856*)	?	Nová	Patogenní
S15:II-1	COL2A1	c.2659C>T	p.(Arg887*)	<i>de novo</i>	Hoornaert et al., 2010	Patogenní
S17:II-2				matka, bratr		
S6:II-1	COL2A1	c.2679+1G>A	p.?	<i>de novo</i>	Nová	Patogenní
S1:II-1	COL2A1	c.2710C>T	p.(Arg904Cys)	<i>de novo</i>	Richards et al. 2010	Patogenní
S18:IV-4	COL2A1	c.2818C>T	p.(Arg940*)	matka	Kondo et al., 2016	Patogenní
S14:III-2	COL2A1	c.3491del	p.(Gly1164Valfs*63)	matka	Nová	Patogenní
S21:IV-6	COL11A	c.1560del	p.(Ile521Serfs*19)	otec, bratr +4	Nová	Patogenní
S19:II-2	COL11A	c.2845-1G>C	p.?	<i>de novo</i>	Nová	Patogenní
S22:II-2	COL11A	c.4180G>C	p.(Glu1394Gln)	?	Nová	Pravděpodobně patogenní
S20:II-2	COL11A	c.5350A>C	p.(Thr1784Pro)	matka, syn	Nová	Pravděpodobně patogenní

*Dle ACMG, kritéria hodnocena pomocí programu pro interpretaci genetických variant (GVIT) - http://www.medschool.umaryland.edu/Genetic_Variant_Interpretation_Tool1.html/ a na základě tabulky 5 v Richards et al. (2015). (https://www.acmg.net/docs/Standards_Guidelines_for_the_Interpretation_of_Sequence_Variants.pdf).

Tab. 11: Nalezené missense varianty u pacientů se STL a jejich *in silico* predikce.

Gen	Varianta	<i>In silico</i> prediktivní algoritmy								
		SIFT	Poly Phen-2	Mutation taster	SNPs &GO	PhD-SNP	PROVEAN	PANTHER	EIGEN	FATHM M-MKL
COL11A1	c.5350A>C p.(Thr1784Pro)	Deleterious	Probably damaging	Disease causing	NV DAV	NP DRP	Deleterious	Probably damaging	Pathogenic	Damaging
COL11A1	c.4180G>C p.(Glu1394Gln)	Deleterious	Probably damaging	Disease causing	NV DAV	NP DRP	Deleterious	Probably damaging	Pathogenic	Damaging

NV - Neutral variation, DAV - Disease associated variation, NP - Neutral polymorphism, DRP - Disease-related polymorphism.

Tab. 12: Nalezené sestřihové varianty u pacientů se STL a jejich *in silico* predikce.

Gen	Varianta	Exon/ Intron	Vliv na sestřih	<i>In silico</i> prediktivní algoritmy					
				Mutation taster	MaxEnt	NNSP LICE	HSF	EIGEN	FATHMM-MKL
COL2A1	c.1123-2A>G	Intron 18	Acceptor splice site	Disease causing	-100 %	-100 %	-100 %	Pathogenic	Damaging
OL2A1	c.2679+1G>A	Intron 40	Donor splice site	Disease causing	-100 %	-100 %	-100 %	Pathogenic	Damaging
COL2A1	c.816+1G>A	Intron 12	Donor splice site	Disease causing	-100 %	-100 %	-100 %	Pathogenic	Damaging
COL2A1	c.816+1del	Intron 12	Donor splice site	Disease causing	-100 %	-100 %	-100 %	-	-
COL2A1	c.924+1del	Intron 14	Donor splice site	Disease causing	-100 %	-100 %	-100 %	-	-
COL11A1	c.2845-1G>C	Intron 36	Acceptor splice site	Disease causing	-100 %	-100 %	-100 %	Pathogenic	Damaging

Tab. 13: Nalezené frameshift varianty u pacientů se STL a jejich *in silico* predikce.

Gen	Varianta	Exon/ Intron	<i>In silico</i> prediktivní algoritmy			
			Mutation taster	MaxEnt	NNSPLICE	HSF
COL2A1	c.2342del p.(Lys781Argfs*7)	Exon 35	Disease causing	-	-	-
COL2A1	c.2096_2105del p.(Gly699Valfs*86)	Exon 33	-	+3,9 %	+14,2 %	+0,7 %
COL2A1	c.3491del p.(Gly1164Valfs*63)	Exon 50	Disease causing	+8,4 %	+4,6 %	+0,6 %
COL11A1	c.1560del p.(Ile521Serfs*19)	Exon 13	Disease causing	-	-	-

1.3 Klinické nálezy u pacientů s *COL2A1* a *COL11A1* variantami

Jedním z cílů práce bylo podrobně charakterizovat fenotyp pacientů jako podklad pro upřesnění diagnostických kritérií a zlepšení korelace genotypu s fenotypem. Základní demografické údaje a hlavní klinické nálezy u pacientů s patogenními nebo pravděpodobně patogenními *COL2A1* variantami jsou uvedené v Tab. 14 a pacientů s patogenními nebo pravděpodobně patogenními *COL11A1* variantami v Tab. 15. Ve zkoumaném soboru byla pozorována výrazná intra- a interfamiliární variabilita.

Podrobné kazuistiky jednotlivých STL rodin s nalezenou kauzální variantou jsou shrnuty v Příloze 4. Všechny rodokmeny byly vytvořeny pomocí programu HaploPainter, a sekvenogramy s nalezenými variantami pomocí programu ChromasPro. Prediktivní testování neodhalilo kauzální variantu u žádného z nepostižených příbuzných, což potvrzuje segregaci variant v rodinách pacientů a úplnou penetranci onemocnění. Paternita u všech rodin se suspektními *de novo* variantami byla potvrzena použitím sady 16 forezních markerů (Ensenberger et al., 2010).

Fenotyp pacientů asociovaný s *COL2A1* variantami

Nejčastějším symptomem u 26 z 28 (93 %) jedinců s patogenními variantami v *COL2A1* genu byla myopie, zejména těžká myopie ($\geq -6,0D$), která byla pozorována v alespoň jednom oku u 20 pacientů (71 %). Z dalších očních komplikací byla častá spontánní amoce sítnice, která se vyskytovala nejméně v jednom oku u 11 pacientů (39 % všech pacientů, 56 % pacientů starších 15 let) v průměrném věku 12 let (rozmezí 6 - 32 let) a dále kongenitální bilaterální katarakta, která se vyskytovala u dvou pacientů (7,1 %). Nejčastějším non-okulárním klinickým znakem u pacientů byla hypoplazie střední částí obličeje, která byla pozorována u 18 (64 %) pacientů. Celkem 14 pacientů (50 %) se narodilo s rozštěpem patra, buď izolovaným (6 pacientů - 21,5 %), nebo v rámci PRS (8 pacientů - 28,5 %). Senzorineurální ztráta sluchu byla detekována u 9 pacientů (32 %, 50% pacientů starších 15 let), a 2 pacienti (7 %) měli prolaps mitrální chlopně. U pacientů ve věku více než 9 let (14 případů), byla u všech kromě 4 pacientů (14 z 18, celkem 77,7 %), přítomná kloubní hypermobilita, a celkem 11 pacientů (39 %) trpělo různým stupněm artropatie a/nebo artrózy. Klinické nálezy pacientů nesoucích kauzální varianty v genu *COL2A1* jsou shrnuty v Tab. 14.

Fenotyp pacientů asociovaný s COL11A1 variantami

Celkem u 11 postižených pacientů ze 4 rodin byly nalezeny patogenní nebo pravděpodobně patogenní varianty v *COL11A1* genu. Společným znakem probandů ze všech rodin byla myopie, která se většinou nevyskytovala u jejich dalších postižených příbuzných, a u 2/3 probandů se vyskytovalo sluchové postižení, které bylo naopak přítomné u většiny příbuzných. U dvou pacientů (S19:II-2, S20:II-2) došlo k odchlípení sítnice, avšak s poměrně velkým věkovým rozdílem nástupu - ve věku 8 let a 44 let. Klinické nálezy pacientů nesoucích kauzální varianty v genu *COL11A1* jsou shrnuty v Tab. 15.

1.4 Klinické nálezy u pacientů bez nalezené varianty v STL genech

U celkem 6 pacientů s klinickými příznaky STL nebyla použitými metodami detekována žádná patogenní nebo pravděpodobně patogenní varianta v žádném z vyšetřených genů pro STL a příčina jejich klinického nálezu tedy zůstává nevyřešená. Dva pacienti mužského pohlaví byli klinicky vyšetřeni ihned po narození kvůli PRS, u jednoho z nich se následně ve věku 9 měsíců rozvinula vysoká myopie, další dvě pacientky měly také PRS, avšak byly vyšetřeny v pozdějším věku, jedna z nich neměla žádné oční symptomy, druhá měla vysokou myopii a amoci sítnice v 9 letech na jednom oku. U dalších dvou pacientek dominovala předčasná artróza spolu se střední až vysokou myopií. Celkově se tedy jednalo o 4 pacienty s PRS, z toho jeden s vysokou myopií, 3 pacienti měli artropatii, a kloubní hypermobilita byla přítomna u všech 6 jedinců. Celkově myopií trpěli 4 pacienti a jedna pacientka prodělala amoci sítnice. V rodinné anamnéze pacienta s PRS bez myopie je mladší bratr s PRS a ukončená gravidita matky pro závažný rozštěp, mikromandibulu a nízko posazené uši, a velice suspektní PRS, plod byl mužského pohlaví. Všechny klinické údaje o těchto pacientech jsou přehledně uvedeny v Tab. 16.

Tab. 14: Klinické příznaky pacientů s fenotypem STL a detekovanými variantami v *COL2A1* genu.

Postižený jedinec/ příbuzný	Varianta	Pohlaví	Věk nástupu onemocnění	Rodinný status	PRS / CP	FD	PS	A	KH	MVP	Myopie / SE (věk při měření)		Jiné oční příznaky (věk nástupu)		Další osobní/rodinné údaje
											PO	LO	PO	LO	
S1:II-1*	c.2710C>T p.(Arg904Cys)	M	9	SP	-	+	+	NA	+	-	-19.0 (3 r)	-15.0 (3 r)	-	-	skolióza, scapula alata, malý vzrůst
S2:II-2*	c.2382del p.(Gly795Alafs*86)	M	14	SP	PRS	+	-	NA	+	-	-3.0 (12 r)	-1.0 (12 r)	AS (6 r)	AS (7 r)	
S3:III-1*	c.1597C>T p.(Arg533*)	F	21	FAM	-	-	-	-	+	-	-7.0 (20 r)	-7.0 (20 r)	AS (10 r)	AS (13 r)	autoimunitní tyreoiditida, atopická dermatitida
S3:II-1		M	50	FAM	-	-	-	-	+	-	-9.0 (30 r)	-9.0 (30 r)	AS (20 r)	AS (13 r)	LSS, artróza, otec AS na PO (20 let) a I SS
S4:II-1*	c.1123-2A>G p.?	F	23	FAM	PRS	+/-	13	+	+	-	-11.5	UA	AS (10 r)	AS (12 r)	bifidní uvula, ploché nohy, gonartróza
S4:II-2		M	15	FAM	CP	+/-	-	+	+	-	+0.5 (14 r)	-4.0 (14 r)	-	K	bilaterální nektróza femorální hlavice,
S4:I-2		F	46	FAM	-	+/-	13	+/-	+	-	-8.0	-8.0	-	-	aneuryzma lienální tepny
S5:II-1*	c.2382del p.(Gly795Alafs*86)	F	48	FAM	-	-	-	+	-	-	-8.0	-8.0	-	-	astenická postava
S5:III-1		M	16	FAM	-	-	-	+	+	-	-8.0	-8.0	-	AS (UA)	vysoké patro, pectus carinatum
S6:II-1*	c.2679+1G>A, p?	F	3	SP	PRS	+	-	-	-	-	-8.0	-8.0	-	-	pectus excavatum
S7:II-4*	c.816+1G>A p?	F	48	FAM	-	+	+	40	-	-	≥-6.0	≥-6.0	-	-	astenická postava, dilatovaná aorta, artróza, bratr AS, HK, otec artropatie, FD
S7:III-3		F	25	FAM	-	+	+	20	+	-	-11.0	-11.0	-	-	bolesti páteře, artralgie, bratr myopie
S8:II-1*	c.2342del p.(Lys78Arg*7)	M	43	SP	PRS	-	6	-	+	-	≥-6.0	≥-6.0	AS (19 r)	AS (14 r)	amauróza PO, dlouhé prsty, klinodaktýlie,
S9:II-1*	c.709-2A>G, p?	F	32	SP	PRS	+	+	<6	+	-	≥-6.0	≥-6.0	K (10 r), AS (32 r)		kyfoskolióza

Postižený jedinec/ příbuzný	Varianta	Pohlaví	Věk nástupu onemocnění	Rodinný status	PRS / CP	FD	PS	A	KH	MVP	Myopie / SE (věk při měření)		Jiné oční příznaky (věk nástupu)		Další osobní/rodinné údaje
											PO	LO	PO	LO	
S10:II-1*	c.816+1del, p?	F	14	SP	PRS	+	-	-	12	+	-4.5 (11 r)	-5.25 (19 r)	AS (11 r)	-	hypotyreoidismus
S11:II-1*	c.2096_2103del p.(Gly699Valfs*7)	M	1	SP	PRS	+	NA	-	-	+	-4.0	-4.5	-	-	VSD, pedes equinovari, předčasné narození, IUGR,
S12:II-1*	c.924+1del, p.?	M	8	SP	-	+	-	-	-	-	-10.0	-11.0	-	AS (7 r)	prominující čelo, hluboko posazené oči
S13:II-2*	c.1597C>T p.(Arg533*)	F	9	FAM	CP	+	+	-	+	-	-7.0	-4.0	AS (7 r)	-	opakující se zánět středního ucha
S13:I-2		F	44	FAM	CP	+	+	-	-	-	-	-	-	-	mírná SED, matka AS na PO (43 let) po operaci
S14:III-2*	c.3491del p.Gly1164Valfs*63	M	2,5	FAM	-	+	-	-	+	-	-13.5 (14 r)	-14.0 (14 r)	K	K	otec Bechtěrevova nemoc
S14:II-1		F	28	FAM	-	-	-	+	+	-	-	-	GL (28 r), K (40 r)	-	bolesti zad
S15:II-1*	c.2659C>T p.(Arg887*)	M	1	SP	PRS	+	-	-	-	-	-12,5 (2 r)	-16,25 (2 r)	-	-	mikrocefalie, dlouhé prsty rukou i nohou
S16:II-2*	c.2566C>T p.(Gln856*)	F	3	SP	CP	+	-	-	+	-	≥-6.0	≥-6.0	-	AS	hypertenze, stomatologické potíže, bolesti svalů
S17:II-2*	c.2659C>T p.(Arg887*)	F	1	FAM	CP	+	-	-	-	-	-9.25 (3 r)	-8.5 (3 r)	-	-	
S17:I-2		F	25	FAM	-	-	-	+	-	-	-2,45 (23 r)	-3 (23 r)	-	-	Hashimotova thyreoidita
S17:II-1		M	5	FAM	-	-	-	-	-	-	-9 (5 r)	-10 (5 r)	-	-	
S18:IV-4	c.2818C>T p.(Arg940*)	F	0	FAM	CP	-	-	-	-	-	-4.0	-5.0	GL	GL	
S18:III-10		F	6	FAM	-	-	-	+	-	-	-8.0 (25 r)	-8.0 (25 r)	-	-	amblyopie

*proband; + klinický znak přítomen; - klinický znak nepřítomen; NA - data nejsou k dispozici; M – muž, F – žena, PRS - Pierre-Robinova sekvence; CP - rozštěp patra; FD - faciální dysmorfie; PS - porucha sluchu; A - artropatie; HK – hypermobilita kloubů; MVP - prolaps mitrální chlopně; AS - amoce sítnice; SP - sporadický; FAM - familiární; UA - neznámý věk; IUGR - intrauterinní růstová restrikce/retardace; VSD - defekt komorového septa; SED - spondyloepifyziární dysplázie; LSS – lumbální spinální stenóza; PO - pravé oko; LO - levé oko; GL - glaukom; K - vrozená katarakta; SE- sférický ekvivalent (sférická komponenta refrakce, k níž je připočtena polovina cylindrické komponenty refrakce). Čísla ve sloupcích prezentují věk nástupu potíží. Pozn.: Informace o dioptriích byly získány před operací katarakty, čísla v závorkách označují věk při měření, pokud se liší od věku při vyšetření. V případě SE<0, je přítomná myopie.

Tab. 15: Klinické příznaky pacientů s detekovanými variantami v *COL11A1* genu.

Postižený jedinec/ příbuzný	Varianty	Pohlaví	Věk při vyšetření	Věk nástupu onemocnění	Rodinný status	PRS	FD	PS	SED	A	KH	MVP	Myopie/ SE		Jiné oční příznaky		Další osobní/ rodinné údaje	
													PO	LO	PO	LO		
S19:II-2*	c.2845-1C>G p.?	M	12	0	SP	+	+	-	+	NA	+	-	-14 (2.5 r)	-14 (2.5 r)	GL, K, N, SLČ (3 r), enukleace (9 r)	GL, K, N, SLČ (3 r)	polyhydramnion, skolióza, laryngomalacie, platyspondylie, masivní metafýzy, malý vzrůst	
S20:II-2*	c.5350A>C p.(Thr1784Pro)	F	51	30	FAM	-	+	30	-	42	+	-	≥ -6	≥ -6	AS (44 r)	-		
S20:I-2		F	80	40	FAM	-	+	50	-	40	+	-	-	-	-	-	časná artróza, TEP	
S20:III-3		M	12	6	FAM	-	+	-	-	-	-	-	-	-4	-4	-	-	
S21:IV-6*	c.1560del p.(Ile521Serfs*19)	M	15	11	FAM	-	-	11	-	-	+	-	< 0	< 0	-	-	další příbuzní s PS a myopií ve 3 generacích	
S21:IV-7		M	11	10	FAM	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-		
S21:III-4		M	42	16	FAM	-	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S21:III-2		F	58	15	FAM	-	-	15	-	-	-	-	-	< 0	< 0	-	-	
S21:IV-3		M	18	13	FAM	-	-	13	-	-	-	-	-	< 0	< 0	-	-	
S21:V-4		M	6	5	FAM	-	-	5	-	-	-	-	-	< 0	< 0	-	-	
S22:II-2*		c.4180G>C p.(Glu1394Gln)	F	44	6	SP	-	-	5	-	-	-	-	-2,5 (42 r)	-2,5 (42 r)	-	-	myopie, hemangiomy na játrech, astma cca od 8

*proband; + klinický znak přítomen; - klinický znak nepřítomen; NA - data nejsou k dispozici; M – muž, F – žena; PRS - Pierre-Robinova sekvence; FD - faciální dysmorfie; PS - porucha sluchu; SED - spondyloepifyzární dysplázie; A - arthropatie; KH - kloubní hypermobilita; MVP - prolaps mitrální chlopně; AS - amoce sítnice; SP- sporadický; FAM- familiární; PO - pravé oko; LO - levé oko; GL - glaukom; K - vrozená katarakta; N – nystagmus, SLČ – spontánní luxace čočky; TEP – totální endoprotéza; SE- sférický ekvivalent (sférická komponenta refrakce, k níž je připočtena polovina cylindrické komponenty refrakce). Čísla ve sloupcích prezentují věk nástupu potíží.

Pozn.: Informace o dioptriích byly získány před operací katarakty, čísla v závorkách označují věk při měření, pokud se liší od věku při vyšetření. V případě SE<0, je přítomná myopie

1.5. Nález rozšiřující fenotypové spektrum STL

V rodině S4 byla mutace NM_001844.4:c.1123-2A>G p.? v intronu 18 genu *COL2A1* prokázána u matky a jejích dvou potomků. Probandkou je nyní 23letá dívka narozená s PRS, s vysokou myopií diagnostikovanou ve 2 letech a po prodělané amoci sítnice v 10 letech. Od 13 let má sluchadlo pro poruchu sluchu. Probandka je nyní indikována k operaci totální endoprotézy kolene. Její mladší bratr se narodil s rozštěpem patra, avšak bez PRS, a byl odhalen velmi vzácný oční nález, kdy rozdíl mezi refrakční chybou pravého a levého oka byl 4,5 dioptrie, přičemž levé oko bylo myopické a pravé oko emetropické. Naopak shodným rysem obou sourozenců je závažná artropatie, kdy bratr probandky již podstoupil operaci náhrady kolene ve věku 15 let. Fenotyp obou sourozenců je ve značném protikladu k fenotypu matky, která kromě myopie (-8D bilaterálně), kterou řešila operací a kontaktními čočkami, nevykazovala až do středního věku jiné příznaky než nespecifické bolesti zad. Ve 48 letech prodělala pod obrazem náhlé příhody břišní aneurysma arteria lienalis s následnou splenektomií.

Také matka probandky z rodiny S13 vykazovala abnormální okulární fenotyp. Matka byla molekulárně geneticky vyšetřena v rámci vyšetření dcery, u které byla potvrzena opakovaně popsaná patogenní varianta NM_001844.4:c.1597C>T p.(Arg533*). Probandka byla vyšetřena pro podezření na STL vzhledem k rozštěpu patra, myopii a amoci sítnice v 7 letech. Matka i dcera mají faciální dysmorfii typickou pro STL (plochý obličej, menší bradu) a kloubní hypermobilitu, ale matka na rozdíl od své dcery netrpí žádnou refrakční vadou. Studium genealogie bylo zjištěno, že maternální babička probandky prodělala ve 43 letech amoci sítnice. Bohužel vzorek babičky nebyl již pro naši analýzu dostupný. Podle současných vědomostí je matka první dokumentovanou pacientkou ve světové literatuře se STL1 bez jakékoliv oční patologie. Na tento fakt jsme upozornili také v naší publikaci (Čopíková et al., 2020).

Tab. 16: Klinické znaky u pacientů bez nálezů patogenních nebo pravděpodobně patogenních variant v genech pro STL.

Postižený jedinec/ příbuzný	Pohlaví	Věk při vyšetření	PRS	FD	PS	A	KH	MVP	Primární oční příznaky	Další osobní/rodinné údaje
F23:II-1*	M	0	+	+	-	-	+	-	MY (-8D/-10D)	novorozenec s PRS, rozvoj myopie v 9 měsících
F24:II-2*	M	0	+	+	-	-	+	-	-	v RA dva bratři s PRS, rodiče zdraví
F25:I-2*	F	49	-	+	+	+	+	NA	MY, GL	spontánní zlomenina, v rodině výskyt myopie, poruchy sluchu a artropatie
F26:I-2*	F	17	+	-	-	+	+	-	MY	předčasná artróza
F27:I-2*	F	9	-	-	-	+	+	NA	MY, AS	svalová slabost
F28:I-2*	F	30	+	-	-	-	+	-	-	křehké kapiláry

*proband; + klinický znak přítomen; - klinický znak nepřítomen; NA - data nejsou k dispozici; M - muž; F - žena; PRS - Pierre-Robinova sekvence; FD - faciální dysmorfie; PS - porucha sluchu; A - artropatie; KH - kloubní hypermobilita; MVP - prolaps mitrální chlopně; MY - myopie, GL - glaukom, AS - amoce sítnice

Tab. 17: Seznam nalezených variant v souboru pacientů s non-STL fenotypem a jejich *in silico* predikce.

Proband	Fenotyp	Segregace v rodině	Nová / popsaná	Gen	Varianta	<i>In silico</i> predikce								
						SIFT	Poly Phen-2	Mutation taster	SNPs&GO	PhD-SNP	PROVEAN	PANTHER	EIGEN	FATHMM-MKL
V1:II-2	ACG2	<i>de novo</i>	Nová	<i>COL2A1</i>	c.1421_1422delinsTT p.(Gly474Val)	DL	PD	DC	DRP	DRP	DL	-	-	-
V2:II-1	SEDT	<i>de novo</i>	Nová	<i>COL2A1</i>	c.3266_3268del p.(Gly1089del)	-	-	DC	-	-	DL	-	-	-
V3:II-1	EDM6	matka, bratr	Nová	<i>COL9A1</i>	c.1343G>T p.(Gly448Val)	DL	DC	DC	DRP	DRP	DL	PD	P	D

N/P - nová / popsaná, ACG2 - achondrogeze typ 2, SEDT - spondyloepifyzární dysplázie tarda, EDM6 - mnohočetní epifyzární dysplázie 6
DL - deleterious, PD - probably damaging, DC - disease causing, DRP - disease related polymorphism, P - pathogenic, D - damaging.

V rodině S21 jsme molekulárně geneticky analyzovali celkem 6 příbuzných pacienta trpících nesyndromovou postlingvální poruchou sluchu. U původně vyšetřeného 15letého probanda bylo vysloveno podezření na STL vzhledem ke kombinaci postlingvální poruchy sluchu, střední myopie a astenické postavy s mírnou hypermobilitou kloubů. Po nalezení dosud nepopsané frameshift varianty NM_080629.2:c.1560del p.(Ile521Serfs*19) v exonu 13 genu *COL11A1* byli vyšetřeni i rodiče probanda a jeho bratr a varianta byla potvrzena u probandova otce a bratra, kteří oba trpěli postlingvální poruchou sluchu. Z rodinné anamnézy vyplynulo, že postlingvální poruchou sluchu trpí dalších minimálně 7 členů rodiny. Tři další postižení členové rodiny souhlasili s analýzou DNA a varianta u nich byla potvrzena. U 4 členů rodiny, včetně probanda, byla potvrzena myopie mírného či středního stupně, avšak u ostatních nedoslýchavých pacientů nebyla myopie zaznamenána. Podle našich znalostí se jedná o druhou popsanou rodinu na světě s variantou v *COL11A1* genu neboli DFNA37 (Čopíková et al., 2020).

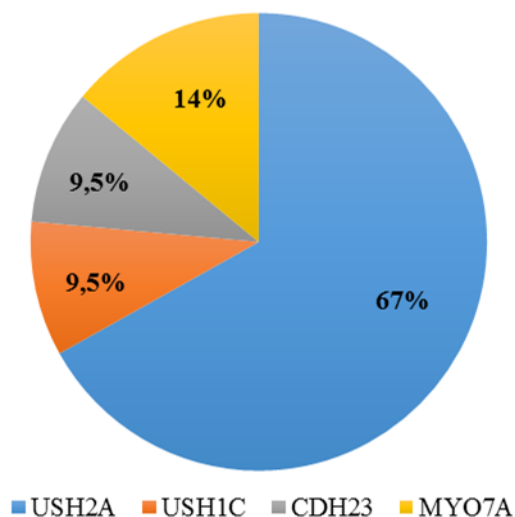
1.6. Vedlejší nálezy

Na žádost spolupracujících klinických genetiků jsme námi designovaný panel použili pro diagnostiku pacientů s podezřením na kolagenopatie s non-STL fenotypem. Ve 3 případech byly zachyceny varianty v STL genech, což do budoucna otvírá další možnosti využití námi navrženého panelu. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 17.

2. Usherův syndrom

V naší studii zaměřené na USH jsme vyšetřili celkem 80 vzorků DNA (30 pacientů a 50 zdravých příbuzných z 27 rodin s různým stupněm poškození sluchu a zraku). Příčina hluchoslepoty byla objasněna u 24 pacientů z 21 rodin (78 % rodin). Molekulárně geneticky bylo potvrzeno 38 nepostižených přenašečů. Celkem u 6 nepříbuzných pacientů s příznaky odpovídajícími USH nebyla použitými metodami nalezena žádná potenciálně patogenní varianta. Ze tří vyšetřených slovenských rodin (všechny s fenotypem USH1) byly kauzální varianty potvrzeny u dvou (U17 a U19). Ostatní rodiny byly českého původu, kromě U21, kde otec pocházel z Nizozemí.

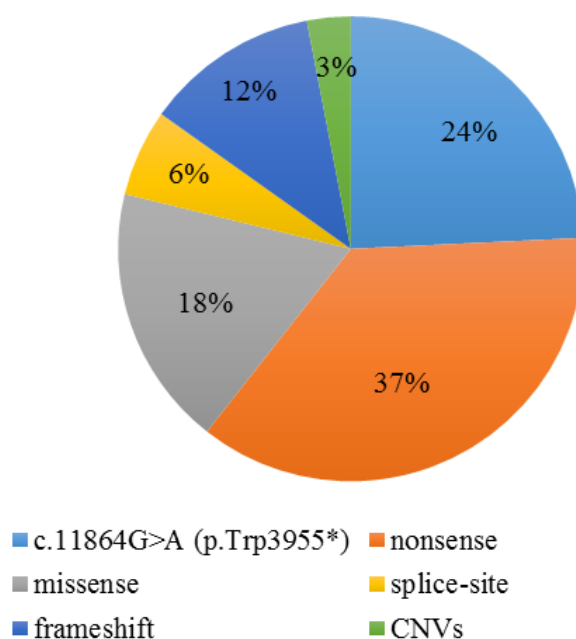
Seznam všech variant nalezených v USH genech a jejich reference jsou uvedeny v Tab. 18. Výsledky *in silico* predikcí všech nově nalezených missense variant jsou shrnuty v Tab. 19 a sestřihových variant v Tab. 20. V souboru nebyly identifikovány žádné nové varianty způsobující vznik předčasného stop kodonu (frameshift varianty), kromě variant typu nonsense, jejichž predikce není zvykem uvádět. Varianty v genu *USH2A* byly nalezeny u 15 pacientů ze 14 rodin (67 %), v genu *MYO7A* u 4 pacientů ze 3 rodin (14 %), v genu *USH1C* u 2 pacientů ze 2 rodin a *CDH23* u 3 pacientů z 2 rodin (9,5 % oba). Procentuální zastoupení jednotlivých USH genů, u kterých byla nalezena patogenní nebo pravděpodobně patogenní varianta, je znázorněno v Grafu 4.



Graf 4: Zastoupení jednotlivých USH genů u pacientů s klinickou diagnózou USH.

2.1. Spektrum a frekvence kauzálních variant v *USH2A*

Celkově nejvíce variant bylo nalezeno v genu *USH2A* (šlo o homozygoty nebo složené heterozygoty), a to 19 variant u 16 pacientů z 15 rodin, z toho 18 variant bylo patogenních nebo pravděpodobně patogenních (třída 4 a 5) a jedna varianta byla třídy 2. Za kauzální považujeme *USH2A* varianty u 15 pacientů ze 14 rodin. Tyto varianty byly vyšetřeny u 30 příbuzných v riziku a u 22 pacientů bylo potvrzeno bezpříznakové přenašečství varianty na jedné alele, 8 příbuzných neneslo žádnou variantu. Proporce variant v *USH2A* na celkovém počtu variant v *USH* genech je vizualizována v Grafu 4 a podíl jednotlivých typů variant nalezených v *USH2A* genu je znázorněn v Grafu 5.



Graf 5: Spektrum nalezených patogenních variant v genu *USH2A* u pacientů s *USH2*.

Z 18 různých kauzálních variant nalezených v *USH2A* genu bylo 9 již popsanych a 9 variant bylo nově nalezených. Nejčastější detekovanou variantou v genu *USH2A* (i v celém našem souboru pacientů) byla již popsaná nonsense varianta **NM_206933.4:c.11864G>A p.(Trp3955*)** a to na 10 izolovaných alelách u 8 rodin (3x v homozygotní formě a 4x v heterozygotní). Tato varianta byla již dříve opakovaně identifikována u pacientů slovanského původu (Bonnet et al., 2016, Zupan et al., 2019) a proto bývá označována jako tzv. „slovanská“ varianta. Z nově nalezených variant se jednalo celkem o 4 varianty typu missense, 2 nonsense varianty, 2 delece a 1 sestřihovou variantu. Velmi zajímavý je nález u pacienta U13:II-1 a to dvě dosud nepopsané varianty v exonu 60,

obě v homozygotním stavu. Segregační analýza potvrdila, že oba rodiče probanda jsou nosiči stejné vzácné alely, aniž by si byli vědomi blízkého příbuzenství, jsou však endogamní.

2.2. Spektrum a frekvence kauzálních variant v *MYO7A*

V genu *MYO7A* pro USH typ 1B jsme identifikovali 6 různých variant u 4 pacientů ze 3 rodin. Kromě jedné varianty se jedná v 5 případech o nově popsané mutace. Popsanou variantou je sestřihová varianta c.471-1G>T v intronu 5 nalezená ve složeně heterozygotním stavu s nově nalezenou nonsense variantou c.4180C>T, p.(Gln1394*) u pacientky s velmi signifikantním fenotypem a současným nálezem dvou variant v genu *USH2A* (obě popsané, jedna jako třída 5 a druhá třída 2). Celkově byly v genu *MYO7A* identifikovány dvě sestřihové varianty, dvě nonsense varianty a dvě missense varianty. U všech pacientů byla vždy přítomna kombinace různých typů variant.

2.3. Spektrum a frekvence kauzálních variant v *USH1C*

V genu *USH1C* pro stejnojmenný typ USH1 byly nalezeny 3 kauzální varianty u dvou nepříbuzných pacientek. Sestřihová varianta c.496+1G>T p?, která byla již v literatuře popsána, byla nalezena u obou pacientek jednou v kombinaci s dosud nepopsanou sestřihovou variantou c.497-2A>C p.? a v druhém případě s nonsense variantou c.937C>T p.(Gln313*).

2.4. Spektrum a frekvence kauzálních variant v *CDH23* a *PCDH15*

U dvou rodin v našem souboru byly zachyceny 3 různé kauzální varianty v genu *CDH23*, z toho u jedné zároveň i dvě varianty v genu *PCDH15*. U této rodiny se jedná o kombinaci nonsense a missense varianty v genu *CDH23*, které dosud nebyly popsány a obě jsou hodnoceny jako třída 4, a dvou již popsaných missense variant v genu *PCDH15* hodnocených jako třída 2-3 resp. 3-4. U druhé rodiny byla potvrzena již popsaná kauzální missense varianta (třída 5) v homozygotním stavu.

Tab. 18: Seznam nalezených variant v souboru českých a slovenských pacientů s USH a jejich klinický význam.

Rodina	Gen	Exon / Intron	Nukleotidová záměna	Aminokyselinová záměna	Genotyp	Metoda	Reference	Klinický význam*
U1:II-5	<i>USH2A</i>	Exon 4	c.773_774del	p.(Ser259Phefs*63)	homozygot	S	Seyedahmadi et al., 2004	Třída 5
U12:II-2	<i>USH2A</i>	Exon 6	c.949C>A	p.(Arg317=)	heterozygot	NGS	Pennings et al., 2004	Třída 5
U21:IV-3	<i>USH2A</i>	Exon 7	c.1256G>T	p.(Cys419Phe)	heterozygot	S	Weston et al., 2000	Třída 5
U6:I-2	<i>USH2A</i>	Exon 10	c.1836_1839dup	p.(Gly614Tyrfs*6)	heterozygot	S	Dreyer et al., 2008	Třída 5
U2	<i>USH2A</i>	Exon 10	c.1840G>T	p.(Gly614*)	heterozygot	S	Nová	Třída 5
U21:IV-3	<i>USH2A</i>	Ex10,11	delece ex 10,11	p.?	heterozygot	MLPA	Nová	Třída 4
U10:II-2	<i>USH2A</i>	Exon 13	c.2209C>T	p.(Arg737*)	heterozygot	NGS	Kaiserman et al., 2007	Třída 5
U12:II-2	<i>USH2A</i>	Exon 13	c.2610C>A	p.(Cys870*)	heterozygot	NGS	Stabej et al., 2012	Třída 5
U6:I-2	<i>USH2A</i>	Exon 28	c.5594A>T	p.(Asp1865Val)	heterozygot	S	Nová	Třída 4
U11:II-1	<i>USH2A</i>	Exon 40	c.7524del	p.(Arg2509Glyfs*19)	heterozygot	NGS	Bonnet et al., 2011	Třída 5
U11:II-1	<i>USH2A</i>	Intron 43	c.8682-9A>G	p.?	heterozygot	NGS	Glöckle et al., 2014	Třída 5
U8:II-1	<i>USH2A</i>	Exon 50	c.9788_9808del	p.(Ile3263_Gly3269del)	heterozygot	S	Nová	Třída 4
U13:II-1	<i>USH2A</i>	Exon 60	c.11660G>T	p.(Trp3887Leu)	homozygot	NGS	Nová	Třída 4
U13:II-1	<i>USH2A</i>	Exon 60	c.11699A>T	p.(Tyr3900Phe)	homozygot	NGS	Nová	Třída 4
U2,U7-9	<i>USH2A</i>	Exon 61	c.11864G>A	p.(Trp3955*)	heterozygot	S	van Wijk et al., 2004	Třída 5
U3,U4,U5					homozygot	S		
U15:II-2					heterozygot	NGS		
U9:II-1	<i>USH2A</i>	Exon 63	c.12525G>C	p.(Trp4175Cys)	heterozygot	S	Nová	Třída 5
U15:II-2	<i>USH2A</i>	Exon 64	c.14074G>A	p.(Gly4692Arg)	heterozygot	NGS	Garcia-Garcia et al., 2011	Třída 2
U10:II-2	<i>USH2A</i>	Intron 65	c.14343+2T>A	p.?	heterozygot	NGS	Nová	Třída 5
U7:II-1	<i>USH2A</i>	Exon 67	c.14621C>G	p.(Ser4874*)	heterozygot	S	Nová	Třída 4
U15:II-2	<i>MYO7A</i>	Intron 5	c.471-1G>A	p.?	heterozygot	NGS	Riazuddin et al., 2008	Třída 5
U14:II-1	<i>MYO7A</i>	Exon14	c.1679A>G	p.(Tyr560Cys)	heterozygot	NGS	Nová	Třída 4
U16:II-1,2	<i>MYO7A</i>	Exon 15	c.1771C>T	p.(Gln591*)	heterozygot	NGS	Nová	Třída 4
U14:II-1	<i>MYO7A</i>	Intron 30	c.3924+1G>C	p.?	heterozygot	NGS	Nová	Třída 4
U15:II-2	<i>MYO7A</i>	Exon 32	c.4180C>T	p.(Gln1394*)	heterozygot	NGS	Nová	Třída 4
U16:II-1,2	<i>MYO7A</i>	Exon 40	c.5497G>C	p.(Gly1833Arg)	heterozygot	NGS	Nová	Třída 4
U17:II-1	<i>USH1C</i>	Intron 5	c.496+1G>T	p.?	heterozygot	NGS	Ebermann et al., 2007	Třída 5
U18:II-1					heterozygot	NGS		
U17:II-1	<i>USH1C</i>	Intron 5	c.497-2A>C	p.?	heterozygot	NGS	Nová	Třída 5
U18:II-1	<i>USH1C</i>	Exon 12	c.937C>T	p.(Gln313*)	heterozygot	NGS	Nová	Třída 4
U19:III-1:	<i>CDH23</i>	Exon 10	c.871G>A	p.(Gly291Arg)	homozygot	NGS	Aparisi et al., 2014	Třída 5
U20:II-1,2	<i>CDH23</i>	Exon 18	c.1888G>T	p.(Glu630*)	heterozygot	NGS	Nová	Třída 4
U20:II-1,2	<i>CDH23</i>	Exon 41	c.5314G>A	p.(Asp1772Asn)	heterozygot	NGS	Nová (rs1247269)	Třída 4
U20:II-1,2	<i>PCDH15</i>	Exon 29	c.3817C>A	p.(Arg1273Ser)	heterozygot	NGS	Bonnet et al., 2011	Třída 3,4
U20:II-1,2	<i>PCDH15</i>	Exon 33	c.5359C>T	p.(Pro1787Ser)	heterozygot	NGS	Stabej et al., 2012	Třída 2,3

Tab. 19: Seznam nalezených variant typu missense u pacientů s USH a jejich *in silico* predikce.

Gen	Exon	Varianta	<i>In silico</i> prediktivní algoritmy								
			SIFT	Poly Phen-2	Mutation taster	SNPs &GO	PhD-SNP	PROVEAN	PANTHER	EIGEN	FATHM M-MKL
<i>USH2A</i>	Exon 28	c.5594A>T p.(Asp1865Val)	Deleterious	Probably damaging	Disease causing	NV	DRP	Deleterious	Probably damaging	Pathogenic	Damaging
<i>USH2A</i>	Exon 63	c.12525G>C p.(Trp4175Cys)	Deleterious	Probably damaging	Disease causing	NV	DRP	Deleterious	Probably damaging	Pathogenic	Damaging
<i>USH2A</i>	Exon 60	c.11660G>T p.(Trp3887Leu)	Deleterious	Possibly damaging	Disease causing	DAV	DRP	Deleterious	Probably damaging	Pathogenic	Damaging
	Exon 60	c.11699A>T p.(Tyr3900Phe)	Deleterious	Probably damaging	Disease causing	DAV	DRP	Deleterious	Probably damaging	Pathogenic	Damaging
<i>MYO7A</i>	Exon 14	c.1679A>G p.(Tyr560Cys)	Deleterious	Probably damaging	Disease causing	DAV	DRP	Deleterious	DAV	Pathogenic	Damaging
<i>MYO7A</i>	Exon 40	c.5497G>C p.(Gly1833Arg)	Deleterious	Probably damaging	Disease causing	DAV	DRP	Deleterious	DAV	Pathogenic	Damaging
<i>CDH23</i>	Exon 41	c.5314G>A p.(Asp1772Asn)	Deleterious	Probably damaging	Disease causing	DAV	DRP	Deleterious	Probably damaging	Pathogenic	Damaging

NV - Neutral variation, DAV - Disease associated variation, DRP - Disease-related polymorphism

Tab. 20: Nalezené sestřihové varianty u pacientů s USH a jejich *in silico* predikce.

Gen	Varianta	Intron	Vliv na sestřih	<i>In silico</i> prediktivní algoritmy					
				Mutation taster	MaxEnt	NNSPLICE	HSF	EIGEN	FATHMM-MKL
<i>USH2A</i>	c.14343+2T>A	Intron 65	Donor splice site	Disease causing	-100%	-100%	-100%	Pathogenic	Damaging
<i>MYO7A</i>	c.3924+1G>C	Intron 30	Donor splice site	Disease causing	-100%	-100%	-100%	Pathogenic	Damaging
<i>USH1C</i>	c.497-2A>C	Intron 5	Acceptor splice site	Disease causing	-100%	-100%	-100%	Pathogenic	Damaging

2.5. Klinické nálezy pacientů s kauzálními variantami v USH genech

Segregace patogenních a pravděpodobně patogenních variant korelovala ve všech rodinách s fenotypem. Hlavní klinické příznaky pacientů s USH uvádí Tab. 21 a Tab. 22.

Podrobné kazuistiky většiny USH rodin s detekovanými variantami jsou shrnuty v Příloze 5 včetně rodokmenů, sekvenogramů a patogenity zodpovědných variant. Všechny rodokmeny byly vytvořeny pomocí programu HaploPainter, a sekvenogramy pomocí programu ChromasPro.

Všem osobám nesoucím patogenní varianty v heterozygotním stavu bylo nabídnuto prekoncepční genetické poradenství. Výsledky analýzy byly sděleny pacientům jejich indikujícími lékaři. U pacientů s prokazatelně patogenními variantami byla provedena genetická konzultace se sdělením výsledků a nabídnutím dovyšetření rodinných příslušníků v riziku. Klinická data pacientů s detekovanými USH variantami jsou shrnuta v Tab. 21 a Tab. 22, data pacientů bez nalezených variant v Tab. 23.

Fenotyp pacientů asociovaný s USH2A variantami

Kauzální varianty či delece genu *USH2A* byla zjištěna u 15 pacientů ze 14 rodin. U všech pacientů byla potvrzena porucha sluchu různého stupně, podrobnější klinická data ohledně poruchy sluchu jsou dostupná pro 13 pacientů ze 12 rodin.

Dva pacienti z 2 rodin (15,5 %) vykazovali těžkou časnou sensorineurální poruchu sluchu s nástupem před druhým rokem života, 5 pacientů ze 4 rodin (38,5 %) se již narodilo se středně těžkou ztrátou sluchu a 6 pacientů z 6 rodin (46 %) trpí mírnou až střední nedoslýchavostí zachycenou mezi 3. a 5. rokem (průměr 4,2 roky).

Relevantní klinická data ohledně poruchy zraku máme k dispozici pro 10 pacientů z 10 rodin. RP a šeroslepost byla přítomna u všech pacientů kromě pacientky U12:II-2, které byly v době vyšetření pouhé 4 roky a pacienta U21:IV-3, v době vyšetření dvouletého. Výsledek očního vyšetření jeho otce U21:III-5 nemáme bohužel k dispozici. Rozvoj RP byl pozorován u pacientů v rozmezí 11 - 30 let (průměr 17,3 let).

Interval mezi nástupem RP a poruchy sluchu byl 8 až 28 let, v průměru kolem 15 let (14,7). Všechny tyto nálezy jsou přehledně shrnuty v Tab. 21.

Fenotyp pacientů asociovaný s variantami v genech spojených s USH1

Všech 9 pacientů ze 7 rodin trpělo těžkou vrozenou senzorineurální hluchotou.

Všechny 4 pacientky ze tří rodin s prokázanými bialelickými variantami v genu *MYO7A* jsou uživatelkami kochleárního implantátu od věku 1 - 2 let z důvodu těžké vrozené ztráty sluchu a u všech byla prokázána vestibulární areflexie, která vedla k poruchám rovnováhy, opožděné vertikalizaci a tím k mírnému opoždění psychomotorického vývoje s nástupem chůze v rozmezí 16 - 18 měsíců, tedy na horní hranici normy.

Žádný z 5 pacientů ze 4 rodin s variantami v genech *USH1C* a *CDH23* subjektivně příznaky poruchy rovnováhy neuváděl a u tří vyšetřených jedinců nebyla vestibulární areflexie přítomna.

Vzhledem k věkovému složení námi vyšetřených pacientek s variantami v genu *MYO7A* (všechny mladší 12 let) se dosud u žádné z nich subjektivně neprojevovalo zužování zorného pole, avšak přístrojovými metodami byla potvrzena počínající RP u pacientky U15:II-2 (ve 4 letech) a U17:II-1 (ve 12 letech). Obě tyto pacientky také subjektivně uvádějí šeroslepost. Dvojčata z rodiny U19 dosud nebyla vzhledem k věku dosud podrobně oftalmologicky vyšetřena a rodiče zatím ve věku 3 let příznaky poruchy zraku nepozorují.

Obě probandky s prokázanými kauzálními variantami v *USH1C* byly sledovány na oftalmologii již od časného dětství, probandka U18:II-1 podstoupila ve 3 letech operaci strabismu a U17:II-1 nosila od 8 let brýle pro refrakční vadu. Obtíže charakteru RP byly podrobným vyšetřením potvrzeny u probandky U18:II-1 ve věku 25 let a u U17:II-1 již v 16 letech. Probandka U17:II-1 trpí dále bolestmi hlavy, skoliózou a srdeční vadou.

Dvě pacientky ze dvou rodin s *CDH23* kauzálními variantami trpí kromě těžké vrozené poruchy sluchu také RP, která byla u obou shodně potvrzena v 15 letech. U obou se jednalo o preventivní vyšetření. Probandka U19:III-1 začala vnímat zúžení zorného pole ve věku 20 let, 16letá pacientka U20:II-2 je zatím bez subjektivních příznaků RP. Na rozdíl od své sestry aktuálně 18letý proband U20:II-1 postižením sítnice netrpí. RP u něj dosud nebyla zjištěna ani při pečlivém vyšetření očního pozadí pomocí speciální optiky.

Tyto nálezy jsou shrnuty v Tab. 22.

Tab. 21: Hlavní klinické příznaky u pacientů s potvrzenými variantami v genu *USH2A*.

Pacient	Gen	Alela 1	Alela 2	Věk	RP	ŠS	Porucha sluchu (věk nástupu v letech, průběh)	Vestibulární funkce
U1:II-5	<i>USH2A</i>	c.773_774del p.(Ser259Phefs*63)		45	17	+	3, progresse, nyní těžká (90 %)	normální
U2	<i>USH2A</i>	c.1840G>T p.(Gly614*)	c.11864G>A p.(Trp3955*)	39	NA	NA	NA	NA
U3	<i>USH2A</i>	c.11864G>A p.(Trp3955*)		32	NA	NA	NA	NA
U4:I-1	<i>USH2A</i>	c.11864G>A p.(Trp3955*)		31	30	+	2, těžká, 80% ztráta	normální
U5:I-1	<i>USH2A</i>	c.11864G>A p.(Trp3955*)		33	14	+	4, mírná	normální
U6:I-2	<i>USH2A</i>	c.5594A>T (Asp1865Val)	c.1836_1839dup p.(Gly614Tyrfs*6)	56	28	+	vrozená, těžká	normální
U7:II-1	<i>USH2A</i>	c.11864G>A p.(Trp3955*)	c.14621C>G p.(Ser4874*)	56	16	+	5, mírná, bilaterálně, sluchadla	normální
U8:II-1	<i>USH2A</i>	c.11864G>A p.(Trp3955*)	c.9788_9808del p.(Ile3263 Gly3269del)	19	15	+	vrozená, středně těžká, sluchadla	normální
U9:II-1	<i>USH2A</i>	c.11864G>A p.(Trp3955*)	c.12525G>C p.(Trp4175Cys)	30	14	+	5, středně těžká, progresivní	normální
U10:II-2	<i>USH2A</i>	c.14343+2T>A p.?	c.2209C>T p.(Arg737*)	35	14	+	4, střední, progresse do KI v 27	normální
U11:II-1	<i>USH2A</i>	c.8682-9A>G p.?	c.7524del p.(Arg2509Glyfs*19)	33	11	+	3, střední (72 %), sluchadla	normální
U12:II-2	<i>USH2A</i>	c.949C>A p. (Arg317=)	c.2610C>A p.(Cys870*)	4	-	-	vrozená, středně těžká	normální
U13:II-1	<i>USH2A</i>	c.11660G>T p.(Trp3887Leu)		31	14	+	vrozená	normální
		c.11699A>T p.(Tyr3900Phe)						
U21:IV-3	<i>USH2A</i>	Delece ex 10,11	c.1256G>T p.(Cys419Phe)	2	-	-	vrozená, středně těžká	normální
U21:III-5	<i>USH2A</i>	Delece ex 10,11	c.1256G>T p.(Cys419Phe)	38	NA	NA	vrozená, středně těžká	NA

+ klinický znak přítomen; - klinický znak nepřítomen, NA - data nejsou k dispozici, čísla ve sloupcích prezentují věk nástupu potíží v letech, tučně nové mutace
Věk - věk při vyšetření v letech, RP - retinitis pigmentosa, ŠS - šeroslepost, v. areflexie - vestibulární areflexie, KI – kochleární implantát, % = procenta dle Fowlera.

Tab. 22: Hlavní klinické příznaky u pacientů s potvrzenými variantami v USH1 genech.

Pacient	Gen	Alela 1	Alela 2	Věk	RP	ŠS	Porucha sluchu (věk nástupu v letech, průběh)	Vestibulární funkce
U14:II-1	<i>MYO7A</i>	c.1679A>G p.(Tyr560Cys)	c.3924+1G>C p.?	12	NA	+	vrozená	v. areflexie
U15:II-2	<i>MYO7A</i>	c.471-1G>T p.?	c.4180C>T p.(Gln1394*)	8	4	+	vrozená	v. areflexie
	<i>USH2A</i>	c.11864G>A p.(Trp3955*)	c.14074G>A p.(Gly4692Arg)					
U16:II-1	<i>MYO7A</i>	c.1771C>T p.(Gln591*)	c.5497G>C p.(Gly1833Arg)	0,75	NA	NA	vrozená	v. areflexie
U16:II-2	<i>MYO7A</i>	c.1771C>T p.(Gln591*)	c.5497G>C p.(Gly1833Arg)	0,75	NA	NA	vrozená	v. areflexie
U17:II-1	<i>USH1C</i>	c.496+1G>T p.?	c.497-2A>C p.?	28	26	+	vrozená	normální
U18:II-1	<i>USH1C</i>	c.496+1G>T p.?	c.937C>T p.(Gln313*)	34	25	NA	vrozená	NA
U19:III-1	<i>CDH23</i>	c.871G>A p.(Gly291Arg)		25	15	+	vrozená	NA
U20:II-1	<i>CDH23</i>	c.1888G>T p.(Glu630*)	c.5314G>A p.(Asp1772Asn)	18	-	-	vrozená, zjištěná v 9 m	normální
	<i>PCDH15</i>	c.3817C>A p.(Arg1273Ser)	c.5359C>T p.(Pro1787Ser)					
U20:II-2	<i>CDH23</i>	c.1888G>T p.(Glu630*)	c.5314G>A p.(Asp1772Asn)	16	15	+	vrozená	normální
	<i>PCDH15</i>	c.3817C>A p.(Arg1273Ser)	c.5359C>T p.(Pro1787Ser)					

+ klinický znak přítomen; - klinický znak nepřítomen, NA - data nejsou k dispozici, čísla ve sloupcích prezentují věk nástupu potíží v letech, tučně nové mutace
Věk - věk při vyšetření v letech, RP - retinitis pigmentosa, ŠS - šeroslepost, v. areflexie - vestibulární areflexie.

2.6 Klinické nálezy u pacientů bez bialelických kauzálních variant v USH genech

Z 6 pacientů z 6 rodin, u kterých nebyly nalezeny žádné patogenní varianty v genech spojených s USH, dva odpovídali fenotypu USH1, tři USH2 a u jednoho pacienta nebyla k dispozici klinická data. Fenotypy všech těchto pacientů jsou shrnuty v Tab. 23. U pacienta U26 z rozsáhlé konsangvinní romské rodiny byly na NGS panelu genů detekovány dvě složeně heterozygotní varianty v jednom z genů pro vrozenou ztrátu sluchu a homozygotní varianty v genu pro časnou ztrátu zraku (dosud nepublikovaná data). Pacient je velmi přesvědčivou fenokopii USH1. Analogickou fenokopii pro USH1 je probandka U25 a pro USH2 probandka U22, u kterých se nám však provedenými vyšetřeními příčinu onemocnění prokázat nepodařilo.

Tab. 23: Hlavní klinické příznaky u pacientů s fenotypem USH bez nalezených variant.

Proband	Věk při vyšetření	RP - věk	Šeroslepost	Porucha sluchu	Vestibulární funkce
U22	42	12	+	1,5; progrese, od 6 let praktická hluchota	normální
U23	24	1	+	14; střední smíšená	normální
U24	44	40	+	30; střední s progresí	normální
U25	37	11	-	vrozená	normální
U26	19	4	+	vrozená	normální
U27	15	NA	NA	NA	NA

+ klinický znak přítomen; - klinický znak nepřítomen, čísla ve sloupcích prezentují věk nástupu potíží v letech, NA - data nejsou k dispozici.

V. DISKUZE

Vzhledem ke společenské a medicínské závažnosti problematiky hluchoslepoty a zejména jejich nejčastějších dědičných forem - Sticklerova a Usherova syndromu, je zpřesnění jejich diagnostiky důležitým přínosem k poznání nejen patogeneze a molekulárního mechanismu vzniku hluchoslepoty, ale také k definování role těchto syndromů v etiologii hluchoslepoty v ČR a SR. Stanovení molekulárně genetických příčin Usherova a Sticklerova syndromu má kruciální přínos pro konečné potvrzení diagnózy pacientů se závažnou prognózou, pro odhalení přenašečství v jejich rodinách a tím celospolečenský význam v oblasti genetického poradenství, kde i díky této práci bude možné za pomoci prenatální a preimplantační diagnostiky zefektivnit primární prevenci těchto devastujících postižení.

1. Sticklerův syndrom

V této studii jsou prezentovány fenotypy a genotypy pacientů s diagnózou STL s detekovanými *COL2A1* a *COL11A1* variantami z celkem 22 nepříbuzných rodin z ČR a SR.

1.1. Patogenita nově nalezených variant v genu *COL2A1*

Dle databáze HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>, 26.11.2020) bylo dodnes publikováno více než 585 patogenních variant v genu *COL2A1*, z toho 266 jako příčina STL1. Naše studie dále rozšiřuje mutační spektrum o 8 nových změn.

Z 8 nově identifikovaných změn jich 5 zasahuje místo sestřihu (ve 4 případech donorové místo a v jednom případě akceptorové místo) a 3 varianty vedou k předčasnému vzniku stop kodonu (2 frameshift a nonsense). U dvou nepříbuzných rodin jsme našli dvě různé dosud nepopsané sestřihové varianty ve stejné pozici donorového místa sestřihu intronu 12 genu *COL2A1* a to **NM_001844.4:c.816+1G>A p.?** u rodiny S7 s familiárním výskytem a **NM_001844.4:c.816+1del p.?** u rodiny S10, kde se vyskytla *de novo*. Obě tyto změny velmi pravděpodobně vedou k aberantnímu sestřihu mRNA pro *COL2A1* a k narušení jeho fyziologické funkce. Většina použitých predikčních programů (6/6 resp. 4/6) hodnotí obě varianty jako patogenní a poškozující protein (Tab. 12), a mají nulovou frekvenci výskytu ve zkoumaných populačních databázích. Obě varianty segregují v rodinách s fenotypem. Dle ACMG hodnocení se jedná v obou případech o patogenní variantu (pathogenic Ia, třída 5, kritéria PVS1, PP1-S, PM2, PM4, PP3, PP4 resp. PVS1, PS2, PM2, PM4, PP3, PP4).

Donorové místo zasahuje také varianta **NM_001844.4:c.924+1del p.?**, a to v intronu 14. Segregační analýzou nebyla zjištěna přítomnost této varianty u matky, otce a bratra probanda, jedná se proto o *de novo* variantu s nulovou alelickou frekvencí výskytu v populaci kontrol a nebyla dosud popsána v literatuře či v db HGMD. *In silico* predikce (Tab. 12) ve 4 programech ze 6 vyhodnotila variantu jako poškozující, dle klasifikace ACMG se jedná o patogenní variantu (Pathogenic Ia, třída 5, kritéria: PVS1, PS2, PM2, PM4, PP3). Z důvodu výše uvedených informací a dle doporučení ACMG považujeme tuto variantu za kauzální pro vznik STL1 u probanda S12:II-1.

Poslední z variant interferujících s funkcí donorového místa sestřihu je **NM_001844.4:c.2679+1G>A p.?**, která s vysokou pravděpodobností ovlivňuje sestřih RNA, má nulovou populační frekvenci a byla vyhodnocena predikčními programy jako vysoce riziková (Tab. 12). Varianta nebyla potvrzena u zdravých rodičů a sestry probandky, jde tedy o výskyt *de novo*. Dle ACMG kritérií (PVS1, PS2, PM2, PM4, PP3, PP4) je hodnocena jako patogenní (Pathogenic Ia, třída 5).

Akceptorové místo intronu 18 narušuje varianta **NM_001844.4:c.1123-2A>G p.?**, která velmi pravděpodobně ovlivňuje sestřih a/nebo stabilitu mRNA. Varianta segreguje s onemocněním v rodině (nese ji i postižená matka a bratr) a predikční programy ukazují vysokou pravděpodobnost poškozujícího efektu (viz Tab. 12). Dle dle ACMG klasifikace je varianta hodnocena jako patogenní (Pathogenic Ia, třída 5, kritéria: PVS1, PS1, PS2, PM2, PM4, PP3, PP4).

První ze tří variant vedoucích k vzniku předčasného stop kodonu a to mechanismem posunu čtecího rámce je *de novo* vzniklá varianta **NM_001844.4:c.2342del p.(Lys781Argfs*7)** v exonu 35 genu *COL2A1* vedoucí k posunu čtecího rámce a tím ke vzniku předčasného terminačního kodonu. Dle ACMG hodnocení je varianta patogenní (Pathogenic Ia, třída 5, kritéria: PVS1, PS2, PM2, PM4, PP3, PP4), variantu proto považujeme za velmi pravděpodobně patogenní.

Druhá varianta posunující čtecí rámec, neboli frameshift varianta, **NM_001844.4:c.3491del p.(Gly1164Valfs*63)** v exonu 50 genu *COL2A1* má dle dostupných databází nulovou populační frekvenci. Dle ACMG kritérií je varianta hodnocena jako patogenní (Pathogenic Ia, třída 5, kritéria: PVS1, PP1-S, PM2, PP1, PP3, PP4). Vzhledem k tomu, že v referenční genomové sekvenci se nalézají tři po sobě jdoucí G narušující rozhraní exonu-intronu, není přesný efekt detekované varianty zřejmý (G na pozicích c.3490 a c.3491 jsou první dva kódující nukleotidy v exonu 50, a G na pozici c.3490-1 pak tvoří první

nukleotid intronu 49). V důsledku detekované varianty dochází k posunu čtecího rámce a k předčasnému ukončení translace proteinu: p.(Gly1164Valfs*63). V rámci posuzování možné patogenity detekované sekvenční varianty jsme dále provedli *in silico* analýzu pomocí predikčních programů hodnotících sestřih, které svědčí pro malý vliv varianty na sestřih mRNA (viz Tab. 13). Segregační analýza potvrdila variantu u postižené matky probanda. Výsledky našeho výzkumu prokázaly, že proband je nositelem varianty c.3491del v genu *COL2A1*, která by mohla způsobovat jeho kongenitální kataraktu a patologickou myopii. K detailní charakterizaci očního nálezu, který by mohl podpořit patogenitu varianty v genu *COL2A1*, by bylo vhodné oční vyšetření a fotodokumentace, a dovyšetření dalších příbuzných (postižené tety probanda a jejího syna), které však bohužel nebylo možné vzhledem k přání rodiny. Další možností, jak podpořit patogenitu detekované varianty, je funkční ověření efektu varianty, které by dle dostupné literatury mělo být možné ze vzorku čerstvé krve (Yaguchi et al., 2011). Dále je doporučeno sledovat probanda a zaměřit se na zhodnocení možných minimálních projevů STL (např. bolesti kloubů, artropatie vzniklá v časném věku, skolióza, kyfóza, postižení sluchu, retruze střední části obličeje, PRS). Na základě zjištěných informací a pozitivní rodinné anamnézy hodnotíme variantu jako kauzální pro onemocnění STL1 u probanda.

Vznik předčasného stop kodonu působí též varianta **NM_001844.4:c.2566C>T p.(Gln856*)** v exonu 39 genu *COL2A1*, která se nevyskytuje v populaci kontrol ani v db HGMD, v db SNP je uvedena pod číslem rs1565674604 a v db ClinVar je varianta uvedena jako patogenní. Jedná se o nonsense variantu, což je u tohoto genu známý mechanismus rozvoje onemocnění. Dle ACMG klasifikace je hodnocena jako patogenní (Pathogenic Ib, třída 5, kritéria: PVS1, PM2, PM6). Variantu uzavíráme jako velmi pravděpodobně patogenní a předpokládáme další potvrzení po vyšetření segregace v rodině.

1.2. Patogenita nově nalezených variant v genu *COL11A1*

Dle databáze HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>, 26.11.2020) bylo dodnes publikováno více než 99 patogenních variant v genu *COL11A1*, z toho 51 kauzálních pro STL2, 13 pro MS, 8 variant pro přechodný fenotyp STL/MS, 7 pro fibrochondrogenézu a 1 pro DFNA37. Naše studie přidává k tomuto spektru 4 nové varianty, dvě pro fenotyp STL2, jednu pro STL/MS a jednu pro DFNA37. Z hlediska typu mutace se jedná o jednu variantu narušující sestřih, jednu variantu vedoucí k předčasnému vzniku terminačního kodonu na podkladě posunu čtecího rámce a o 2 varianty vedoucí k záměně aminokyseliny.

Varianta narušující kanonické akceptorové místo sestřihu intronu 36 genu *COL11A1*, **NM_080629.2:c.2845-1G>C p.?** vede k poruše sestřihu exonu 37. Vystřížení exonu 37 by vedlo k delecí 54 nukleotidů, resp. 18 aminokyselinových zbytků. Varianta má nulovou populační frekvenci a analýza pomocí predikčních sestřihových softwarů ji vyhodnotila jako vysoce rizikovou (Tab. 12). Dle ACMG kritérií (PVS1, PS2, PS4, PM2, PM4, PP3, PP4) je varianta hodnocena jako patogenní (Pathogenic Ia, třída 5). Mechanismus vystřihnutí jednoho z exonů genu *COL11A1* s typickou délkou 54bp byl již dříve popsán jako patogenní pro výsledný protein (Annunen et al., 1999). Z těchto důvodů a také vzhledem k přesvědčivému klinickému nálezu u pacienta a odpovídající segregaci alely v rodině, kde se vyskytla *de novo*, hodnotíme variantu jako velmi pravděpodobně patogenní.

Varianta **NM_080629.2:c.1560del p.(Ile521Serfs*19)** v exonu 13 genu *COL11A1* vedoucí k posunu čtecího rámce, má nulovou populační frekvenci a nebyla dosud popsána v literatuře, není uvedena v db HGMD a ClinVar. Varianta byla prokázána u všech 6 jedinců trpících poruchou sluchu a vyloučena u všech tří zdravých příbuzných. Dle ACMG kritérií (PVS1, PP1-S, PM2, PP3) je hodnocena jako patogenní varianta (Pathogenic Ia, třída 5). Variantu tedy uzavíráme, zejména vzhledem k pravděpodobnému vzniku předčasného terminačního kodonu a segregaci s AD postižením sluchu ve 3 generacích, jako patogenní pro fenotyp DFNA37.

Záměnu aminokyseliny způsobující varianta **NM_080629.2:c.5350A>C p.(Thr1784Pro)** v exonu 67 genu *COL11A1* zasahuje vysoce konzervovanou aminokyselinu ve funkční proteinové doméně a má nulovou populační frekvenci. Predikčními softwary je hodnocena jako závažná (viz Tab. 11), dle ACMG klasifikace jako pravděpodobně patogenní (Likely pathogenic II, třída 4, kritéria: PP1-S, PP3, PP4, PM2, PP2). Varianta byla prokázána i u matky a syna probandky, synův oční fenotyp s těžkou myopií odpovídá STL2, avšak fenotyp matky není zcela kompletně přesvědčivý pro onemocnění STL2, zejména s ohledem na absenci očních symptomů ve vysokém věku. Vzhledem k velké fenotypové variabilitě STL2 obecně není možné u matky STL2 jednoznačně vyloučit či potvrdit. Z uvedených důvodů hodnotíme tuto variantu jako pravděpodobně patogenní.

Druhá missense varianta **NM_080629.2:c.4180G>C p.(Glu1394Gln)** v exonu 56 genu *COL11A1* se nevyskytuje v populaci zdravých kontrol, není uvedena v db ClinVar, HGMD, LOVD, ani v literatuře. *In silico* predikční mechanismy ji hodnotí jako mající vliv na strukturu/funkci proteinu. Segregace v rodině dosud nemohla být ověřena. Na základě dostupných informací hodnotíme nalezenou variantu dle ACMG klasifikace jako variantu

pravděpodobně patogenní (Likely pathogenic IV, třída 4, kritéria: PM2, PM1, PM6), ačkoliv je velmi pravděpodobné, že po dokončení vyšetření segregace v rodině bude varianta překlasifikována na patogenní.

1.3. Frekvence a spektrum *COL2A1* variant

Celkem 3 varianty jsme identifikovali u členů 2 různých nepříbuzných rodin. Zatímco u rodin S3 a S13 se může jednat o efekt zakladatele a rodiny tedy mohou být vzdáleně příbuzné, v obou zbývajících případech se jedná o kombinaci výskytu familiárního a *de novo*, lze tedy uvažovat spíše o efektu hot spot mutace. Existence hot spotů v genu *COL2A1* byla po velmi dlouhou dobu negována (Nishimura et al., 2005, Richards et al., 2010), ačkoliv byly některé mutace nacházeny ve studiích z různých nepříbuzných populací opakovaně. Nicméně recentní metaanalýza (Zhang et al., 2020) shrnující data 663 nezávislých pacientů s potvrzenými variantami v *COL2A1* ukazuje na významnou kumulaci 4 variant nalezených u více než 10 pacientů, z nichž jednu, NM_001844.4:c.2710C>T p.(Arg904Cys), jsme coby jedinou missense variantu v genu *COL2A1* našli u rodiny S1. V uvedené metaanalýze je dále uvedeno 12 rekurentních variant vždy nalezených u 5 až 10 pacientů, z nichž byla v našem souboru prokázána pouze varianta NM_001844.4:c.1597C>T p.(Arg533*) a to u dvou našich rodin s familiárním výskytem nevylučujícím efekt zakladatele.

1.4. Korelace genotyp-fenotyp u pacientů s *COL2A1* variantami

Fenotypy většiny jedinců s *COL2A1* variantou odpovídaly publikovaným kritériím pro STL1 (Rose et al., 2005; Snead, Yates, 1999). Stejně jako v jiných studiích, byly i v naší studii zaznamenány výrazné intrafamiliální rozdíly, obzvlášť v rodině S4 s mírně postiženou matkou a jejími dvěma těžce postiženými dětmi, a v rodině S13, kde probandka S13:II-2 měla typický oční fenotyp asociován se STL1, s myopií v dětství a odchlípením sítnice (RD), zatímco její matka S13:I-2 nevykazovala žádnou oční patologii (tzn. žádná myopie nebo výrazná vitreoretinopatie ve věku 44 let), zatímco u její babičky (mutační status není znám) se vyskytlo odchlípení sítnice pravého oka ve věku 43 let. Tzv. non-okulární fenotyp je velice neobvyklý nález u pacientů nesoucích mutaci způsobující ztrátu funkce genu *COL2A1* jako příčinu STL1. Podle našich znalostí žádný jiný pacient s variantou v *COL2A1* genu neprokázal non-okulární STL fenotyp (Liberfarb et al., 2003, Rose et al., 2005, Hoornaert et al., 2010, Richards et al., 2010, Nagendran et al., 2012).

Jediný pacient (S1:II-1) s missense variantou v *COL2A1* genu - p.(Arg904Cys), která má za následek substituci argininu za cystein v triple-helikální doméně, trpěl malým vzrůstem vyžadující léčbu růstovým hormonem (původně 3. percentil, po zavedení léčby růstovým hormonem 50. percentil), zatímco pacienti s variantami způsobujícími ztrátu funkce proteinu ("loss of function") byli normálního vzrůstu (v průměru 46. percentil). Původně byly za příčinu STL1 považovány pouze mutace mající za následek haploinsuficienci, většinou prostřednictvím posttranskripčního procesu nonsense-mediated mRNA decay (NMD) (Richards et al., 2007, Van der Hout et al., 2002), zatímco missense *COL2A1* mutace vykazující většinou dominantně negativní účinek a vedou k alelickým poruchám závažnějším než STL (Spranger et al., 1994, Husar-Memmer et al., 2013, Barat-Houari et al., 2016) - viz Tab. 2 (alelické choroby STL). Následně však byla zjištěna výjimka, kterou jsou některé záměny argininu za cystein v triple-helikální doméně, které jsou zodpovědné až za 9 % STL1 (Hoornaert et al., 2006, Husar-Memmer et al., 2013) a vedou k fenotypu zahrnujícímu malý vzrůst, který je hlavním rysem non-STL *COL2A1* onemocnění vzniklých na podkladě missense mutací *COL2A1* (Terhal et al., 2012). Z uvedeného lze předpokládat, že pacienti s těmito výjimečnými missense mutacemi vykazují *de facto* fenotypový překryv mezi STL a non-STL chorobami spojenými s patogenními mutacemi v genu *COL2A1*, kde některé záměny Arg>Cys způsobují STL a jiné Arg>Cys záměny způsobují non-STL, ale i u těch, které způsobují STL, je charakteristický fenotyp malého vzrůstu u postižených jedinců.

Rodiny S3 a S13, které nesou obě familiární variantu NM_001844.4:c.1597C>T p.(Arg533*) v několika generacích, jsou až překvapivě fenotypově odlišné. Zatímco v rodině S3 je téměř jediným dominantním projevem unilaterální amoce sítnice nastávající na přelomu druhé a třetí dekády provázená sekundárním glaukomem, kataraktou a oslepnutím na dané oko, v rodině S13 matka probandky (S13:I-2) nevykazuje v páté dekádě věku žádné subjektivní ani objektivní oftalmologické příznaky. U její matky (jejíž genotyp však bohužel není známý) došlo k amoci sítnice po operaci ve čtvrté dekádě, zatímco u její dcery (S13:II-2), narozené s rozštěpem patra, došlo k amoci sítnice již v 7 letech, v obou rodinách je negována přítomnost poruchy sluchu. Varianta byla poprvé popsána u tří amerických nepříbuzných rodin, kde u poloviny probandů byl přítomen rozštěp patra, všichni zkoumaní jedinci měli myopii a/nebo odchlípení sítnice, polovina vykazovala poruchu sluchu a u většiny byly prokázány skeletální abnormality (Liberfarb et al., 2003), dále byla popsána u britské pacientky narozené s rozštěpem patra trpící pouze mírnou myopií, bez známek změn

na skeletu (Nagendran et al., 2012). Lze tedy říci, že korelaci této varianty s konkrétním fenotypem jsme v naší studii ani v literatuře nepozorovali.

Fenotypy probandů z rodin S15 a S17 nesoucích variantu NM_001844.4:c.2659C>T p.(Arg887*) v exonu 40 genu *COL2A1* byly od počátku velmi podobné. Oba se narodili pod obrazem PRS a v časném dětství u nich nastoupila vysoká myopie. U probanda S15:II-1 přes -16D ve věku 1 roku a -9D u probandky S17:II-2 věku 1,5 roku. V rodině S17 se však jedná o familiární výskyt, kde matka a bratr probandky kromě myopie nemají žádné další obtíže. V literatuře je popsán 39letý pacient s relativně vysokým skóre (17) shrnujícím příznaky STL, avšak bez jejich podrobnější specifikace (Hoornaert et al., 2010).

Varianta NM_001844.4:c.2382del p.(Gly795Alafs*86) v exonu 36 genu *COL2A1* se objevila *de novo* u probanda S2:II-2 s PRS, poruchou sluchu, těžkou myopií a amocí sítnice v 6 letech. Stejnou variantu ve familiární formě nese i astenická 53letá probandka S5:II-1 s těžkou myopií na obou očích, strabismem a gotickým patrem a její syn s těžkou myopií a odchlípením sítnice na levém oku, pectus carinatum a bolestivými hypermobilními klouby. Varianta byla poprvé popsána ve výše zmíněné souhrnné studii 100 pacientů se STL a to u dvou pacientů ve věku 5 a 41 let s relativně nižším fenotypovým skóre (10 a 12) (Hoornaert et al., 2010).

1.5. Korelace genotyp-fenotyp u pacientů s *COL11A1* variantami

V této studii jsme identifikovali pomocí metody NGS dvě nové protein zkracující varianty c.2845-1G>C (rodina S19) a c.1560del (rodina S21) a dvě missense varianty c.5350A>C (rodina S20) a c.4180G>C (rodina S22) v genu *COL11A1*. Klinické nálezy u našich pacientů s *COL11A1* variantami byly extrémně variabilní. Heterozygotní varianty se ztrátou funkce *COL11A1* genu byly recentně popsány jako vzácná příčina nesyndromové AD ztráty sluchu. Časná ztráta sluchu byla poprvé zaznamenána u dvou pacientů heterozygotních pro dvě různé protein zkracující varianty v *COL11A1* genu, jejichž potomci trpěli AR fibrochondrogenézí typu I (Tompson et al., 2010). Později se také u velké rodiny s více než 22 postiženými členy prokázalo, že sestřihové heterozygotní varianty v *COL11A1* genu mohou také způsobit mírnou až středně těžkou AD nesyndromovou ztrátu sluchu - DFNA37 (Booth et al., 2019). Podobně jako u těchto pozorování, i v naší studii se vyskytla mírná až střední porucha sluchu u postižených jedinců ze dvou rodin S21 a S22, u kterých jsme metodou NGS detekovali doposud nepopsanou patogenní variantu c.1560del (rodina S21) a pravděpodobně patogenní variantu c.4180G>C (rodina S22) v genu *COL11A1*.

Jediný pacient S19:II-2 se sestřihovou variantou c.2845-1G>C v *COL11A1* genu měl negativní rodinnou anamnézu z hlediska STL symptomů. Těžké zrakové postižení zahrnující vrozený glaukom a kataraktu s opakovanými luxacemi čočky do sklivce a odchlípení sítnice u něho vedlo až k enukleaci pravého oka ve věku 8 let. Fenotypově u něj dominuje exophthalmos a deformita páteře tvořící gibbus. Je též zjevná hypermobilita kloubní a plochonozí. Zatímco jeho oční fenotyp a některé dysmorfické rysy (malý vzrůst, platyspondylie, řídké vlasy, dlouhé philtrum a nízko posazené uši) svědčí spíše pro MS, absence typických rysů pro MS (zejména ztlustění lebky a nitrolební kalcifikace) naznačovala, že pacient spadá do spektra s překrývajícím se fenotypem MS/STL syndromu. Guo et al. (2017) popsali podobný případ dívky s překrývajícím se fenotypem MS a STL2, u které byla nalezena sestřihová varianta c.2808+1G>C. Pacient má též intelektovou nedostatečnost a podobně jako jeho bratr má diagnostikovanou poruchu autistického spektra, které jsou (podle zjištění na jiném pracovišti) důsledkem syndromu fragilního X, kde jejich matka je nosičkou této choroby vyvolané expanzí trinukleotidů v genu *FMR1* na chromozomu X. Tento souběh výskytu dvou syndromů působil značné diagnostické rozpaky. STL2 i MS jsou charakterizovány poruchou pojivové tkáně v důsledku abnormální syntézy kolagenu typu XI. Kolagen XI se nachází v hyalinní chrupavce, sklivci, intervertebrálních discích a ve vnitřním uchu, což vysvětluje, proč se jedná o multisystémové postižení. Jako fenotypové rozdíly mezi oběma syndromy se u MS uvádějí malý vzrůst, sedlovitý kořen nosu, časný nástup poruchy sluchu a výraznější hypoplazie maxily, kdežto u STL2 jsou růstové odchylky s věkem méně výrazné (Imamoglu et al., 2016). V minulosti byly MS a STL2 považovány za dvě různá onemocnění s podobnými fenotypovými projevy. Dnes, vzhledem k objevu patogenních variant ve stejném lokusu *COL11A1* pro oba syndromy, je potřebné zvážit, jestli je potřebné tyto dva syndromy striktně oddělovat.

U pacientky S20:II-2 s velkou škálou různých obtíží (myopie, odchlípení sítnice, porucha sluchu, arthropatie, artróza) byla nalezena dosud nepopsaná missense varianta c.5350A>C p.(Thr1784Pro) asociovaná, jak u probandky tak i u příbuzných, s poruchou zraku a sluchu, a také s kloubními potížemi. Její syn, rovněž nositel stejné varianty, neměl kromě myopie žádné další potíže s klouby ani poruchou sluchu, zatímco její matka trpěla poruchou sluchu a různými kloubními obtížemi, avšak do vysokého věku u ní nebyla prokázána žádná oční patologie.

U pacienta S21:IV-6 s myopií a poruchou sluchu byla nalezena nepopsaná varianta c.1560del, která byla detekována u dalších 5 postižených členů rodiny a tím segregovala

s onemocněním. V rodinné anamnéze však nebyl kromě poruchy sluchu zaznamenán výskyt očních abnormalit (kromě jednoho příbuzného s mírnou myopií, což je ale běžná refrakční chyba). Přestože subklinický fenotyp, jako je velmi mírná vitreopatie, nelze vyloučit, je potřebné doplnit další nezbytné klinické údaje o této rodině, které by potvrdily asociaci nalezené varianty se ztrátou funkce v *COL11A1* genu s AD nesyndromovou ztrátou sluchu.

U probandky S22:II-2 bez nápadnější faciální stigmatizace byla prvním diagnostickým příznakem sensorineurální porucha sluchu v předškolním věku, která se vyskytovala také u dalších příbuzných, a kromě této vady trpěla dále středně vysokou myopií. Byla u ní detekována pravděpodobně patogenní varianta typu missense c.4180G>C v genu *COL11A1* a probandka vykazovala poměrně mírný fenotyp potíží. Dědičný původ varianty nebylo doposud možné ověřit. Nicméně, tento případ dokazuje, že patogenní varianty typu missense v *COL11A1* genu jsou zodpovědné jak za mírný fenotyp, tak za závažný fenotyp asociovaný se STL (viz proband S19:II-2).

Doposud publikované výsledky s nálezem kauzálních variant v *COL11A1* genu asociovaných klinicky se STL se vzájemně liší. Například ve studii Annunena a spol. (Annunen et al., 1999) vykazovali pacienti s *COL11A1* variantami méně závažné oční nálezy, než pacienti s patogenními variantami v genu *COL2A1*, kde téměř všichni pacienti s *COL2A1* variantami měli vitreoretinální degeneraci a amoci sítnice. Autoři studie také zjistili, že kraniofaciální abnormality jsou běžné v případech s kauzálními variantami v *COL11A1*. Ve studii z roku 2004 (Poulson et al., 2004) bylo zjištěno, že 42 % pacientů s *COL11A1* variantami bylo skutečně s vysokým rizikem odchlípení sítnice a až 80 % pacientů mělo určitý stupeň sensorineurální ztráty sluchu. Naše nálezy také potvrzují variabilitu exprese onemocnění. Nicméně, dle výsledků studie Annunen et al. (1999) a výsledků naší studie je zřejmé, že pacienti se STL2 mají častěji středně těžké až těžké poškození sluchu, které je obvykle vrozené nebo diagnostikované v dětství, zatímco u pacientů se STL1 může být normální sluch nebo se u nich vyvine ztráta sluchu později v životě. Zároveň nejtěžší oční postižení v našem souboru nesl právě pacient s variantou v genu *COL11A1*.

1.6. Záchytnost kauzálních variant podle jednotlivých příznaků

Do studie bylo zahrnuto celkem 12 pacientů s PRS a u 9 z nich (75 %) byla zachycena kauzální varianta, z toho u 8 v genu *COL2A1* a u 1 v genu *COL11A1*. Z toho u 7 pacientů byla zároveň přítomna těžká časná myopie (kauzální varianta potvrzena u 6, tedy 86 %, z nich), u 4

lehká myopie (75 % potvrzených) a u 1 pacienta s PRS se v dalším životě myopie nerozvinula.

Ze 45 pacientů mělo 24 těžkou myopii (92 % z nich mělo potvrzené kauzální varianty v STL genech), 15 lehkou až střední myopii (80 % mělo STL variantu) a 6 pacientů myopií netrpělo (u 67 % byly prokázány varianty STL genů). Ze 14 pacientů, kteří prodělali odchlípení sítnice alespoň na jednom oku, mělo 11 zachycenou variantu v genu *COL2A1* a 2 pacienti v genu *COL11A1*, celková záchytnost tedy byla 93 %. U pacientů s potvrzenou variantou v STL genech nastala amoce sítnice v průměrném věku 14,7 roku (rozmezí 6 - 44 let). U pacientky bez nalezené varianty proběhlo odchlípení sítnice v 8 letech.

Typický vzhled obličeje s plochým profilem byl popisován u 25 pacientů a z toho u 22 (88 %) byly potvrzeny varianty v STL genech.

U 23 pacientů byla v průběhu života zjištěna porucha sluchu a u 19 (82 %) z nich byly nalezeny varianty ve STL genech. Porucha sluchu byla u těchto pacientů zjištěna v průměru ve věku 15,5 roku s rozmezím od 5 do 50 let.

Z uvedené statistiky vyplývá, že příznakem s nejvyšší záchytností je odchlípení sítnice a těžká myopie, které následuje porucha sluchu (nejdříve v časném školním věku). Odchlípení sítnice i porucha sluchu jsou příznaky dominující druhé dekádě života. Pro časný záchyt onemocnění je tedy velmi důležitým příznakem vrozená PRS a rozvoj těžké myopie během prvních dvou let života. Nejspecifičtější je samozřejmě kombinace obou symptomů.

1.7. Navržená indikační kritéria pro vyšetření STL v ČR

Na základě pozorování shrnutých v předchozí podkapitole a rozsáhlé rešerše literatury jsme vypracovali níže uvedená vlastní doporučení.

Doporučení jsme recentně publikovali v časopise Otorinolaryngologie a foniatrie (Čopíková et al, 2021).

Ke genetickému vyšetření pro STL je vhodné odeslat tyto pacienty:

- a) všechny pacienty s Pierre-Robinovou sekvencí
- b) všechny kojence a předškoláky s vysokou myopií (-6.0 D a výše)
- c) všechny děti a mladé dospělé s rupturou sítnice
- d) pacienty, kteří mají alespoň 2 z následujících příznaků

- rozštěp patra

- porucha sluchu - všechny typy (po vyloučení souvislosti s rozštěpem patra)
- těžká myopie
- kloubní hypermobilita
- spondyloepifyzární dysplázie
- předčasná degenerace kloubů (TEP před 30. rokem)
- plochý profil obličeje, ustupující brada, prominující oči
- ruptura sítnice (i traumatická, či v dospělém věku)
- pozitivní rodinná anamnéza pro kterýkoliv z uvedených příznaků

2. Usherův syndrom

USH jsme potvrdili u 24 pacientů z 21 rodin. Na 48 alelách bylo nalezeno 33 různých variant v genech pro USH, z toho ve třiceti případech se jednalo o varianty patogenní či pravděpodobně patogenní a ve třech případech o varianty nejasného významu. Mutační spektrum genů asociovaných s USH jsme rozšířili celkem o 18 nových variant, z toho 9 bylo v genu *USH2A*, 5 variant v genu *MYO7A*, 2 varianty v genu *USH1C* a 2 varianty v genu *CDH23*. Klinická distribuce jednotlivých typů v naší kohortě pacientů je 23 % pro USH1, 67 % pro USH2, a 10 % případů představuje atypický USH. Ani v jedné rodině jsme neprokázali vzácný typ USH3. Z uvedeného vyplývá, že typ USH2 je nejčastějším typem v české populaci spolu s nejčastějším kauzálním genem *USH2A*, u kterého jsme detekovali kauzální varianty celkem u 14 rodin. Tato pozorování jsou konzistentní s rozsáhlou studií zahrnující 427 pacientů evropského původu s diagnózou USH, kde 60,4 % pacientů mělo USH2, z toho 91,5 % mělo kauzální varianty v genu *USH2A* (Bonnet et al., 2016). Kauzální varianty se nám podařilo najít u 21 z 27 rodin (78 %), kdy v literatuře je uváděn záchyt 57 – 79,3 % (Le Quesne Stabej et al., Bonnet et al., 2011, Bonnet et al., 2016, Dreyer et al., 2008), což svědčí o pravděpodobné existenci dalších genů, jejichž poruchy jsou kauzální pro USH.

2.1. Patogenita nově nalezených variant v genu *USH2A*

Dle databáze HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>, 26.11.2020) bylo doposud publikováno 1487 variant v genu *USH2A*, z toho 1182 kauzálních, a z nich je 627 s dobře charakterizovaným fenotypem USH2. Tato práce dále rozšiřuje mutační spektrum o 9 nových změn, z nichž 5 bylo predikováno jako měnící délku proteinu (a to dvě delece různého rozsahu, dvě nonsense varianty a jedna varianta narušující sestřih) a 4 byly typu missense.

Nově nalezená **delece exonů 10 a 11** genu *USH2A* v rodině U21 vykazuje z genetického hlediska velmi zajímavý pseudoautozomální přenos mezi otcem a synem, kdy otec i syn mají stejný genotyp - kombinaci mutace a delece v pozici *trans* z důvodu nosičství této nově detekované delece i u matky probanda, přičemž nález nelze vysvětlit dohledatelnou konsangvinitou nebo endogamií rodičů, kteří pocházejí z různých zemí Evropy (ČR a Nizozemí), bez jakékoliv informace o cizokrajném původu některého z jejich předků. Varianta není přítomna v žádné z referenčních databází a ACMG klasifikace ji hodnotí jako patogenní (Pathogenic Ia, třída 5, kritéria: PVS1, PP1-S, PM2, PM3). Frekvence výskytu delecí/duplikací v *USH2A* genu je dle literárních zdrojů dodnes nejasná. Studie zaměřená na dohledání druhé, běžně Sangerovým sekvenováním nezachytitelné, odchylky u 49 pacientů

s monoalelickou patogenní variantou v *USH2A* genu a přesvědčivým fenotypem potvrzujícím USH2 (Steele-Stallard et al., 2013) detekovala delecí jednoho či více exonů u 5 rodin (10 % z vyšetřovaných alel), duplikaci u 1 rodiny (2 %) a hlubokou intronovou variantu c.7595-2144A>G u 3 rodin (6 %). Varianta c.7595-2144A>G byla u všech našich pacientů vyloučena a delece exonů 10 a 11 byla jedinou variantou počtu kopií zachycenou v našem souboru tvořící 2 % všech kauzálních alel.

Druhou deleční variantou je inframe delece 21 nukleotidů v exonu 50 genu *USH2A* **NM_206933.4:c.9788_9808del p.(Ile3263_Gly3269del)**, která nebyla dosud v souvislosti s výskytem USH2 popsána, ačkoliv je uvedena v db SNP pod číslem rs1246009294 (bez bližší specifikace fenotypu) a je uvedena v db gnomAD obsahující data od více než 251 000 jedinců, kde byla nalezena pouze u jednoho člověka latinsko-amerického původu v heterozygotním stavu, není uvedena v db HGMD ani LOVD. Hodnocení dle ACMG klasifikace je patogenní (Pathogenic IIIa, třída 5, kritéria: PS4, PM2, PM3, PM4). Varianta byla nalezena u našeho pacienta U8:II-1 s přesvědčivým USH2 fenotypem v kombinaci s již opakovaně popsanou patogenní tzv. „slovanskou“ variantou NM_206933.4:c.11864G>A (p.Trp3955*).

První z nově popsaných nonsense variant je **NM_206933.4:c.1840G>T p.(Gly614*)** v exonu 10, nacházející se u rodiny U2 v pozici *trans* s patogenní tzv. „slovanskou“ variantou. Nebyla dosud popsána v literatuře, není ani uvedena v db ClinVar, HGMD ani LOVD a má nulovou populační frekvenci. Dle ACMG kritérií (PS4, PM2, PM3, PVS1) je klasifikována jako patogenní (Pathogenic Ia, třída 5).

Druhá varianta mění aminokyselinu na předčasný stop kodon **NM_206933.4:c.14621C>G p.(Ser4874*)** v exonu 67 není uvedena v db HGMD, LOVD, ClinVar a nemá ani uvedenou frekvenci, je hodnocena dle ACMG klasifikace jako patogenní (Pathogenic Ia, třída 5, kritéria: PVS1, PM2, PM3). Nachází se ve funkční proteinové doméně fibronectin type-III. Vyšetření rodiny potvrdilo pozici *trans* s nejčastější variantou nalezenou v souboru, již popsanou patogenní „slovanskou“ variantou NM_206933.4:c.11864G>A (p.Trp3955*).

Sestřihová varianta **NM_206933.4:c.14343+2T>A p.?** v intronu 65 není uvedena v db HGMD ani LOVD, ve stejné pozici však byla publikována jako patogenní jiná záměna c.14343+2T>C (Västinsalo et al., 2012). Varianta je hodnocena predikčními softwary jako vysoce riziková (viz Tab. 20) a dle ACMG kritérií (PVS1, PS1, PM2, PM3) je hodnocena jako patogenní (Pathogenic Ia, třída 5). U probandky se nachází v pozici *trans* s již opakovaně

popsanou patogenní variantou. Vzhledem k narušení donorového místa sestřihu, nulové populační frekvenci a segregaci v rodině považujeme variantu za patogenní.

Ze 4 missense variant se dvě vyskytly ve fázi *trans* s již popsanou kauzální variantou, zatímco druhé dvě zasahují stejný exon a byly nalezeny obě v homozygotní formě u jednoho probanda, jedná se tedy o extrémně vzácnou složenou homozygotitu.

První missense varianta **NM_206933.4:c.5594A>T p.(Asp1865Val)** se nachází v místě středně konzervovaného nukleotidu a slabě konzervované aminokyseliny. Mezi kyselinou asparagovou a valinem je velká fyzikálně-chemická odlišnost (Grantham skóre 152, přičemž rozmezí je 0-215), varianta je přítomna ve funkční laminin G-like 2 doméně. Dle dostupných predikčních programů je tato varianta hodnocena jako patogenní (Tab. 19), což podporuje také nulová frekvence výskytu celosvětově i v evropské populaci. Varianta není také uvedena ani v db ClinVar, HGMD a LOVD, dle ACMG klasifikace je hodnocena jako pravděpodobně patogenní (Likely pathogenic IV, třída 4, kritéria: PM2, PM3, PP1-M, PP2, PP3). Predikční sestřihové softwary MaxEnt, NNSPLICE ani HSF nepředpokládají změnu sestřihového místa způsobenou nalezenou variantou. Vzhledem k fenotypovým projevům a výskytu AR dědičnosti je pravděpodobné, že tato varianta je patogenní.

Druhá varianta způsobující záměnu aminokyseliny **NM_206933.4:c.12525G>C p.(Trp4175Cys)** v exonu 63 není uvedena v referenčních databázích a má nulovou frekvenci výskytu. Pravděpodobně patogenitě nahrává i pozice varianty - nachází se v místě vysoce konzervovaného nukleotidu a vysoce konzervované aminokyseliny. Mezi aminokyselinami tryptofanem a cysteinem je velká fyzikálně-chemická odlišnost, varianta je přítomna v proteinové doméně fibronectin type-III. Segregační analýza potvrdila pozici *trans* s tzv. „slovanskou“ variantou. Predikčními softwary je tato varianta hodnocena jako patogenní (Tab. 19). Dle ACMG kritérií (PS4, PM1, PM2, PM3, PP1) je hodnocena jako patogenní (Pathogenic IIIa, třída 5).

Poslední dvě missense varianty **NM_206933.4:c.11660G>T p.(Trp3887Leu)** a **NM_206933.4:c.11699A>T p.(Tyr3900Phe)** se obě nacházejí v homozygotním stavu, v exonu 60 u jednoho pacienta. Varianty nebyly doposud popsány v literatuře a nejsou ani uvedeny v db HGMD a LOVD, nacházejí se ale 1x v db ClinVar, kde jsou hodnoceny jako patogenní. Nemají uvedenu frekvenci výskytu a jedná se tedy o vzácné varianty. Vzhledem k tomu, že všechny nalezené sekvenční změny včetně polymorfismů byly u pacienta nalezeny v homozygotním stavu, provedli jsme také vyšetření rozsáhlých delecí metodou MLPA. Intragenové delece nebyly detekovány. Dále jsme provedli DNA vyšetření obou rodičů

probanda k vyloučení možné uniparentální disomie, která nebyla potvrzena. Oba rodiče jsou heterozygoti pro obě nalezené varianty. U sekvenční změny c.11660G>T dochází k záměně vysoce konzervované aminokyseliny tryptofan za leucin a je lokalizována v proteinové doméně fibronectin type-III. Podle predikčních programů a dle ACMG kritérií (PS4, PM2, PP1-M, PM1, PM5) je varianta hodnocena jako pravděpodobně patogenní (Pathogenic IIIa, třída 4). U druhé sekvenční změny c.11699A>T p.(Tyr3900Phe) dochází k záměně vysoce konzervované aminokyseliny tyrosin za fenylalanin. Podle predikčních programů a dle ACMG klasifikace je varianta hodnocena jako pravděpodobně patogenní (Likely pathogenic II, třída 4, kritéria: PS4, PM2, PP3). V db HGMD je uvedena jiná varianta ve stejném kodonu NM_206933.4:c.11698T>G p.(Tyr3900Asp) hodnocená jako kauzální pro USH2. V případě této varianty je tedy možné, že by mohla být skutečně příčinou USH u probanda, protože dojde-li k záměně tyrosinu za fenylalanin, jde o aminokyselinu s podobnou strukturou, a to by vysvětlilo mírnější projevy USH u probanda. K jednoznačnému rozhodnutí o patogenitě variant, které jsou přítomné v homozygotní formě, by mohlo přispět molekulárně genetické vyšetření genu *USH2A* u bratrů probanda. Pokud by také varianty v homozygotním stavu nesli a projevy onemocnění u nich nejsou, nejedná se o příčinu USH, pokud by nesli varianty pouze v heterozygotním stavu nebo je neměli, dalo by se určit pravděpodobnou míru patogenity. U obou variant predikční programy ne zcela jednoznačně hodnotí míru patogenity. Spíše se přikláníme ke kauzalitě varianty c.11699A>T, protože velmi podobná varianta již byla v minulosti u pacienta s USH popsána, přesto ACMG hodnocení ukazuje na vyšší patogenitu varianty c.11660G>T.

2.2. Patogenita nově nalezených variant v genu *MYO7A*

V genu *MYO7A* bylo k dnešnímu dni v databázi HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>, 26.11.2020) zveřejněno 599 pravděpodobně patogenních variant, z toho 536 kauzálních, přičemž u 218 z nich byl dobře charakterizován fenotyp USH1B. Tato práce dále rozšiřuje mutační spektrum o 5 nových změn, a to o 3 varianty měnící délku proteinu (dvě nonsense varianty a jednu sestřihovou) a dvě varianty typu missense. Obě missense varianty byly vždy ve fázi *trans* s variantou interferující s délkou proteinu.

Nonsense varianta NM_000260.4:c.1771C>T p.(Gln591*) vede k předčasnému vzniku terminačního kodonu a tím k předčasnému ukončení syntézy proteinu a nemá uvedenou žádnou frekvenci v populačních databázích. Segregační analýza potvrdila fázi *trans* s missense variantou u dvou sourozenců - devítiměsíčních monozygotních dvojčat - s těžkou

vrozenou poruchou sluchu. Varianta se nenachází v žádné z referenčních db a podle ACMG kritérií (PVS1, PP1-S, PM2) je hodnocena jako patogenní (Pathogenic Ia, třída 5).

Druhou nonsense variantu **NM_000260.4:c.4180C>T p.(Gln1394*)** nacházející se v pozici *trans* s již popsanou sestřihovou mutací u dívky s přesvědčivým USH1B fenotypem (vrozená porucha sluchu, vestibulární areflexie, počínající retinopatie na OCT) jsme již publikovali v našem článku (Kremlíková Pourová et al., 2018). Varianta nebyla dříve popsána a měla nulovou alelickou frekvenci v dostupných db. Avšak v jejím okolí se nachází obdobné mutace p.(Arg1373*) a p.(Trp1431*), které byly publikovány jako patogenní pro USH1 (Jaijo et al., 2006 a Le Quesne Stabej et al., 2012). Tato varianta je vedena v db SNP pod číslem rs1235286507, není uvedena v db ClinVar, HGMD a ani LOVD a má nulovou frekvenci výskytu v evropské populaci. ACMG klasifikace ji zhodnotila jako patogenní (Pathogenic Ia, třída 5, kritéria: PVS1, PS4, PP4, PM2).

Varianta **NM_000260.3:c.3924+1G>C p.?** v donorovém sestřihovém místě intronu 30 nebyla podle našich informací dosud publikována a není uvedena v referenční db ani v db HGMD a LOVD. Varianta se nachází v donorovém sestřihovém místě invariantního +1 nukleotidu a s vysokou pravděpodobností ovlivňuje sestřih mRNA, což podporuje i analýza predikčními sestřihovými softwary (Tab. 20), které predikují ztrátu sestřihového místa. Cílené genetické vyšetření u rodinných příslušníků potvrdilo pozici *trans* s rovněž nově popsanou missense variantou. Dle ACMG kritérií (PVS1, PM2, PP4) je varianta hodnocena jako patogenní (Pathogenic Ic, třída 5).

Missense varianta **NM_000260.3:c.1679A>G p.(Tyr560Cys)** v exonu 14 se nachází v pozici *trans* s výše zmíněnou pravděpodobně patogenní sestřihovou variantou NM_000260.3:c.3924+1G>C p.?, není uvedena v referenčních databázích a nachází se v místě vysoce konzervovaného nukleotidu a vysoce konzervované aminokyseliny ve funkční proteinové doméně myosinu VIIA. Mezi tyrosinem a cysteinem je výrazná fyzikálně-chemická odlišnost. K patogenitě se kromě výše uvedených faktů přiklání také hodnocení predikčními softwary (např. PolyPhen: probably damaging, SIFT: deleterious, Mutation Taster: disease causing, dále Tab. 19) a také nulová populační frekvence. ACMG hodnocení varianty je pravděpodobně patogenní (Likely pathogenic IV, třída 4, kritéria: PM1, PP3, PM2, PM3).

Druhá missense varianta **NM_000260.4:c.5497G>C p.(Gly1833Arg)** v exonu 40 nebyla dosud publikována v žádné z databází HGMD, ClinVar a LOVD a nachází se v pozici *trans* s nonsense variantou NM_000260.4:c.1771C>T p.(Gln591*) u monozygotních dvojčat

se segregujícím fenotypem. Varianta c.5497G>C má uvedeno v db SNP číslo rs1367496020 a má téměř nulovou frekvenci výskytu. Nachází se v místě vysoce konzervovaného nukleotidu a vysoce konzervované aminokyseliny, v proteinové doméně MyTH4. Mezi glycinem a argininem je mírná fyzikálně-chemická odlišnost (Grantham skóre 125 z rozmezí 0-215). Predikčními softwary je hodnocena jako patogenní (Tab. 19). Vzhledem k lokalizaci varianty blízko sestřihového místa je možný vliv na sestřih, avšak predikčními programy je stanoven jako minimální (MaxEnt: 0,0 %, NNSPLICE: -4,6 %, HSF: 0,0 %). Dle ACMG kritérií (PP1-S, PM2, PP3, PP4) je hodnocena jako pravděpodobně patogenní (Likely pathogenic II, třída 4), avšak pokud přidáme kritérium PM3, tedy pozici *trans* s patogenní variantou, hodnocení se změní na patogenní (Pathogenic IIIb, třída 5). Vzhledem k segregaci s fenotypem USH1B odpovídajícím věku u obou dvojčat, predikcím a nízkým populačním frekvencím hodnotíme i tuto variantu jako patogenní.

2.3. Patogenita nově nalezených variant v genu *USH1C*

V genu *USH1C* je aktuálně známo a v db HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>, 26.11.2020) uvedeno 59 pravděpodobně patogenních variant, z toho je 44 hodnocených jako kauzální a pouze u 17 z nich je charakterizován fenotyp USH1. Tato práce dále rozšiřuje mutační spektrum o další 2 nové varianty měnící délku proteinu, a to jednu nonsense a jednu sestřihovou. Každá z nich byla nalezena u jednoho pacienta v pozici *trans* s již popsanou sestřihovou variantou c.496+1G>T p.?. Nález varianty c.496+1G>T v genu *USH1C* u dvou nepříbuzných patientek (potvrzeno haplotypovou analýzou) je v souladu se studii popisujících tuto variantu jako hot spot (Stabej et al., 2012).

Varianta **NM_153676.3:c.497-2A>T p.?** mění akceptorové kanonické místo sestřihu intronu 5 genu *USH1C* a má tak značný vliv na pořadí aminokyselin a délku kódovaného proteinu harmoninu. Tomu nasvědčuje i analýza pomocí predikčních sestřihových softwarů, které vyhodnotily tuto variantu jako vysoce rizikovou (Tab. 20), dle ACMG kritérií (PVS1, PM2, PM3, PS1, PP3) je hodnocena jako patogenní (Pathogenic Ia, třída 5). Tato varianta není uvedena v db gnomAD ani v ExAC. Ve stejném místě byla ale popsána jako patogenní varianta c.497-2del (Rizel et al., 2011). Vzhledem k nulové populační frekvenci, pozici *trans* s již popsanou patogenní variantou, při korelaci s fenotypem USH1 u pacientky a dle konsenzuálních kritérií pro sestřihové varianty uzavíráme, že varianta je patogenní.

Varianta **NM_153676.3:c.937C>T p.(Gln313*)** v exonu 12 není uvedena v dostupných db (HGMD, ClinVar, LOVD) a má nulovou alelickou frekvenci v souborech

kontrol. Dle ACMG kritérií (PVS1, PM2, PM3, PP3) je hodnocena jako patogenní (Pathogenic Ib, třída 5). Vzhledem k těmto faktům a pozici *trans* s již popsanou patogenní variantou a při korelaci s fenotypem USH1 u pacientky jsme přesvědčeni, že se jedná o patogenní variantu.

2.4. Patogenita nově nalezených variant v genech *CDH23* a *PCDH15*

K dnešnímu dni je v databázi HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>, 26.11.2020) uvedeno 412 variant v genu *CDH23*, z toho 326 jak kauzální a u 92 z nich je charakterizován fenotyp USH1. Rozšířili jsme mutační spektrum o další 2 nové varianty, z nichž jedna je nonsense a druhá missense a obě segregují s postižením u dvou sourozenců s poruchou sluchu, kteří se liší svým retinálním fenotypem.

Varianta **NM_022124.5:c.1888G>T p.(Glu630*)** v exonu 18 genu *CDH23* je typu nonsense, vede k předčasnému ukončení otevřeného čtecího rámce a zabraňuje vytvoření funkčního proteinu. Ve stejném nukleotidu již byla popsána jiná patogenní záměna, missense mutace **c.1888G>C p.(Glu630Gln)** v homozygotním stavu u pacienta s vrozenou těžkou hluchotou a s klinickou diagnózou typ USH1D, přičemž se jednalo o sporadický výskyt (Sloan-Heggen et al., 2016). Dle ACMG kritérií (PVS1, PS1, PP1-M) je hodnocena jako patogenní (Pathogenic Ia, třída 5).

Druhá nalezená varianta v *CDH23* genu v exonu 41 **NM_022124.5:c.5314G>A p.(Asp1772Asn)** vede k záměně aminokyselinového zbytku a její patogenita byla hodnocena pomocí predikčních softwarů (Tab. 19). Hodnocena byla softwarově i možnost jejího vlivu na sestřih pre-mRNA, která však nebyla zjištěna. Varianta se nachází v místě vysoce konzervovaného nukleotidu a vysoce konzervované aminokyseliny, ve funkční proteinové doméně. Tato varianta, ačkoliv má popsané číslo rs1247269433, nebyla dosud publikována a není ani uvedena v db HGMD a LOVD (shrnutí v Tab. P5.1 v Příloze 5). Dle ACMG kritérií (PP3, PP4, PM2, PM3, PP1-S) je varianta hodnocena jako patogenní (Pathogenic IIIb).

U obou sourozenců byly také v pozici *trans* detekovány dvě varianty v genu *PCDH15*, který je spojen s fenotypem AR hluchota typ 23 (DFNB23) a USH1F. Varianta **NM_033056.3:c.3817C>A p.(Arg1273Ser)** v exonu 29, v db HGMD uvedená jako patogenní pro USH1 (Bonnet et al., 2011, Azaiez et al., 2018), a **NM_033056.3:c.5359C>T p.(Pro1787Ser)**. V db ClinVar jsou obě varianty hodnoceny jako VUS a pravděpodobně benigní. Sporná varianta **c.3817C>A** se nachází v místě středně konzervovaného nukleotidu a středně konzervované aminokyseliny a mezi aminokyselinami argininem a serinem je mírná

fyzikálně-chemická odlišnost (Grantham skóre 110 z rozmezí 0-215). Predikční softwary hodnotí tuto variantu jako patogenní, dle ACMG kritérií (PP5, PP1-M, PM2, PP3) pravděpodobně patogenní (Likely pathogenic V, třída 4). Dle db gnomAD má varianta frekvenci výskytu u evropské populace (NFE, non-finish european) 0,09 %. Druhá nalezená varianta c.5359C>T má dle db gnomAD popsanou frekvenci NFE:1,61 % a nachází se v místě slabě konzervovaného nukleotidu a slabě konzervované aminokyseliny a mezi oběma aminokyselinami je malá fyzikálně-chemická odlišnost (Grantham skóre 74 z rozmezí 0-215). Pomocí predikčních softwarů je tato varianta hodnocena jako benigní. Dle ACMG kritérií (PM3, PP2, PP1) je varianta hodnocena jako VUS (třída 3). Varianta c.3817C>A byla zděděna od otce a varianta c.5359C>T byla zděděna od matky.

Vzhledem k nulové frekvenci výskytu v populačních databázích a klinickému nálezu, kterému dominuje kongenitální hluchota, bez anamnestických známek poruchy rovnováhy v dětství (samostatná chůze u postižené sestry probanda již ve 14 m.), považujeme za nejpravděpodobnější patogenní varianty c.1888G>T a c.5314G>A v genu *CDH23*, přičemž vliv dalších dvou variant v *PCDH15* genu na fenotypový projev také nelze vyloučit.

2.5. Frekvence a spektrum variant v USH genech

Varianta c.2299delG v genu *USH2A* je dle literatury nejčastěji detekovanou mutací v *USH2A* genu tvořící 15 % - 31 % alel nesoucích *USH2A* mutace u pacientů evropského původu (Dreyer et al., 2008, Garcia-Garcia et al., 2011, Le Quesne Stabej et al., 2012). V našem souboru pacientů nebyla tato mutace přítomna. Nejvyšší procentuální zastoupení této mutace uvádí publikace studující Skandinávské (Dreyer et al., 2008) a Britské (Le Quesne Stabej et al., 2012) pacienty, zatímco relativně nižší výskyt - cca 11 % uvádí španělská studie Garcia-Garcia et al. (2011).

V našem souboru byla nejčastěji detekovanou variantou v genu *USH2A* (s výskytem 44 % alel) nonsense mutace c.11864G>A (p.Trp3955*), která byla nalezena celkem u 8 rodin, z toho u tří v homozygotním stavu. Tato mutace byla v britské studii identifikována pouze u jednoho pacienta (1 ze 169 alel), avšak její výskyt byl zjištěn u 2 z 860 kontrolních alel, což je stejná frekvence, jako u nejčastěji zachycené varianty c2299delG. Ve španělské studii nebyla tato mutace zachycena vůbec (Garcia-Garcia et al., 2011), zatímco ve skandinávské studii byla varianta zachycena na 4,1 % alel (Dreyer et al, 2008). Jako nejčastější variantu zahrnující až 84 % patogenních alel ve zkoumaném souboru naopak tuto variantu c.11864G>A (p.Trp3955*) označuje slovinská studie (Zupan et al., 2019), která zároveň

zkoumala možný "founder effect" dané mutace a zjistila podíl 4 rozdílných haplotypů. Nejčastěji zjištěný haplotyp v této studii (haplotyp 2) byl potvrzen i u většiny našich pacientů na spolupracujícím pracovišti laboratoře Centra oční genetiky 1. LF UK a VFN (zdroj: osobní sdělení Ing. Lubica Ďudáková, Ph.D., připravovaný rukopis). Analýza geografického původu varianty u našich pacientů naznačila regionální shlukování alely c.11864G>A v jihovýchodní části ČR (jižní Morava).

Multicentrická studie zahrnující pacienty z Francie, Španělska, Dánska, Německa, Slovinska a Itálie (Bonnet et al., 2016) našla obě diskutované mutace shodně na 22 % (53 resp. 54 z 236) vyšetřovaných alel, dokumentuje však jejich geografickou distribuci, kdy ve Francii převažuje varianta c.2299del (29 vs. 5), v Německu a Itálii je výskyt obou variant relativně v rovnováze (18 vs. 11 a 4 vs. 4), zatímco ve Slovinsku zcela dominuje varianta c.11864G>A (0 vs. 33). Třetí nejčastější variantou zachycenou ve studii je výhradně italská c.10712C>T (10 alel), která v našem souboru též nebyla zachycena. Z uvedeného lze vyvodit, že hlavní roli v distribuci variant hraje efekt zakladatele. U mutace c.2299del je zjevný silný severojižní gradient, přičemž výskyt varianty ve španělské studii lze vysvětlit efektem invaze Vikingů, kdy došlo k zanesení původně skandinávských variant starších než 1500 let do přímořských oblastí středozemních států (Borry, & Matthijs, 2018). Naopak nález vysoké frekvence varianty c.11864G>A, kterou lze dle dosavadně publikované distribuce označit jako „slovanskou“, odpovídá předpokladu o převážně slovanském původu naší populace.

U dvou rodin U15 a U20 byly nalezeny bialelické varianty ve dvou USH genech ve složeně heterozygotním stavu, což představuje 9 % všech případů v naší studii. U rodiny U15 jsme detekovali dvě patogenní varianty v genu *MYO7A* (z nichž jedna byla popsána a druhá nově nalezena) a dvě popsané varianty v genu *USH2A* (z nichž jedna byla popsána jako VUS a druhá jako patogenní), obě ve složeně heterozygotním stavu. Klinický stav pacientky odpovídal USH1 s vrozenou ztrátou sluchu a rozvojem vestibulárních obtíží, avšak nástup poruchy zraku (rodiči subjektivně zachycená šeroslepost i objektivní nález na OCT) je pro danou jednotku velmi časný a předbíhá běžný klinický obraz USH1B až o 10 let. Lze tedy spekulovat o roli interakce mezi poškozenými produkty genů *MYO7A* a *USH2A*. Jedná se s největší pravděpodobností o první dosud popsáný případ ve světové literatuře (Kremlíková Pourová et al., 2018).

U obou postižených sourozenců z rodiny U20 jsme našli dvě dosud nepopsané varianty v genu *CDH23*, které jsou s největší pravděpodobností patogenní, a dvě varianty v genu *PCDH15*, jejichž patogenita není jednoznačně potvrzena. Vzájemná interakce genů

CDH23 a *PCDH15* byla sice popsána, včetně možnosti digenní příčiny USH1 (Zheng et al., 2005), avšak velká meta-analýza genetiky USH (Jouret et al., 2019) dospěla k závěru, že data o digenní dědičnosti nejsou dostatečně silným podkladem pro podporu existence digenické dědičnosti u USH a naznačují, že u postižených jedinců ve výše zmíněných studiích mohly existovat genetické varianty nezjistitelné v té době dostupnými metodami genetického testování. Podrobná korelace fenotypu a genotypu u těchto dvou našich rodin může rozhodně do této diskuse významně přispět.

2.6. Korelace genotyp-fenotyp u pacientů s *USH2A* variantami

Klinické nálezy všech pacientů s detekovanými patogenními nebo pravděpodobně patogenními variantami v genu *USH2A* (celkem 12 rodin, u dvou případů U2 a U3 nemáme relevantní dostupné klinické informace) korelovaly s fenotypem typickým pro USH2.

U všech pacientů starších 10 let byla pozorována šeroslepost a potvrzena retinitis pigmentosa (RP) v průměrném věku 17,3 let (rozmezí 11 - 30 let). Probandka U12:II-2, zachycená ve věku 4 let, a proband U21:IV-3, zachycený ve věku 2 let, dosud nemají žádné příznaky RP. Pro typ USH2 je charakteristický nástup RP v první nebo v druhé dekádě života. U probandů nesoucích nejčastější mutaci c.11864G>A, která zkracuje protein, bylo rozmezí nástupu RP 14 až 30 let s průměrem 22 let (u 2 pacientů s homozygotní mutací je to 14 a 30 let). Pro pacienty homozygotní pro tuto mutaci je popisováno typické náhlé zhoršení zrakové ostrosti po 40. roce života (Zupan et al., 2019), kterého dosud nikdo z našich homozygotních pacientů nedosáhl. Pacienti se dvěma mutacemi zkracujícími protein mají věkové rozmezí 11 až 30 let s průměrem 16,5 roku, dva pacienti s kombinací zkracující a missense mutace, kteří jsou starší než 10 let, mají nástup RP ve 14 a ve 28 letech, pacient s dvěma missense mutacemi ve 14 letech. Je tedy zjevné, že nástup RP není predikovatelný podle konkrétní varianty ani podle jejího typu.

U variant *USH2A* byly popsány různé audiologické fenotypy od mírné až po těžkou ztrátu sluchu (Sadeghi et al., 2013, Hartel et al., 2016, Blanco-Kelly et al., 2015). U všech našich pacientů s variantami v *USH2A* genu byla detekována oboustranná ztráta sluchu různého stupně, kterou lze rozdělit na celkem 3 fenotypy: 1. těžká časná ztráta sluchu (3 pacienti), 2. středně těžká vrozená ztráta sluchu (4 pacienti z 3 rodin) a 3. mírná až střední

postlingvální porucha sluchu zachycená v předškolním věku (6 pacientů). V rámci korelace genotypu s fenotypem jsme v naší kohortě nezjistili vztah mezi konkrétní variantou a jedním z těchto fenotypů. Nejčastější varianta c.11864G>A se vyskytovala v homozygotní formě u 1 pacienta s fenotypem 1 a u jednoho s fenotypem 3, v heterozygotní formě u dvou pacientů s fenotypem 3 a u jednoho s fenotypem 2. Z hlediska typu mutací se kombinace dvou mutací zkracujících protein vyskytla u 7 pacientů se všemi třemi fenotypy, z nichž nejčastěji (4x) nejmírnější fenotyp 3, kombinace missense mutace a zkracující mutace u 4 pacientů se všemi fenotypy, z toho 2x fenotyp 2, a jediný pacient s kombinací missense mutací měl nejtěžší fenotyp 1. Ačkoliv se jedná o poměrně malá čísla, zdá se, že nonsense mutace přináší mírnější audiologický fenotyp než missense, což je ve shodě s pozorováním učiněným na 99 pacientů s fenotypem USH2 (Sun et al., 2018). Ačkoliv dosavadní poznatky možnost jednoznačné korelace mezi typem mutace a audiologickým fenotypem spíše rozporují (Lee et al., 2020, McGee et al., 2010), švédská studie rodin s heterozygotní variantou c.2299del (Sadeghi et al., 2013) naše pozorování podporuje. Pochopení audiologické složitosti spojené s *USH2A* bude užitečné pro genetické poradenství a strategii léčby. Z výsledků této studie tedy vyplývá, že potenciální korelace genotyp-fenotyp pro *USH2A* může být aplikovatelná více pro ztrátu sluchu než pro (RP), což dosud naznačovala pouze jedna studie (Sun et al., 2018).

2.7. Korelace genotyp-fenotyp u pacientů s USH1

Všichni postižení pacienti s variantami v *MYO7A* genu vykazovali podobný klinický obraz s přítomností vrozené oboustranné hluchoty, RP, šerosleposti a vestibulární areflexie. V rámci našeho výzkumu jsme detekovali kauzální varianty v *MYO7A* genu u neslyšící probandky U15:II-2, které byly publikovány v našem článku (Kremlíková Pourová et al., 2018). Naše pozorování i nedávná studie u 16 jedinců ve věku 2-42 let s kauzálními variantami v *MYO7A* genu naznačují, že makulární skenování získané pomocí SD-OCT lze použít jako časný biomarker v diagnostice USH1 předtím, než se u dítěte projeví první symptomy pro noční slepotu nebo před začátkem zhoršování zrakové ostrosti (Sumaroka et al., 2016). SD-OCT také umožňuje kvantifikovat rozsah poškození sítnice a tato metoda může být použita ke sledování progresu onemocnění (Birch et al., 2013, Patel et al., 2015). Kromě toho může být SD-OCT vyšetření použito ke stanovení korelace genotyp - fenotyp v případě, když molekulární genetické vyšetření neprokáže, zda identifikované varianty jsou příčinou

onemocnění. U pacientů s Usherovým syndromem typu 1B je zcela indikovaná bilaterální kochleární implantace, která u naší probandky proběhla ve věku 1 roku a 23 měsíců.

Pozorovali jsme pozoruhodné atypické vestibulární nálezy u dvou nepříbuzných pacientek (U17:II-1 a U18:II-1), u kterých jsme v genu *USH1C* detekovali stejnou patogenní variantu c.496+1G>T, a které obě trpěly vrozenou hluchotou a nástupem RP v první dekádě života. Ani jedna z pacientek neuváděla poruchu vestibulárního systému, případně přidružené potíže asociované s vestibulární areflexí, která je typická pro pacienty s USH1 jako komorbidita těžké poruchy sluchu. V dříve publikovaných studiích byly při klinické diagnostice USH vestibulární testy použity pouze u omezeného počtu pacientů a nejčastěji se jednalo o kalorický test (Zina et al., 2001, Ben Rebeh et al., 2010). Nedávná studie Wafa et al. (2020) pomocí několika metod pro vestibulární testování potvrdila jeden případ pacienta s geneticky potvrzeným USH1 (s nálezem bialelických patogenních variant v genu *MYO7A*), který měl normální nález pomocí vyšetření cVEMP (vestibulární myogenní evokovaný potenciál). Takový klinický obraz je pro USH1B velmi vzácný. Metoda cVEMP měří vestibulární potenciály a je celosvětově běžnou součástí vyšetření vestibulárního systému (Černý et al., 2017). V našem případě, vzhledem k výše zmíněným faktům, bylo oběma pacientkám doporučeno podstoupit podrobnější klinické vyšetření vestibulárního systému, které však vzhledem k současné situaci nebylo dosud provedeno. Rozhodně se přikláníme k tvrzení studie Magliulo et al. (2015), že vestibulární diagnostický protokol může být užitečným doplňkovým nástrojem pro další charakterizaci vestibulárního fenotypu u pacientů s USH a plánujeme další spolupráci s Mgr. Čákrtem O., Ph.D. z Neurologické kliniky 2.LF a FNM na této problematice.

Naše pozorování zcela v souladu s recentní rozsáhlou metaanalýzou studií téměř 2500 pacientů (Bonnet et al., 2019) ukazuje, že fenotyp USH1 je často k nerozeznání od mnoha dalších dědičných poruch spojených se ztrátou sluchu a/nebo RP. Proto se doporučuje použít pro molekulárně genetické testování multigenový panel nebo komplexní genomové testování i u pacientů, kteří dosud nemají rozvinuty všechny kruciální příznaky (ztrátu sluchu, vestibulární poruchu i RP). Analogicky u USH2 je diagnóza velmi často zanedbána vzhledem k bagatelizaci možných genetických příčin poruchy sluchu, která není těžkou vrozenou ztrátou sluchu, a genetické vyšetření začne být ošetřujícím lékařem zvažováno až ve chvíli, kdy pacient buď dospěje do stádia nutnosti kochleární implantace, nebo rozvine závažný stupeň RP.

Dvě dosud nepopsané varianty v genu *CDH23* jsme zachytili u dvou vrozeně neslyšících sourozenců, uživatelů kochleárního implantátu, společně s bialelickými variantami v genu *PCDH15*. Oční nález se na rozdíl od foniatrického nálezu obou sourozenců významně lišil. Zatímco u mladší sestry byly, i přes absenci subjektivních příznaků, zjištěny jisté známky RP, u probanda tyto známky zcela chybí. Patogenní varianty v genu *CDH23* jsou asociovány jak s nesyndromovou hluchotou DFN12 (MIM #601386), tak i s USH1D typem (MIM #601067). Hluchota je primárně způsobena missense mutacemi způsobujícími záměnu aminokyselin. Předpokládá se, že díky reziduální funkci mutovaného proteinu nedochází k rozvoji jiného než sluchového postižení. Varianty typu nonsense, frameshift a některé missense varianty způsobují USH1D. Předpokládá se, že tento typ mutací vede ke vzniku úplně nefunkčního proteinu. Vzhledem k tomu, že varianta **NM_022124.5:c.1888G>T p.(Glu630*)** vede k předčasnému ukončení otevřeného čtecího rámce a všechny známé varianty tohoto typu v homozygotním stavu jsou asociovány s USH1, jedná se o alelu, která by v homozygotním stavu způsobila USH1. Varianta **NM_022124.5:c.5314G>A p.(Asp1772Asn)** je typu missense, tudíž v homozygotním stavu by způsobovala pouze nesyndromovou hluchotu. Na základě všech dostupných informací nelze předpovědět další vývoj možné poruchy zrakových funkcí jak u probanda, tak u jeho sestry nesoucí stejnou kombinaci variant. V literatuře není mnoho údajů o klinických nálezech pacientů, kteří jsou složenými heterozygoty pro nonsense a missense variantu v genu *CDH23*, zda se jejich fenotyp podobá spíše nesyndromové hluchotě DFN12 nebo USH1D. V některých případech bylo pozorováno, že jedna missense alela zřejmě stačí k tomu, aby nedošlo ke vzniku USH. V souvislosti s některými missense mutacemi byl popsán také i atypický průběh onemocnění s pozdním vznikem retinopatie (Astuto et al., 2002; Bolz et al., 2001; Branson et al., 2016). Vzhledem k normálnímu vývoji chůze a klinicky normálnímu nálezu na sítnici u probanda a vzhledem k velmi mírnému postižení sítnice u sestry probanda, se nejedná o typické klinické projevy USH. Ačkoliv patogenita nalezených variant a segregáční analýza v rodině svědčí pro kauzalitu potíží u probanda a jeho sestry, je zapotřebí nadále sledovat stav probanda a jeho sestry. Rodině bylo doporučeno detailní vyšetření vestibulárních funkcí a vyšetření funkce sítnice pomocí elektroretinografie, které může odhalit další doposud nedetekované abnormality. U sestry probanda je nutné také sledovat, jestli dochází k progresi sítnicového nálezu. Ostatní dvě detekované varianty v genu *PCDH15* jsou vzácné a jeví se jako méně pravděpodobně způsobující onemocnění vzhledem k jejich frekvenci výskytu v populaci, která je vyšší, než odpovídá výskytu USH. Obě jsou navíc uvedeny v db ClinVar jako

pravděpodobně nepatogenní nebo jako VUS. Nicméně, vzhledem k popsané digenní dědičnosti pro mutace v *PCDH15* a *CDH23*, nelze vyloučit, že jejich přítomnost klinické vyjádření nějakým způsobem modifikuje. V současné době neumíme vysvětlit, proč je u sestry probanda přítomen nález na sítnici a u jejího staršího bratra (proband) není, i přes přítomnost identických variant v genech *PCDH15* a *CDH23*. Může to být způsobeno buď různým genetickým pozadím, nebo koincidencí dvou různých vzácných onemocnění, tedy RP a nesyndromové hluchoty.

2.8. Navržená indikační kritéria pro genetické vyšetření USH v ČR

Na základě naší studie a jejího porovnání s dostupnou literaturou navrhujeme následující algoritmus výběru pacientů ke genetickému vyšetření kandidátních genů pro USH:

- a) všechny pacienty s vrozenou poruchou sluchu jakéhokoliv stupně, zejména pokud je provázena poruchou rovnováhy či opožděným vzpřimováním*,
- b) všechny kojence a předškolní děti s rozvojem poruchy sluchu a to i střední nebo lehké s progresí,
- c) adolescenty s poruchou sluchu a počínající šeroslepostí či trubicovým viděním,
- d) všechny dospělé pacienty s poruchou zraku a sluchu, které nejsou jasně vysvětlitelné například úrazem, nebo jiným základním onemocněním, s počátkem obtíží před 40. rokem života a preferenčně tehdy, pokud porucha sluchu předchází poruše zraku alespoň o několik let.

* Vyšetření všech vrozeně neslyšících pacientů je vhodné provést pomocí panelu pro poruchy sluchu a zraku, vzhledem k možnosti rozvoje mnoha dalších syndromů. To platí zejména pro pacienty s prematuritou, kde mohou být poruchy zraku a sluchu chybně pokládány za důsledek samotné prematurity, nebo její léčby.

VI. ZÁVĚR

Výzkum provedený v rámci této disertační práce jako první podává data o výskytu Sticklerova a Usherova syndromu v ČR a SR a o spektru kauzálních variant způsobujících obě onemocnění.

U STL poskytuje nový pohled na asociované fenotypy, zejména oligosymptomatické formy onemocnění, které nespĺňují kritéria STL publikovaná Rosem a Sneadem. Tím vyzvedává nutnost molekulárně genetického vyšetření se speciálním zaměřením na geny spojené se STL i v případech inkompletního fenotypu a to zejména z důvodu přítomnosti amoce sítnice v dětství nebo rané dospělosti, Pierre-Robinovy sekvence nebo rozštěpu a dále u pacientů s vysokou myopií. Dále by tyto geny neměly být vyloučeny ani z diagnostiky nesyndromové poruchy sluchu.

V rámci USH jsme potvrdili v ČR jako nejčastější mutaci prevalentní i v jiných slovanských populacích, provedli jsme korelaci genotypu s fenotypem a zjistili, že typ varianty nemá vliv na nástup retinitis pigmentosa, a že charakter poruchy sluchu je těžší v přítomnosti missense mutací.

V době zahájení tohoto výzkumu nebyla molekulárně genetická diagnostika Sticklerova a Usherova syndromu k dispozici. V rámci této disertační práce bylo úspěšně zavedeno molekulárně genetické testování genů pro oba syndromy pomocí Sangerova sekvenování, MLPA analýzy a pomocí masivního paralelního sekvenování. V roce 2018 jsme v rámci této disertační práce navrhli NGS panel pro hluchotu a slepotu, který obsahuje všechny geny asociované s hluchoslepotou, včetně genů pro hluchotu a slepotu izolovaně pro možnost vyloučení fenokopii.

Za naší podpory vznikla pacientská organizace Sticklerův syndrom v ČR v rámci České asociace pro vzácná onemocnění a díky ní šíříme osvětu pomocí sociálních sítí a spolupracujících webových stránek, např. www.vzacni.cz. Spoluprací s klinickými genetiky, ORL specialisty, oftalmology a foniatry jsme vytvořili síť pro záchyt pacientů s podezřením na STL a USH, či jinou formu hluchoslepoty, která se bude i nadále rozrůstat.

Definitivní diagnóza potvrzená identifikací variant způsobujících onemocnění je velice důležitá pro přesné genetické poradenství včetně možnosti prenatální a preimplantační diagnostiky pro pacienta i jeho blízké příbuzné, pro včasnou a cílenou specializovanou multioborovou péči o tyto nemocné a do budoucna také pro cílenou a individualizovanou léčbu onemocnění pomocí genové terapie.

POUŽITÁ LITERATURA

- Abbott, J. A., Guth, E., Kim, C., Regan, C., Siu, V. M., Rugar, C. A., Demeler, B., Francklyn, C. S., & Robey-Bond, S. M. (2017). The Usher Syndrome Type IIIB Histidyl-tRNA Synthetase Mutation Confers Temperature Sensitivity. *Biochemistry*, 56(28), 3619–3631.
- Acke, F. R., Dhooge, I. J., Malfait, F., & De Leenheer, E. M. (2012). Hearing impairment in Stickler syndrome: a systematic review. *Orphanet journal of rare diseases*, 7, 84.
- Adato, A., Michel, V., Kikkawa, Y., Reiners, J., Alagramam, K. N., Weil, D., Yonekawa, H., Wolfum, U., El-Amraoui, A., & Petit, C. (2005). Interactions in the network of Usher syndrome type 1 proteins. *Human molecular genetics*, 14(3), 347–356.
- Adato, A., Vreugde, S., Joensuu, T., Avidan, N., Hamalainen, R., Belenkiy, O., Olender, T., Bonne-Tamir, B., Ben-Asher, E., Espinos, C., Millán, J. M., Lehesjoki, A. E., Flannery, J. G., Avraham, K. B., Pietrovski, S., Sankila, E. M., Beckmann, J. S., & Lancet, D. (2002). USH3A transcripts encode clarin-1, a four-transmembrane-domain protein with a possible role in sensory synapses. *European journal of human genetics : EJHG*, 10(6), 339–350.
- Admiraal, R. J., Szymko, Y. M., Griffith, A. J., Brunner, H. G., & Huygen, P. L. (2002). Hearing impairment in Stickler syndrome. *Advances in oto-rhino-laryngology*, 61, 216–223.
- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S., & Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods*, 7(4), 248–249.
- Ahmad, N., Richards, A. J., Murfett, H. C., Shapiro, L., Scott, J. D., Yates, J. R., Norton, J., & Snead, M. P. (2003). Prevalence of mitral valve prolapse in Stickler syndrome. *American journal of medical genetics. Part A*, 116A(3), 234–237.
- Ahmed, Z. M., Riazuddin, S., Ahmad, J., Bernstein, S. L., Guo, Y., Sabar, M. F., Sieving, P., Riazuddin, S., Griffith, A. J., Friedman, T. B., Belyantseva, I. A., & Wilcox, E. R. (2003). PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23. *Human molecular genetics*, 12(24), 3215–3223.
- Ahmed, Z. M., Riazuddin, S., Aye, S., Ali, R. A., Venselaar, H., Anwar, S., Belyantseva, P. P., Qasim, M., Riazuddin, S., & Friedman, T. B. (2008). Gene structure and mutant alleles of PCDH15: nonsyndromic deafness DFNB23 and type 1 Usher syndrome. *Human genetics*, 124(3), 215–223.
- Ahmed, Z. M., Riazuddin, S., Khan, S. N., Friedman, P. L., Riazuddin, S., & Friedman, T. B. (2009). USH1H, a novel locus for type I Usher syndrome, maps to chromosome 15q22-23. *Clinical genetics*, 75(1), 86–91.
- Ahmed, Z. M., Riazuddin, S., Riazuddin, S., & Wilcox, E. R. (2003). The molecular genetics of Usher syndrome. *Clinical genetics*, 63(6), 431–444.

Aigner, T., Zhu, Y., Chansky, H. H., Matsen, F. A., 3rd, Maloney, W. J., & Sandell, L. J. (1999). Reexpression of type IIA procollagen by adult articular chondrocytes in osteoarthritic cartilage. *Arthritis and rheumatism*, 42(7), 1443–1450.

Alagramam, K. N., Yuan, H., Kuehn, M. H., Murcia, C. L., Wayne, S., Srisailpathy, C. R., Lowry, R. B., Knaus, R., Van Laer, L., Bernier, F. P., Schwartz, S., Lee, C., Morton, C. C., Mullins, R. F., Ramesh, A., Van Camp, G., Hageman, G. S., Woychik, R. P., & Smith, R. J. (2001). Mutations in the novel protocadherin PCDH15 cause Usher syndrome type 1F. *Human molecular genetics*, 10(16), 1709–1718.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2003). *Molecular biology of the cell*. 4th edn. Ann Bot, 91(3):401.

Aller, E., Jaijo, T., Beneyto, M., Nájera, C., Morera, C., Pérez-Garrigues, H., Ayuso, C., & Millán, J. (2007). Screening of the USH1G gene among Spanish patients with Usher syndrome. Lack of mutations and evidence of a minor role in the pathogenesis of the syndrome. *Ophthalmic genetics*, 28(3), 151–155.

Aller, E., Jaijo, T., Beneyto, M., Nájera, C., Oltra, S., Ayuso, C., Baiget, M., Carballo, M., Antiñolo, G., Valverde, D., Moreno, F., Vilela, C., Collado, D., Pérez-Garrigues, H., Navea, A., & Millán, J. M. (2006). Identification of 14 novel mutations in the long isoform of USH2A in Spanish patients with Usher syndrome type II. *Journal of medical genetics*, 43(11), e55.

Aller, E., Jaijo, T., García-García, G., Aparisi, M. J., Blesa, D., Díaz-Llopis, M., Ayuso, C., & Millán, J. M. (2010). Identification of large rearrangements of the PCDH15 gene by combined MLPA and a CGH: large duplications are responsible for Usher syndrome. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(11), 5480–5485.

Aller, E., Jaijo, T., van Wijk, E., Ebermann, I., Kersten, F., García-García, G., Voeselek, K., Aparisi, M. J., Hoefsloot, L., Cremers, C., Díaz-Llopis, M., Pennings, R., Bolz, H. J., Kremer, H., & Millán, J. M. (2010). Sequence variants of the DFNB31 gene among Usher syndrome patients of diverse origin. *Molecular vision*, 16, 495–500.

Alzahrani, F., Al Hazzaa, S. A., Tayeb, H., & Alkuraya, F. S. (2015). LOXL3, encoding lysyl oxidase-like 3, is mutated in a family with autosomal recessive Stickler syndrome. *Human genetics*, 134(4), 451–453.

Anderson, P. J., & David, D. J. (2005). Spinal anomalies in Goldenhar syndrome. *The Cleft palate-craniofacial journal : official publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association*, 42(5), 477–480.

Angeli, S., Lin, X., & Liu, X. Z. (2012). Genetics of hearing and deafness. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 295(11), 1812–1829.

Annunen, S., Körkkö, J., Czarny, M., Warman, M. L., Brunner, H. G., Kääriäinen, H., Mulliken, J. B., Tranebjaerg, L., Brooks, D. G., Cox, G. F., Cruysberg, J. R., Curtis, M. A., Davenport, S. L., Friedrich, C. A., Kaitila, I., Krawczynski, M. R., Latos-Bielenska, A., Mukai, S., Olsen, B. R., Shinno, N., ... Ala-Kokko, L. (1999). Splicing mutations of 54-bp

exons in the COL11A1 gene cause Marshall syndrome, but other mutations cause overlapping Marshall/Stickler phenotypes. *American journal of human genetics*, 65(4), 974–983.

Antunes, R. B., Alonso, N., & Paula, R. G. (2012). Importance of early diagnosis of Stickler syndrome in newborns. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*, 65(8), 1029–1034.

Aparisi, M. J., Aller, E., Fuster-García, C., García-García, G., Rodrigo, R., Vázquez-Manrique, R. P., Blanco-Kelly, F., Ayuso, C., Roux, A. F., Jaijo, T., & Millán, J. M. (2014). Targeted next generation sequencing for molecular diagnosis of Usher syndrome. *Orphanet journal of rare diseases*, 9, 168.

Astuto, L. M., Bork, J. M., Weston, M. D., Askew, J. W., Fields, R. R., Orten, D. J., Ohliger, S. J., Riazuddin, S., Morell, R. J., Khan, S., Riazuddin, S., Kremer, H., van Hauwe, P., Moller, C. G., Cremers, C. W., Ayuso, C., Heckenlively, J. R., Rohrschneider, K., Spandau, U., Greenberg, J., ... Kimberling, W. J. (2002). CDH23 mutation and phenotype heterogeneity: a profile of 107 diverse families with Usher syndrome and nonsyndromic deafness. *American journal of human genetics*, 71(2), 262–275.

Astuto, L. M., Weston, M. D., Carney, C. A., Hoover, D. M., Cremers, C. W., Wagenaar, M., Moller, C., Smith, R. J., Pieke-Dahl, S., Greenberg, J., Ramesar, R., Jacobson, S. G., Ayuso, C., Heckenlively, J. R., Tamayo, M., Gorin, M. B., Reardon, W., & Kimberling, W. J. (2000). Genetic heterogeneity of Usher syndrome: analysis of 151 families with Usher type I. *American journal of human genetics*, 67(6), 1569–1574.

Audo, I., Lancelot, M. E., Mohand-Saïd, S., Antonio, A., Germain, A., Sahel, J. A., Bhattacharya, S. S., & Zeitz, C. (2011). Novel C2orf71 mutations account for ~1% of cases in a large French arRP cohort. *Human mutation*, 32(4), E2091–E2103.

Auffarth, G. U., Tetz, M. R., Krastel, H., Blankenagel, A., & Völcker, H. E. (1997). Cataracta complicata bei verschiedenen Formen der Retinitis pigmentosa. Art und Häufigkeit [Complicated cataracts in various forms of retinitis pigmentosa. Type and incidence]. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*, 94(9), 642–646.

Auslender, N., Bandah, D., Rizel, L., Behar, D. M., Shohat, M., Banin, E., Allon-Shalev, S., Sharony, R., Sharon, D., & Ben-Yosef, T. (2008). Four USH2A founder mutations underlie the majority of Usher syndrome type 2 cases among non-Ashkenazi Jews. *Genetic testing*, 12(2), 289–294.

Azaiez, H., Booth, K. T., Ephraim, S. S., Crone, B., Black-Ziegelbein, E. A., Marini, R. J., Shearer, A. E., Sloan-Heggen, C. M., Kolbe, D., Casavant, T., Schnieders, M. J., Nishimura, C., Braun, T., & Smith, R. (2018). Genomic Landscape and Mutational Signatures of Deafness-Associated Genes. *American journal of human genetics*, 103(4), 484–497.

Baitner, A. C., Maurer, S. G., Gruen, M. B., & Di Cesare, P. E. (2000). The genetic basis of the osteochondrodysplasias. *Journal of pediatric orthopedics*, 20(5), 594–605.

- Baker, S., Booth, C., Fillman, C., Shapiro, M., Blair, M. P., Hyland, J. C., & Ala-Kokko, L. (2011). A loss of function mutation in the COL9A2 gene causes autosomal recessive Stickler syndrome. *American journal of medical genetics. Part A*, 155A(7), 1668–1672.
- Barat-Houari, M., Sarrabay, G., Gatinois, V., Fabre, A., Dumont, B., Genevieve, D., & Touitou, I. (2016). Mutation Update for COL2A1 Gene Variants Associated with Type II Collagenopathies. *Human mutation*, 37(1), 7–15.
- Barrett, T. G., Bunday, S. E., & Macleod, A. F. (1995). Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet (London, England)*, 346(8988), 1458–1463.
- Baux, D., Blanchet, C., Hamel, C., Meunier, I., Larrieu, L., Faugère, V., Vaché, C., Castorina, P., Puech, B., Bonneau, D., Malcolm, S., Claustres, M., & Roux, A. F. (2014). Enrichment of LOVD-USHbases with 152 USH2A genotypes defines an extensive mutational spectrum and highlights missense hotspots. *Human mutation*, 35(10), 1179–1186.
- Baux, D., Larrieu, L., Blanchet, C., Hamel, C., Ben Salah, S., Vielle, A., Gilbert-Dussardier, B., Holder, M., Calvas, P., Philip, N., Edery, P., Bonneau, D., Claustres, M., Malcolm, S., & Roux, A. F. (2007). Molecular and in silico analyses of the full-length isoform of usherin identify new pathogenic alleles in Usher type II patients. *Human mutation*, 28(8), 781–789.
- Ben Rebeh, I., Morinière, M., Ayadi, L., Benzina, Z., Charfedine, I., Feki, J., Ayadi, H., Ghorbel, A., Baklouti, F., & Masmoudi, S. (2010). Reinforcement of a minor alternative splicing event in MYO7A due to a missense mutation results in a mild form of retinopathy and deafness. *Molecular vision*, 16, 1898–1906.
- Ben-Yosef, T., Ness, S. L., Madeo, A. C., Bar-Lev, A., Wolfman, J. H., Ahmed, Z. M., Desnick, R. J., Willner, J. P., Avraham, K. B., Ostrer, H., Oddoux, C., Griffith, A. J., & Friedman, T. B. (2003). A mutation of PCDH15 among Ashkenazi Jews with the type 1 Usher syndrome. *The New England journal of medicine*, 348(17), 1664–1670.
- Berger, W., Meindl, A., van de Pol, T. J., Cremers, F. P., Ropers, H. H., Döermer, C., Monaco, A., Bergen, A. A., Lebo, R., & Warburg, M. (1992). Isolation of a candidate gene for Norrie disease by positional cloning. *Nature genetics*, 1(3), 199–203.
- Bernal, S., Ayuso, C., Antiñolo, G., Gimenez, A., Borrego, S., Trujillo, M. J., Marcos, I., Calaf, M., Del Rio, E., & Baiget, M. (2003). Mutations in USH2A in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa: high prevalence and phenotypic variation. *Journal of medical genetics*, 40(1), e8.
- Bernard, M., Yoshioka, H., Rodriguez, E., Van der Rest, M., Kimura, T., Ninomiya, Y., Olsen, B. R., & Ramirez, F. (1988). Cloning and sequencing of pro-alpha 1 (XI) collagen cDNA demonstrates that type XI belongs to the fibrillar class of collagens and reveals that the expression of the gene is not restricted to cartilagenous tissue. *The Journal of biological chemistry*, 263(32), 17159–17166.
- Berson, E. L., Rosner, B., Sandberg, M. A., Hayes, K. C., Nicholson, B. W., Weigel-DiFranco, C., & Willett, W. (1993). A randomized trial of vitamin A and vitamin E

- supplementation for retinitis pigmentosa. *Archives of ophthalmology* (Chicago, Ill. : 1960), 111(6), 761–772.
- Berson, E. L., Rosner, B., Sandberg, M. A., Weigel-DiFranco, C., & Willett, W. C. (2012). ω -3 intake and visual acuity in patients with retinitis pigmentosa receiving vitamin A. *Archives of ophthalmology* (Chicago, Ill. : 1960), 130(6), 707–711.
- Besnard, T., García-García, G., Baux, D., Vaché, C., Faugère, V., Larrieu, L., Léonard, S., Millan, J. M., Malcolm, S., Claustres, M., & Roux, A. F. (2014). Experience of targeted Usher exome sequencing as a clinical test. *Molecular genetics & genomic medicine*, 2(1), 30–43.
- Besnard, T., Vaché, C., Baux, D., Larrieu, L., Abadie, C., Blanchet, C., Odent, S., Blanchet, P., Calvas, P., Hamel, C., Dollfus, H., Lina-Granade, G., Lespinasse, J., David, A., Isidor, B., Morin, G., Malcolm, S., Tuffery-Giraud, S., Claustres, M., & Roux, A. F. (2012). Non-USH2A mutations in USH2 patients. *Human mutation*, 33(3), 504–510.
- Bharadwaj, A. K., Kasztejna, J. P., Huq, S., Berson, E. L., & Dryja, T. P. (2000). Evaluation of the myosin VIIA gene and visual function in patients with Usher syndrome type I. *Experimental eye research*, 71(2), 173–181.
- Birch, D. G., Locke, K. G., Wen, Y., Locke, K. I., Hoffman, D. R., & Hood, D. C. (2013). Spectral-domain optical coherence tomography measures of outer segment layer progression in patients with X-linked retinitis pigmentosa. *JAMA ophthalmology*, 131(9), 1143–1150.
- Bishop, P. N., Reardon, A. J., McLeod, D., & Ayad, S. (1994). Identification of alternatively spliced variants of type II procollagen in vitreous. *Biochemical and biophysical research communications*, 203(1), 289–295.
- Bitner-Glindzicz, M., Lindley, K. J., Rutland, P., Blaydon, D., Smith, V. V., Milla, P. J., Hussain, K., Furth-Lavi, J., Cosgrove, K. E., Shepherd, R. M., Barnes, P. D., O'Brien, R. E., Farndon, P. A., Sowden, J., Liu, X. Z., Scanlan, M. J., Malcolm, S., Dunne, M. J., Aynsley-Green, A., & Glaser, B. (2000). A recessive contiguous gene deletion causing infantile hyperinsulinism, enteropathy and deafness identifies the Usher type 1C gene. *Nature genetics*, 26(1), 56–60.
- Boëda, B., El-Amraoui, A., Bahloul, A., Goodyear, R., Daviet, L., Blanchard, S., Perfettini, I., Fath, K. R., Shorte, S., Reiners, J., Houdusse, A., Legrain, P., Wolfrum, U., Richardson, G., & Petit, C. (2002). Myosin VIIa, harmonin and cadherin 23, three Usher I gene products that cooperate to shape the sensory hair cell bundle. *The EMBO journal*, 21(24), 6689–6699.
- Bolz, H., Neuhaus, C., Preising, M., Khan, A., Gliem, M., Charbel Issa, P., Wolfrum, U., Gal, A., Lorenz, B., Eisenberger, T. (2013). High-Coverage Next-Generation Sequencing (Ngs) for Retinal Dystrophies and Usher Syndrome: High Diagnostic Yield, Cnv Detection, Novel Disease Mechanisms and Therapy Targets. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*;54:3373.
- Bolz, H., von Brederlow, B., Ramírez, A., Bryda, E. C., Kutsche, K., Nothwang, H. G., Seeliger, M., del C-Salcedó Cabrera, M., Vila, M. C., Molina, O. P., Gal, A., & Kubisch, C.

(2001). Mutation of CDH23, encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D. *Nature genetics*, 27(1), 108–112.

Bonneau, D., Raymond, F., Kremer, C., Klossek, J. M., Kaplan, J., & Patte, F. (1993). Usher syndrome type I associated with bronchiectasis and immotile nasal cilia in two brothers. *Journal of medical genetics*, 30(3), 253–254.

Bonnet, C., Grati, M., Marlin, S., Levilliers, J., Hardelin, J. P., Parodi, M., Niasme-Grare, M., Zelenika, D., Délépine, M., Feldmann, D., Jonard, L., El-Amraoui, A., Weil, D., Delobel, B., Vincent, C., Dollfus, H., Eliot, M. M., David, A., Calais, C., Vigneron, J., ... Denoyelle, F. (2011). Complete exon sequencing of all known Usher syndrome genes greatly improves molecular diagnosis. *Orphanet journal of rare diseases*, 6, 21.

Bonnet, C., Riahi, Z., Chantot-Bastaraud, S., Smaghe, L., Letexier, M., Marcaillou, C., Lefèvre, G. M., Hardelin, J. P., El-Amraoui, A., Singh-Estivalet, A., Mohand-Saïd, S., Kohl, S., Kurtenbach, A., Sliesoraityte, I., Zobor, D., Gherbi, S., Testa, F., Simonelli, F., Banfi, S., Fakin, A., ... Petit, C. (2016). An innovative strategy for the molecular diagnosis of Usher syndrome identifies causal biallelic mutations in 93% of European patients. *European journal of human genetics : EJHG*, 24(12), 1730–1738.

Bonné-Tamir, B., Korostishevsky, M., Kalinsky, H., Seroussi, E., Beker, R., Weiss, S., & Godel, V. (1994). Genetic mapping of the gene for Usher syndrome: linkage analysis in a large Samaritan kindred. *Genomics*, 20(1), 36–42.

Booth, K. T., Askew, J. W., Talebizadeh, Z., Huygen, P., Eudy, J., Kenyon, J., Hoover, D., Hildebrand, M. S., Smith, K. R., Bahlo, M., Kimberling, W. J., Smith, R., Azaiez, H., & Smith, S. D. (2019). Splice-altering variant in COL11A1 as a cause of nonsyndromic hearing loss DFNA37. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 21(4), 948–954.

Booth, K. T., Kahrizi, K., Babanejad, M., Daghigh, H., Bademci, G., Arzhangi, S., Zareabdollahi, D., Duman, D., El-Amraoui, A., Tekin, M., Najmabadi, H., Azaiez, H., & Smith, R. J. (2018). Variants in CIB2 cause DFNB48 and not USH1J. *Clinical genetics*, 93(4), 812–821.

Bork, J. M., Peters, L. M., Riazuddin, S., Bernstein, S. L., Ahmed, Z. M., Ness, S. L., Polomeno, R., Ramesh, A., Schloss, M., Srisailpathy, C. R., Wayne, S., Bellman, S., Desmukh, D., Ahmed, Z., Khan, S. N., Kaloustian, V. M., Li, X. C., Lalwani, A., Riazuddin, S., Bitner-Glindzicz, M., ... Morell, R. J. (2001). Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene CDH23. *American journal of human genetics*, 68(1), 26–37.

Borry, P., Matthijs, G. *Všichni jsme geniální: lidská genetika slovem & obrazem*. Přeložil Zuzana HENEŠOVÁ. Praha: Galén, [2018]. ISBN 978-80-7492-363-0. str. 149.

- Boughman, J. A., Vernon, M., & Shaver, K. A. (1983). Usher syndrome: definition and estimate of prevalence from two high-risk populations. *Journal of chronic diseases*, 36(8), 595–603.
- Boye, S. E., Boye, S. L., Lewin, A. S., & Hauswirth, W. W. (2013). A comprehensive review of retinal gene therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 21(3), 509–519.
- Branson, S. V., McClintic, J. I., Stamper, T. H., Haldeman-Englert, C. R., & John, V. J. (2016). Sector Retinitis Pigmentosa Associated With Novel Compound Heterozygous Mutations of CDH23. *Ophthalmic surgery, lasers & imaging retina*, 47(2), 183–186.
- Brodsky, B., & Persikov, A. V. (2005). Molecular structure of the collagen triple helix. *Advances in protein chemistry*, 70, 301–339.
- Bujakowska, K. M., Consugar, M., Place, E., Harper, S., Lena, J., Taub, D. G., White, J., Navarro-Gomez, D., Weigel DiFranco, C., Farkas, M. H., Gai, X., Berson, E. L., & Pierce, E. A. (2014). Targeted exon sequencing in Usher syndrome type I. *Investigative ophthalmology & visual science*, 55(12), 8488–8496.
- Calabrese, R., Capriotti, E., Fariselli, P., Martelli, P. L., & Casadio, R. (2009). Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. *Human mutation*, 30(8), 1237–1244.
- Capriotti, E., Calabrese, R., & Casadio, R. (2006). Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 22(22), 2729–2734.
- Carroll, C., Papaioannou, D., Rees, A., & Kaltenthaler, E. (2011). The clinical effectiveness and safety of prophylactic retinal interventions to reduce the risk of retinal detachment and subsequent vision loss in adults and children with Stickler syndrome: a systematic review. *Health technology assessment (Winchester, England)*, 15(16), iii–62.
- Cartegni, L., Chew, S. L., & Krainer, A. R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature reviews. Genetics*, 3(4), 285–298.
- Collin, R. W., Safieh, C., Littink, K. W., Shalev, S. A., Garzosi, H. J., Rizel, L., Abbasi, A. H., Cremers, F. P., den Hollander, A. I., Klevering, B. J., & Ben-Yosef, T. (2010). Mutations in C2ORF71 cause autosomal-recessive retinitis pigmentosa. *American journal of human genetics*, 86(5), 783–788.
- Collins, F. A., Murphy, D. L., Reiss, A. L., Sims, K. B., Lewis, J. G., Freund, L., Karoum, F., Zhu, D., Maumenee, I. H., & Antonarakis, S. E. (1992). Clinical, biochemical, and neuropsychiatric evaluation of a patient with a contiguous gene syndrome due to a microdeletion Xp11.3 including the Norrie disease locus and monoamine oxidase (MAOA and MAOB) genes. *American journal of medical genetics*, 42(1), 127–134.
- Corsten-Janssen, N., Saitta, S. C., Hoefsloot, L. H., McDonald-McGinn, D. M., Driscoll, D. A., Derks, R., Dickinson, K. A., Kerstjens-Frederikse, W. S., Emanuel, B. S., Zackai, E. H., &

- van Ravenswaaij-Arts, C. M. (2013). More Clinical Overlap between 22q11.2 Deletion Syndrome and CHARGE Syndrome than Often Anticipated. *Molecular syndromology*, 4(5), 235–245.
- Cremers, F. P., Kimberling, W. J., Külm, M., de Brouwer, A. P., van Wijk, E., te Brinke, H., Cremers, C. W., Hoefsloot, L. H., Banfi, S., Simonelli, F., Fleischhauer, J. C., Berger, W., Kelley, P. M., Haralambous, E., Bitner-Glindzicz, M., Webster, A. R., Saihan, Z., De Baere, E., Leroy, B. P., Silvestri, G., ... Kremer, H. (2007). Development of a genotyping microarray for Usher syndrome. *Journal of medical genetics*, 44(2), 153–160.
- Cuevas, J. M., Espinós, C., Millán, J. M., Sánchez, F., Trujillo, M. J., Ayuso, C., Beneyto, M., & Nájera, C. (1999). Identification of three novel mutations in the MYO7A gene. *Human mutation*, 14(2), 181.
- Cuevas, J. M., Espinós, C., Millán, J. M., Sánchez, F., Trujillo, M. J., García-Sandoval, B., Ayuso, C., Nájera, C., & Beneyto, M. (1998). Detection of a novel Cys628STOP mutation of the myosin VIIA gene in Usher syndrome type Ib. *Molecular and cellular probes*, 12(6), 417–420.
- Černý, R., O. Čákr a J. Jeřábek. Laboratorní metody vyšetření vestibulárního aparátu. *Neurologie pro praxi* [online]. 2017, 18(3), 163-169 [cit. 2018-07-24].
- Čopíková, J., Paděrová, J., Románková, V., Havlovicová, M., Balaščíková, M., Zelinová, M., Vejvalková, Š., Simandlová, M., Štěpánková, J., Hořínová, V., Kantorová, E., Křečková, G., Pospíšilová, J., Boday, A., Meszarosová, A. U., Turnovec, M., Votýpka, P., Lišková, P., & Kremlíková Pourová, R. (2020). Expanding the phenotype spectrum associated with pathogenic variants in the COL2A1 and COL11A1 genes. *Annals of human genetics*, 84(5), 380–392.
- Čopíková, J., Katra, R., Kremlíková Pourová, R. (2020). Sticklerův syndrom v České republice: fenotypová variabilita a genetická heterogenita - přijat k publikaci v časopise Otorinolaryngologie a foniatrie dne 9.9.2020 (email: MUDr. David Kalfěť, Ph.D., technický redaktor Otorinolaryngologie a foniatrie)
- Daiger, S. P., Sullivan, L. S., & Bowne, S. J. (2013). Genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Clinical genetics*, 84(2), 132–141.
- Dammeyer, J. (2010). Prevalence and aetiology of congenitally deafblind people in Denmark. *International journal of audiology*, 49(2), 76–82.
- Dammeyer, J. (2015). Deafblindness and dual sensory loss research: current status and future directions. *World Journal of Otorhinolaryngology* 5 (2), 37– 40.
- Davenport, S.L.H., Omenn, G.S. (1977). The heterogeneity of Usher syndrome. (Abstract). Vth Int. Conf. on Birth defects. Montreal, 8/1977.
- de Brouwer, A. P., Pennings, R. J., Roeters, M., Van Hauwe, P., Astuto, L. M., Hoefsloot, L. H., Huygen, P. L., van den Helm, B., Deutman, A. F., Bork, J. M., Kimberling, W. J., Cremers, F. P., Cremers, C. W., & Kremer, H. (2003). Mutations in the calcium-binding

motifs of CDH23 and the 35delG mutation in GJB2 cause hearing loss in one family. *Human genetics*, 112(2), 156–163.

De Golovine, S., Wu, S., Hunter, J. V., & Shearer, W. T. (2012). Goldenhar syndrome: a cause of secondary immunodeficiency?. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 8(1), 10.

den Dunnen, J. T., Dalgleish, R., Maglott, D. R., Hart, R. K., Greenblatt, M. S., McGowan-Jordan, J., Roux, A. F., Smith, T., Antonarakis, S. E., & Taschner, P. E. (2016). HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Human mutation*, 37(6), 564–569.

Desmet, F. O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Bérout, G., Claustres, M., & Bérout, C. (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic acids research*, 37(9), e67.

Deyl, Z., Adam, M. (1982). *Collagen in aging and disease*, 1. vydání. Academia. Praha

Dietz H. C. (1997). Nonsense mutations and altered splice-site selection. *American journal of human genetics*, 60(3), 729–730.

Donoso, L. A., Edwards, A. O., Frost, A. T., Ritter, R., 3rd, Ahmad, N., Vrabec, T., Rogers, J., Meyer, D., & Parma, S. (2003). Clinical variability of Stickler syndrome: role of exon 2 of the collagen COL2A1 gene. *Survey of ophthalmology*, 48(2), 191–203.

Donoso, L. A., Edwards, A. O., Frost, A. T., Ritter, R., Ahmad, N. N., Vrabec, T., Rogers, J., & Meyer, D. (2002). Identification of a stop codon mutation in exon 2 of the collagen 2A1 gene in a large stickler syndrome family. *American journal of ophthalmology*, 134(5), 720–727.

Dreyer, B., Brox, V., Tranebjaerg, L., Rosenberg, T., Sadeghi, A. M., Möller, C., & Nilssen, O. (2008). Spectrum of USH2A mutations in Scandinavian patients with Usher syndrome type II. *Human mutation*, 29(3), 451.

Dupont, C., Baumann, C., Le Du, N., Schaefer, E., Guimiot, F., Boutaud, L., Capri, Y., Spaggiari, E., Aboura, A., Benzacken, B., & Tabet, A. C. (2013). COL2A1 gene disruption by a balanced translocation t(12;15)(q13;q22.2) in familial Stickler syndrome. *American journal of medical genetics. Part A*, 161A(10), 2663–2665.

Ebermann, I., Koenekoop, R. K., Lopez, I., Bou-Khizam, L., Pigeon, R., & Bolz, H. J. (2009). An USH2A founder mutation is the major cause of Usher syndrome type 2 in Canadians of French origin and confirms common roots of Quebecois and Acadians. *European journal of human genetics : EJHG*, 17(1), 80–84.

Ebermann, I., Lopez, I., Bitner-Glindzicz, M., Brown, C., Koenekoop, R. K., & Bolz, H. J. (2007). Deafblindness in French Canadians from Quebec: a predominant founder mutation in the USH1C gene provides the first genetic link with the Acadian population. *Genome biology*, 8(4), R47.

- Ebermann, I., Phillips, J. B., Liebau, M. C., Koenekoop, R. K., Schermer, B., Lopez, I., Schäfer, E., Roux, A. F., Dafinger, C., Bernd, A., Zrenner, E., Claustres, M., Blanco, B., Nürnberg, G., Nürnberg, P., Ruland, R., Westerfield, M., Benzing, T., & Bolz, H. J. (2010). PDZD7 is a modifier of retinal disease and a contributor to digenic Usher syndrome. *The Journal of clinical investigation*, 120(6), 1812–1823.
- Ebermann, I., Scholl, H. P., Charbel Issa, P., Becirovic, E., Lamprecht, J., Jurklies, B., Millán, J. M., Aller, E., Mitter, D., & Bolz, H. (2007). A novel gene for Usher syndrome type 2: mutations in the long isoform of whirlin are associated with retinitis pigmentosa and sensorineural hearing loss. *Human genetics*, 121(2), 203–211.
- Edwards, A., Fishman, G. A., Anderson, R. J., Grover, S., & Derlacki, D. J. (1998). Visual acuity and visual field impairment in Usher syndrome. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 116(2), 165–168.
- Eisenberger, T., Slim, R., Mansour, A., Nauck, M., Nürnberg, G., Nürnberg, P., Decker, C., Dafinger, C., Ebermann, I., Bergmann, C., & Bolz, H. J. (2012). Targeted next-generation sequencing identifies a homozygous nonsense mutation in ABHD12, the gene underlying PHARC, in a family clinically diagnosed with Usher syndrome type 3. *Orphanet journal of rare diseases*, 7, 59.
- Ensenberger, M. G., Thompson, J., Hill, B., Homick, K., Kearney, V., Mayntz-Press, K. A., Mazur, P., McGuckian, A., Myers, J., Raley, K., Raley, S. G., Rothove, R., Wilson, J., Wiczorek, D., Fulmer, P. M., Storts, D. R., & Krenke, B. E. (2010). Developmental validation of the PowerPlex 16 HS System: an improved 16-locus fluorescent STR multiplex. *Forensic science international. Genetics*, 4(4), 257–264.
- Espinós, C., Millán, J. M., Beneyto, M., & Nájera, C. (1998). Epidemiology of Usher syndrome in Valencia and Spain. *Community genetics*, 1(4), 223–228.
- Eudy, J. D., & Sumegi, J. (1999). Molecular genetics of Usher syndrome. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 56(3-4), 258–267.
- Eudy, J. D., Weston, M. D., Yao, S., Hoover, D. M., Rehm, H. L., Ma-Edmonds, M., Yan, D., Ahmad, I., Cheng, J. J., Ayuso, C., Cremers, C., Davenport, S., Moller, C., Talmadge, C. B., Beisel, K. W., Tamayo, M., Morton, C. C., Swaroop, A., Kimberling, W. J., & Sumegi, J. (1998). Mutation of a gene encoding a protein with extracellular matrix motifs in Usher syndrome type IIa. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5370), 1753–1757.
- Eyre, D.R., Wu, J.J. Type XI or 1 α 2 α 3 α collagen. In *Structure and Function of Collagen Types* Edited by Mayne R, Burgeson RE New York: Academic Press; 1987. pp. 261–281.
- Faletta, F., D'Adamo, A. P., Bruno, I., Athanasakis, E., Biskup, S., Esposito, L., & Gasparini, P. (2014). Autosomal recessive Stickler syndrome due to a loss of function mutation in the COL9A3 gene. *American journal of medical genetics. Part A*, 164A(1), 42–47.
- Ferrari, S., Di Iorio, E., Barbaro, V., Ponzin, D., Sorrentino, F. S., & Parmeggiani, F. (2011). Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. *Current genomics*, 12(4), 238–249.

Fields, R. R., Zhou, G., Huang, D., Davis, J. R., Möller, C., Jacobson, S. G., Kimberling, W. J., & Sumegi, J. (2002). Usher syndrome type III: revised genomic structure of the USH3 gene and identification of novel mutations. *American journal of human genetics*, 71(3), 607–617.

Filouš, A., Korynta, J., Čihař, M., Zoban, P., Rodný, S., Michálek, J. (2000). Komplexní terapie vrozené katarakty a zavedení screeningu v České republice; *Čes. a slov. Oftal.*, No. 4, p. 258-261.

Fishman, G. A., Kumar, A., Joseph, M. E., Torok, N., & Anderson, R. J. (1983). Usher's syndrome. Ophthalmic and neuro-otologic findings suggesting genetic heterogeneity. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 101(9), 1367–1374.

Fiskerstrand, T., H'mida-Ben Brahim, D., Johansson, S., M'zahem, A., Haukanes, B. I., Drouot, N., Zimmermann, J., Cole, A. J., Vedeler, C., Bredrup, C., Assoum, M., Tazir, M., Klockgether, T., Hamri, A., Steen, V. M., Boman, H., Bindoff, L. A., Koenig, M., & Knappskog, P. M. (2010). Mutations in ABHD12 cause the neurodegenerative disease PHARC: An inborn error of endocannabinoid metabolism. *American journal of human genetics*, 87(3), 410–417.

Fokkema, I. F., den Dunnen, J. T., & Taschner, P. E. (2005). LOVD: easy creation of a locus-specific sequence variation database using an "LSDB-in-a-box" approach. *Human mutation*, 26(2), 63–68.

Forsius, H., Eriksson, A., Nuutila, A., Vainio-Mattila, B., & Krause, U. (1971). A genetic study of three rare retinal disorders: dystrophia retinae dysacusis syndrome, x-chromosomal retinoschisis and grouped pigments of the retina. *Birth defects original article series*, 7(3), 83–98.

Francomano, C. A., Liberfarb, R. M., Hirose, T., Maumenee, I. H., Streeten, E. A., Meyers, D. A., & Pyeritz, R. E. (1987). The Stickler syndrome: evidence for close linkage to the structural gene for type II collagen. *Genomics*, 1(4), 293–296.

Francomano, C.A. (2010). Stickler syndrome In Cassidy SB & Allanson JE (Eds.), *Management of Genetic Syndromes* (3rd ed.). 52, p.787.

Garcia-Garcia, G., Aparisi, M. J., Jaijo, T., Rodrigo, R., Leon, A. M., Avila-Fernandez, A., Blanco-Kelly, F., Bernal, S., Navarro, R., Diaz-Llopis, M., Baiget, M., Ayuso, C., Millan, J. M., & Aller, E. (2011). Mutational screening of the USH2A gene in Spanish USH patients reveals 23 novel pathogenic mutations. *Orphanet journal of rare diseases*, 6, 65.

Gelse, K., Pöschl, E., & Aigner, T. (2003). Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*, 55(12), 1531–1546.

Glöckle, N., Kohl, S., Mohr, J., Scheurenbrand, T., Sprecher, A., Weisschuh, N., Bernd, A., Rudolph, G., Schubach, M., Poloschek, C., Zrenner, E., Biskup, S., Berger, W., Wissinger, B., & Neidhardt, J. (2014). Panel-based next generation sequencing as a reliable and efficient technique to detect mutations in unselected patients with retinal dystrophies. *European journal of human genetics : EJHG*, 22(1), 99–104.

- Godfrey, M., & Hollister, D. W. (1988). Type II achondrogenesis-hypochondrogenesis: identification of abnormal type II collagen. *American journal of human genetics*, 43(6), 904–913.
- Gorlin, R.J., Toriello, H.V. & Cohen, M.M. Hereditary hearing loss and its syndromes. (Oxford University Press, Oxford, 1995).
- Gregory, K. E., Oxford, J. T., Chen, Y., Gambia, J. E., Gygi, S. P., Aebbersold, R., Neame, P. J., Mechling, D. E., Bächinger, H. P., & Morris, N. P. (2000). Structural organization of distinct domains within the non-collagenous N-terminal region of collagen type XI. *The Journal of biological chemistry*, 275(15), 11498–11506.
- Griffith, A. J., Gebarski, S. S., Shepard, N. T., & Kileny, P. R. (2000). Audiovestibular phenotype associated with a COL11A1 mutation in Marshall syndrome. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*, 126(7), 891–894.
- Griffith, A. J., Sprunger, L. K., Sirko-Osadsa, D. A., Tiller, G. E., Meisler, M. H., & Warman, M. L. (1998). Marshall syndrome associated with a splicing defect at the COL11A1 locus. *American journal of human genetics*, 62(4), 816–823.
- Guo, L., Elcioglu, N. H., Wang, Z., Demirkol, Y. K., Isguven, P., Matsumoto, N., Nishimura, G., Miyake, N., & Ikegawa, S. (2017). Novel and recurrent COL11A1 and COL2A1 mutations in the Marshall-Stickler syndrome spectrum. *Human genome variation*, 4, 17040.
- Hallgren, B. (1959). Retinitis pigmentosa combined with congenital deafness; with vestibulo-cerebellar ataxia and mental abnormality in a proportion of cases: A clinical and genetic-statistical study. *Acta psychiatrica Scandinavica. Supplementum*, 34(138), 1–101.
- Hanson-Kahn, A., Li, B., Cohn, D. H., Nickerson, D. A., Bamshad, M. J., University of Washington Center for Mendelian Genomics, & Hudgins, L. (2018). Autosomal recessive Stickler syndrome resulting from a COL9A3 mutation. *American journal of medical genetics. Part A*, 176(12), 2887–2891.
- Hartong, D. T., Berson, E. L., & Dryja, T. P. (2006). Retinitis pigmentosa. *Lancet (London, England)*, 368(9549), 1795–1809.
- Hashimoto, T., Gibbs, D., Lillo, C., Azarian, S. M., Legacki, E., Zhang, X. M., Yang, X. J., & Williams, D. S. (2007). Lentiviral gene replacement therapy of retinas in a mouse model for Usher syndrome type 1B. *Gene therapy*, 14(7), 584–594.
- Havlíková, E., Zeleník, K., Komínek, P. Stav screeningu sluchu novorozenců v ČR. *Otorinolaryng. a Foniatic. /Prague/*. 2015, 64(1), 13–16.
- Henry, I., Bernheim, A., Bernard, M., van der Rest, M., Kimura, T., Jeanpierre, C., Barichard, F., Berger, R., Olsen, B. R., & Ramirez, F. (1988). Mapping of a human fibrillar collagen gene, pro alpha 1 (XI) (COL11A1), to the p21 region of chromosome 1. *Genomics*, 3(1), 87–90.

- Herrmann, J., France, T.D., Spranger, J.W., Opitz, J.M., Wifler, C. (1975). The Stickler syndrome (hereditary arthroophthalmopathy). *Birth Defects*, 11:76–103.
- Hess-Röver, J., Crichton, J., Byrne, K., & Holland, A. J. (1999). Diagnosis and treatment of a severe psychotic illness in a man with dual severe sensory impairments caused by the presence of Usher syndrome. *Journal of intellectual disability research : JIDR*, 43 (Pt 5), 428–434.
- Higuchi, Y., Hasegawa, K., Yamashita, M., Tanaka, H., & Tsukahara, H. (2017). A novel mutation in the COL2A1 gene in a patient with Stickler syndrome type 1: a case report and review of the literature. *Journal of medical case reports*, 11(1), 237.
- Hillman, R. T., Green, R. E., & Brenner, S. E. (2004). An unappreciated role for RNA surveillance. *Genome biology*, 5(2), R8.
- Hlaváčová, J. *Hluchoslepí mezi námi*. 1. vydání. Praha: Občanské sdružení LORM - Společnost pro hluchoslepé, 2007, s.2.
- Hoornaert, K. P., Dewinter, C., Vereecke, I., Beemer, F. A., Courtens, W., Fryer, A., Fryssira, H., Lees, M., Müllner-Eidenböck, A., Rimoin, D. L., Siderius, L., Superti-Furga, A., Temple, K., Willems, P. J., Zankl, A., Zweier, C., De Paepe, A., Coucke, P., & Mortier, G. R. (2006). The phenotypic spectrum in patients with arginine to cysteine mutations in the COL2A1 gene. *Journal of medical genetics*, 43(5), 406–413.
- Hoornaert, K. P., Marik, I., Kozłowski, K., Cole, T., Le Merrer, M., Leroy, J. G., Coucke, P. J., Sillence, D., & Mortier, G. R. (2007). Czech dysplasia metatarsal type: another type II collagen disorder. *European journal of human genetics : EJHG*, 15(12), 1269–1275.
- Hoornaert, K. P., Vereecke, I., Dewinter, C., Rosenberg, T., Beemer, F. A., Leroy, J. G., Bendix, L., Björck, E., Bonduelle, M., Boute, O., Cormier-Daire, V., De Die-Smulders, C., Dieux-Coeslier, A., Dollfus, H., Elting, M., Green, A., Guerci, V. I., Hennekam, R. C., Hilhorts-Hofstee, Y., Holder, M., ... Mortier, G. R. (2010). Stickler syndrome caused by COL2A1 mutations: genotype-phenotype correlation in a series of 100 patients. *European journal of human genetics : EJHG*, 18(8), 872–880.
- Hoornaert, K.P. (2010). Study of the genetic heterogeneity and phenotypic variability in Stickler syndrome. Thesis. Ghent University, Belgium.
- Hope, C. I., Bunday, S., Proops, D., & Fielder, A. R. (1997). Usher syndrome in the city of Birmingham--prevalence and clinical classification. *The British journal of ophthalmology*, 81(1), 46–53.
- Hubert, T., Grimal, S., Carroll, P., & Fichard-Carroll, A. (2009). Collagens in the developing and diseased nervous system. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(7), 1223–1238.
- Hunter, D. G., Fishman, G. A., Mehta, R. S., & Kretzer, F. L. (1986). Abnormal sperm and photoreceptor axonemes in Usher's syndrome. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 104(3), 385–389.

Husar-Memmer, E., Ekici, A., Al Kaissi, A., Sticht, H., Manger, B., Schett, G., & Zwerina, J. (2013). Premature osteoarthritis as presenting sign of type II collagenopathy: a case report and literature review. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 42(4), 355–360.

Chaïb, H., Kaplan, J., Gerber, S., Vincent, C., Ayadi, H., Slim, R., Munnich, A., Weissenbach, J., & Petit, C. (1997). A newly identified locus for Usher syndrome type I, USH1E, maps to chromosome 21q21. *Human molecular genetics*, 6(1), 27–31.

Chan, T. K., Alkaabi, M. K., ElBarky, A. M., & El-Hattab, A. W. (2019). LOXL3 novel mutation causing a rare form of autosomal recessive Stickler syndrome. *Clinical genetics*, 95(2), 325–328.

Chapman, V., Valmana, A., & Lacey, J. H. (1998). A case report of Usher's syndrome and anorexia nervosa. *The International journal of eating disorders*, 23(2), 223–226.

Chaussonot, A., Bannwarth, S., Rouzier, C., Vialettes, B., Mkaïdem, S. A., Chabrol, B., Cano, A., Labauge, P., & Paquis-Flucklinger, V. (2011). Neurologic features and genotype-phenotype correlation in Wolfram syndrome. *Annals of neurology*, 69(3), 501–508.

Choi, Y., Sims, G. E., Murphy, S., Miller, J. R., & Chan, A. P. (2012). Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PloS one*, 7(10), e46688.

Iannaccone, A., Kritchevsky, S. B., Ciccarelli, M. L., Tedesco, S. A., Macaluso, C., Kimberling, W. J., & Somes, G. W. (2004). Kinetics of visual field loss in Usher syndrome Type II. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(3), 784–792.

Imamoglu, S., Kaya, V., Imamoglu, E. Y., & Gok, K. (2016). Congenital keratoglobus with blue sclera in two siblings with overlapping Marshall/Stickler phenotype. *Indian journal of ophthalmology*, 64(11), 856–859.

Ionita-Laza, I., McCallum, K., Xu, B., & Buxbaum, J. D. (2016). A spectral approach integrating functional genomic annotations for coding and noncoding variants. *Nature genetics*, 48(2), 214–220.

Izumi, K., Konczal, L. L., Mitchell, A. L., & Jones, M. C. (2012). Underlying genetic diagnosis of Pierre Robin sequence: retrospective chart review at two children's hospitals and a systematic literature review. *The Journal of pediatrics*, 160(4), 645–650.e2.

Jaijo, T., Aller, E., Oltra, S., Beneyto, M., Nájera, C., Ayuso, C., Baiget, M., Carballo, M., Antiñolo, G., Valverde, D., Moreno, F., Vilela, C., Perez-Garrigues, H., Navea, A., & Millán, J. M. (2006). Mutation profile of the MYO7A gene in Spanish patients with Usher syndrome type I. *Human mutation*, 27(3), 290–291.

Jakeš, J. HLUCHOSLEPOTA, OSOBNÍ ZKUŠENOST, POJMY A INFORMACE. Studijní materiál pro účastníky kurzu „Osvětový pracovník a konzultant pro zpřístupňování prostředí osobám se zrakovým postižením“ pořádaného o. s. Okamžik, modul Osvětová činnost. 2011

Jakubíková J, Závodná M. Early diagnosis of hearing loss in newborns and children. *International Congress Series*. Amsterdam: Elsevier Science; B. V., 2003: 1–3 s.

Janecke, A. R., Meins, M., Sadeghi, M., Grundmann, K., Apfelstedt-Sylla, E., Zrenner, E., Rosenberg, T., & Gal, A. (1999). Twelve novel myosin VIIA mutations in 34 patients with Usher syndrome type I: confirmation of genetic heterogeneity. *Human mutation*, 13(2), 133–140.

Jaworek, T. J., Bhatti, R., Latief, N., Khan, S. N., Riazuddin, S., & Ahmed, Z. M. (2012). USH1K, a novel locus for type I Usher syndrome, maps to chromosome 10p11.21-q21.1. *Journal of human genetics*, 57(10), 633–637.

Joensuu, T., Hämäläinen, R., Yuan, B., Johnson, C., Tegelberg, S., Gasparini, P., Zelante, L., Pirvola, U., Pakarinen, L., Lehesjoki, A. E., de la Chapelle, A., & Sankila, E. M. (2001). Mutations in a novel gene with transmembrane domains underlie Usher syndrome type 3. *American journal of human genetics*, 69(4), 673–684.

Jones, K.L., Marilyn Crandall Jones, Campo M del. Stickler syndrome. In: JonesKL, editor. *Smith's recognizable patterns of human malformation*. 7th ed. Philadelphia: Saunders; 2013. p. 378–81

Jouret, G., Poirsier, C., Spodenkiewicz, M., Jaquin, C., Gouy, E., Arndt, C., Labrousse, M., Gaillard, D., Doco-Fenzy, M., & Lebre, A. S. (2019). Genetics of Usher Syndrome: New Insights From a Meta-analysis. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*, 40(1), 121–129.

Jumaian, A., & Fergusson, K. (2003). Psychosis in a patient with Usher syndrome: a case report. *Eastern Mediterranean health journal = La revue de sante de la Mediterranee orientale = al-Majallah al-sihhiyah li-sharq al-mutawassit*, 9(1-2), 215–218.

Junquiera, L. Carlos, Carneiro, J., O Kelley, R. (1997). *Základy histologie*. 1. vydání. Jinočany: H & H 1997, 0000. 502 s. s. 198-200.

Kääriäinen, H., Barrow, M., & Hennekam, R. (1993). Bone dysplasia, midface hypoplasia, and deafness: three new patients and review of the literature. *American journal of medical genetics*, 46(2), 223–227.

Kaiserman, N., Obolensky, A., Banin, E., & Sharon, D. (2007). Novel USH2A mutations in Israeli patients with retinitis pigmentosa and Usher syndrome type 2. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 125(2), 219–224.

Källén, K., Robert, E., Mastroiacovo, P., Castilla, E. E., & Källén, B. (1999). CHARGE Association in newborns: a registry-based study. *Teratology*, 60(6), 334–343.

Kang, C., & Scott, L. J. (2020). Voretigene Neparvovec: A Review in RPE65 Mutation-Associated Inherited Retinal Dystrophy. *Molecular diagnosis & therapy*, 24(4), 487–495.

Kannu, P., Irving, M., Aftimos, S., & Savarirayan, R. (2011). Two novel COL2A1 mutations associated with a Legg-Calvé-Perthes disease-like presentation. *Clinical orthopaedics and related research*, 469(6), 1785–1790.

- Karempelis, P., Hagen, M., Morrell, N., & Roby, B. B. (2020). Associated syndromes in patients with Pierre Robin Sequence. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 131, 109842.
- Karlson, P., Gerok, W., Gross, W. (1987). *Pathobiochemie*. Academia, Praha, 480s
- Khalifa, O., Imtiaz, F., Ramzan, K., Allam, R., Hemidan, A. A., Faqeih, E., Abuharb, G., Balobaid, A., Sakati, N., & Owain, M. A. (2014). Marshall syndrome: further evidence of a distinct phenotypic entity and report of new findings. *American journal of medical genetics. Part A*, 164A(10), 2601–2606.
- Khan, M. I., Kersten, F. F., Azam, M., Collin, R. W., Hussain, A., Shah, S. T., Keunen, J. E., Kremer, H., Cremers, F. P., Qamar, R., & den Hollander, A. I. (2011). CLRN1 mutations cause nonsyndromic retinitis pigmentosa. *Ophthalmology*, 118(7), 1444–1448.
- Khateb, S., Zelinger, L., Ben-Yosef, T., Merin, S., Crystal-Shalit, O., Gross, M., Banin, E., & Sharon, D. (2012). Exome sequencing identifies a founder frameshift mutation in an alternative exon of USH1C as the cause of autosomal recessive retinitis pigmentosa with late-onset hearing loss. *PloS one*, 7(12), e51566.
- Kikkawa, Y., Mburu, P., Morse, S., Kominami, R., Townsend, S., & Brown, S. D. (2005). Mutant analysis reveals whirlin as a dynamic organizer in the growing hair cell stereocilium. *Human molecular genetics*, 14(3), 391–400.
- Kikkawa, Y., Shitara, H., Wakana, S., Kohara, Y., Takada, T., Okamoto, M., Taya, C., Kamiya, K., Yoshikawa, Y., Tokano, H., Kitamura, K., Shimizu, K., Wakabayashi, Y., Shiroishi, T., Kominami, R., & Yonekawa, H. (2003). Mutations in a new scaffold protein Sans cause deafness in Jackson shaker mice. *Human molecular genetics*, 12(5), 453–461.
- Kimberling, W. J., & Möller, C. (1995). Clinical and molecular genetics of Usher syndrome. *Journal of the American Academy of Audiology*, 6(1), 63–72.
- Kimura, T., Cheah, K. S., Chan, S. D., Lui, V. C., Mattei, M. G., van der Rest, M., Ono, K., Solomon, E., Ninomiya, Y., & Olsen, B. R. (1989). The human alpha 2(XI) collagen (COL11A2) chain. Molecular cloning of cDNA and genomic DNA reveals characteristics of a fibrillar collagen with differences in genomic organization. *The Journal of biological chemistry*, 264(23), 13910–13916.
- Kinsley, B. T., Swift, M., Dumont, R. H., & Swift, R. G. (1995). Morbidity and mortality in the Wolfram syndrome. *Diabetes care*, 18(12), 1566–1570.
- Kivirikko K. I. (1993). Collagens and their abnormalities in a wide spectrum of diseases. *Annals of medicine*, 25(2), 113–126.
- Kokavec R. Goldenhar syndrome with various clinical manifestations. *Cleft Palate Craniofac J*. 2006 Sep;43(5):628-34.
- Kowalik, S., Baňka A. *Perspektivy rehabilitace hluchoslepých*. 1. vydání. Praha: Wagner Press, 2000, s. 33-39.

Krawitz, P. M., Schiska, D., Krüger, U., Appelt, S., Heinrich, V., Parkhomchuk, D., Timmermann, B., Millan, J. M., Robinson, P. N., Mundlos, S., Hecht, J., & Gross, M. (2014). Screening for single nucleotide variants, small indels and exon deletions with a next-generation sequencing based gene panel approach for Usher syndrome. *Molecular genetics & genomic medicine*, 2(5), 393–401.

Kremlikova Pourova, R., Paderova, J., Copikova, J., Kousal, B., Dudakova, L., & Liskova, P. (2018). SD-OCT imaging as a valuable tool to support molecular genetic diagnostics of Usher syndrome type 1. *Journal of AAPOS : the official publication of the American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus*, 22(4), 312–314.e3.

Kuivaniemi, H., Tromp, G., & Prockop, D. J. (1997). Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III, and XI), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage, and blood vessels. *Human mutation*, 9(4), 300–315.

Lalani, S. R., Safiullah, A. M., Fernbach, S. D., Harutyunyan, K. G., Thaller, C., Peterson, L. E., McPherson, J. D., Gibbs, R. A., White, L. D., Hefner, M., Davenport, S. L., Graham, J. M., Bacino, C. A., Glass, N. L., Towbin, J. A., Craigen, W. J., Neish, S. R., Lin, A. E., & Belmont, J. W. (2006). Spectrum of CHD7 mutations in 110 individuals with CHARGE syndrome and genotype-phenotype correlation. *American journal of human genetics*, 78(2), 303–314.

Lalani, S. R., Safiullah, A. M., Molinari, L. M., Fernbach, S. D., Martin, D. M., & Belmont, J. W. (2004). SEMA3E mutation in a patient with CHARGE syndrome. *Journal of medical genetics*, 41(7), e94.

Le Guédard, S., Faugère, V., Malcolm, S., Claustres, M., & Roux, A. F. (2007). Large genomic rearrangements within the PCDH15 gene are a significant cause of USH1F syndrome. *Molecular vision*, 13, 102–107.

Le Quesne Stabej, P., Saihan, Z., Rangesh, N., Steele-Stallard, H. B., Ambrose, J., Coffey, A., Emmerson, J., Haralambous, E., Hughes, Y., Steel, K. P., Luxon, L. M., Webster, A. R., & Bitner-Glindzicz, M. (2012). Comprehensive sequence analysis of nine Usher syndrome genes in the UK National Collaborative Usher Study. *Journal of medical genetics*, 49(1), 27–36.

Lefèvre, G., Michel, V., Weil, D., Lepelletier, L., Bizard, E., Wolfrum, U., Hardelin, J. P., & Petit, C. (2008). A core cochlear phenotype in USH1 mouse mutants implicates fibrous links of the hair bundle in its cohesion, orientation and differential growth. *Development (Cambridge, England)*, 135(8), 1427–1437.

Leiba, H., Oliver, M., & Pollack, A. (1996). Prophylactic laser photocoagulation in Stickler syndrome. *Eye (London, England)*, 10 (Pt 6), 701–708.

Lenassi, E., Vincent, A., Li, Z., Saihan, Z., Coffey, A. J., Steele-Stallard, H. B., Moore, A. T., Steel, K. P., Luxon, L. M., Héon, E., Bitner-Glindzicz, M., & Webster, A. R. (2015). A detailed clinical and molecular survey of subjects with nonsyndromic USH2A retinopathy

reveals an allelic hierarchy of disease-causing variants. *European journal of human genetics : EJHG*, 23(10), 1318–1327.

Leroy, B. P., Aragon-Martin, J. A., Weston, M. D., Bessant, D. A., Willis, C., Webster, A. R., Bird, A. C., Kimberling, W. J., Payne, A. M., & Bhattacharya, S. S. (2001). Spectrum of mutations in USH2A in British patients with Usher syndrome type II. *Experimental eye research*, 72(5), 503–509.

Levine, R. A., Stathogiannis, E., Newell, J. B., Harrigan, P., & Weyman, A. E. (1988). Reconsideration of echocardiographic standards for mitral valve prolapse: lack of association between leaflet displacement isolated to the apical four chamber view and independent echocardiographic evidence of abnormality. *Journal of the American College of Cardiology*, 11(5), 1010–1019.

Lévy, G., Levi-Acobas, F., Blanchard, S., Gerber, S., Larget-Piet, D., Chenal, V., Liu, X. Z., Newton, V., Steel, K. P., Brown, S. D., Munnich, A., Kaplan, J., Petit, C., & Weil, D. (1997). Myosin VIIA gene: heterogeneity of the mutations responsible for Usher syndrome type IB. *Human molecular genetics*, 6(1), 111–116.

Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(14), 1754–1760.

Li, T., Feng, Y., Liu, Y., He, C., Liu, J., Chen, H., Deng, Y., Li, M., Li, W., Song, J., Niu, Z., Sang, S., Wen, J., Men, M., Chen, X., Li, J., Liu, X., & Ling, J. (2019). A novel ABHD12 nonsense variant in Usher syndrome type 3 family with genotype-phenotype spectrum review. *Gene*, 704, 113–120.

Liberfarb, R. M., & Goldblatt, A. (1986). Prevalence of mitral-valve prolapse in the Stickler syndrome. *American journal of medical genetics*, 24(3), 387–392.

Liberfarb, R. M., Levy, H. P., Rose, P. S., Wilkin, D. J., Davis, J., Balog, J. Z., Griffith, A. J., Szymko-Bennett, Y. M., Johnston, J. J., Francomano, C. A., Tsilou, E., & Rubin, B. I. (2003). The Stickler syndrome: genotype/phenotype correlation in 10 families with Stickler syndrome resulting from seven mutations in the type II collagen gene locus COL2A1. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 5(1), 21–27.

Licastro, D., Mutarelli, M., Peluso, I., Neveling, K., Wieskamp, N., Rispoli, R., Vozzi, D., Athanasakis, E., D'Eustacchio, A., Pizzo, M., D'Amico, F., Ziviello, C., Simonelli, F., Fabretto, A., Scheffer, H., Gasparini, P., Banfi, S., & Nigro, V. (2012). Molecular diagnosis of Usher syndrome: application of two different next generation sequencing-based procedures. *PloS one*, 7(8), e43799.

Lindsey, S., Brewer, C., Stakhovskaya, O., Kim, H. J., Zalewski, C., Bryant, J., King, K. A., Naggert, J. K., Gahl, W. A., Marshall, J. D., & Gunay-Aygun, M. (2017). Auditory and otologic profile of Alström syndrome: Comprehensive single center data on 38 patients. *American journal of medical genetics. Part A*, 173(8), 2210–2218.

Liu, X. Z., Hope, C., Liang, C. Y., Zou, J. M., Xu, L. R., Cole, T., Mueller, R. F., Bunday, S., Nance, W., Steel, K. P., & Brown, S. D. (1999). A mutation (2314delG) in the Usher

syndrome type IIA gene: high prevalence and phenotypic variation. *American journal of human genetics*, 64(4), 1221–1225.

Liu, X. Z., Hope, C., Walsh, J., Newton, V., Ke, X. M., Liang, C. Y., Xu, L. R., Zhou, J. M., Trump, D., Steel, K. P., Bunday, S., & Brown, S. D. (1998). Mutations in the myosin VIIA gene cause a wide phenotypic spectrum, including atypical Usher syndrome. *American journal of human genetics*, 63(3), 909–912.

Liu, X. Z., Newton, V. E., Steel, K. P., & Brown, S. D. (1997b). Identification of a new mutation of the myosin VII head region in Usher syndrome type 1. *Human mutation*, 10(2), 168–170.

Liu, X. Z., Walsh, J., Mburu, P., Kendrick-Jones, J., Cope, M. J., Steel, K. P., & Brown, S. D. (1997c). Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nature genetics*, 16(2), 188–190.

Liu, X. Z., Walsh, J., Tamagawa, Y., Kitamura, K., Nishizawa, M., Steel, K. P., & Brown, S. D. (1997a). Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene. *Nature genetics*, 17(3), 268–269.

Liu, X., Bulgakov, O. V., Darrow, K. N., Pawlyk, B., Adamian, M., Liberman, M. C., & Li, T. (2007). Usherin is required for maintenance of retinal photoreceptors and normal development of cochlear hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(11), 4413–4418.

Lomničáková, H., B. Raška. (1969). Norrieho choroba. *Československá oftalmologie*, roč. 25, č. 3.

Lopes, V. S., Gibbs, D., Libby, R. T., Aleman, T. S., Welch, D. L., Lillo, C., Jacobson, S. G., Radu, R. A., Steel, K. P., & Williams, D. S. (2011). The Usher 1B protein, MYO7A, is required for normal localization and function of the visual retinoid cycle enzyme, RPE65. *Human molecular genetics*, 20(13), 2560–2570.

Ludíková, L. *Kombinované vady*. 1. vydání. Olomouc: Univerzita Palackého, 2005, s. 118–133.

Ludíková L. *Vzdělávání hluchoslepých I*. 1. vyd. Praha: Scientia, 2000, s. 74.

Ludíková, L. *Vzdělávání hluchoslepých III*. 1. vydání. Praha: Scientia, 2001.

Lui, V. C., Ng, L. J., Nicholls, J., Tam, P. P., & Cheah, K. S. (1995). Tissue-specific and differential expression of alternatively spliced alpha 1(II) collagen mRNAs in early human embryos. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 203(2), 198–211.

Maerker, T., van Wijk, E., Overlack, N., Kersten, F. F., McGee, J., Goldmann, T., Sehn, E., Roepman, R., Walsh, E. J., Kremer, H., & Wolfrum, U. (2008). A novel Usher protein network at the periciliary reloading point between molecular transport machineries in vertebrate photoreceptor cells. *Human molecular genetics*, 17(1), 71–86.

Magliulo, G., Iannella, G., Gagliardi, S., Iozzo, N., Plateroti, R., Plateroti, P., Re, M., & Vingolo, E. M. (2015). Usher's Syndrome: Evaluation of the Vestibular System with Cervical and Ocular Vestibular Evoked Myogenic Potentials and the Video Head Impulse Test. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*, 36(8), 1421–1427.

Maria Oonk, A. M., van Huet, R. A., Leijendeckers, J. M., Oostrik, J., Venselaar, H., van Wijk, E., Beynon, A., Kunst, H. P., Hoyng, C. B., Kremer, H., Schradars, M., & Pennings, R. J. (2015). Nonsyndromic hearing loss caused by USH1G mutations: widening the USH1G disease spectrum. *Ear and hearing*, 36(2), 205–211.

Marshall, J. D., Bronson, R. T., Collin, G. B., Nordstrom, A. D., Maffei, P., Paisey, R. B., Carey, C., Macdermott, S., Russell-Eggitt, I., Shea, S. E., Davis, J., Beck, S., Shatirishvili, G., Mihai, C. M., Hoeltzenbein, M., Pozzan, G. B., Hopkinson, I., Siculo, N., Naggert, J. K., & Nishina, P. M. (2005). New Alström syndrome phenotypes based on the evaluation of 182 cases. *Archives of internal medicine*, 165(6), 675–683.

Marshall, J. D., Muller, J., Collin, G. B., Milan, G., Kingsmore, S. F., Dinwiddie, D., Farrow, E. G., Miller, N. A., Favaretto, F., Maffei, P., Dollfus, H., Vettor, R., & Naggert, J. K. (2015). Alström Syndrome: Mutation Spectrum of ALMS1. *Human mutation*, 36(7), 660–668.

Martelli, H., Jr, Miranda, R. T., Fernandes, C. M., Bonan, P. R., Paranaíba, L. M., Graner, E., & Coletta, R. D. (2010). Goldenhar syndrome: clinical features with orofacial emphasis. *Journal of applied oral science : revista FOB*, 18(6), 646–649.

Massof, R. W., & Finkelstein, D. (1993). Supplemental vitamin A retards loss of ERG amplitude in retinitis pigmentosa. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 111(6), 751–754.

Mathur, P., & Yang, J. (2015). Usher syndrome: Hearing loss, retinal degeneration and associated abnormalities. *Biochimica et biophysica acta*, 1852(3), 406–420.

Maumenee, I. H. (1979). Vitreoretinal degeneration as a sign of generalized connective tissue diseases. *American journal of ophthalmology*, 88(3 Pt 1), 432–449.

Mayne, R., Brewton, R. G., Mayne, P. M., & Baker, J. R. (1993). Isolation and characterization of the chains of type V/type XI collagen present in bovine vitreous. *The Journal of biological chemistry*, 268(13), 9381–9386.

McGee, T. L., Seyedahmadi, B. J., Sweeney, M. O., Dryja, T. P., & Berson, E. L. (2010). Novel mutations in the long isoform of the USH2A gene in patients with Usher syndrome type II or non-syndromic retinitis pigmentosa. *Journal of medical genetics*, 47(7), 499–506.

Mendler, M., Eich-Bender, S. G., Vaughan, L., Winterhalter, K. H., & Bruckner, P. (1989). Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. *The Journal of cell biology*, 108(1), 191–197.

- Millán, J. M., Aller, E., Jaijo, T., Blanco-Kelly, F., Gimenez-Pardo, A., & Ayuso, C. (2011). An update on the genetics of usher syndrome. *Journal of ophthalmology*, 2011, 417217.
- Miyamoto, Y., Nakashima, E., Hiraoka, H., Ohashi, H., & Ikegawa, S. (2005). A type II collagen mutation also results in oto-spondylo-megaepiphyseal dysplasia. *Human genetics*, 118(2), 175–178.
- Möller, C. G., Kimberling, W. J., Davenport, S. L., Priluck, I., White, V., Biscione-Halterman, K., Odkvist, L. M., Brookhouser, P. E., Lund, G., & Grissom, T. J. (1989). Usher syndrome: an otoneurologic study. *The Laryngoscope*, 99(1), 73–79.
- Montell C. (2000). A PDZ protein ushers in new links. *Nature genetics*, 26(1), 6–7.
- Morton, N.E. (1990). Genetic linkage and complex diseases: A comment. *Genet Epidemiol* 7:33–34.
- Musil, J., (1990). *Biochemie v obrazech a schématech*. Avicenum, Praha
- Myllyharju, J., & Kivirikko, K. I. (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends in genetics : TIG*, 20(1), 33–43.
- Nagendran, S., Richards, A. J., McNinch, A., Sandford, R. N., & Snead, M. P. (2012). Somatic mosaicism and the phenotypic expression of COL2A1 mutations. *American journal of medical genetics. Part A*, 158A(5), 1204–1207.
- Nah, H. D., Barembaum, M., & Upholt, W. B. (1992). The chicken alpha 1 (XI) collagen gene is widely expressed in embryonic tissues. *The Journal of biological chemistry*, 267(31), 22581–22586.
- Ness, S. L., Ben-Yosef, T., Bar-Lev, A., Madeo, A. C., Brewer, C. C., Avraham, K. B., Kornreich, R., Desnick, R. J., Willner, J. P., Friedman, T. B., & Griffith, A. J. (2003). Genetic homogeneity and phenotypic variability among Ashkenazi Jews with Usher syndrome type III. *Journal of medical genetics*, 40(10), 767–772.
- Neuhaus, C., Eisenberger, T., Decker, C., Nagl, S., Blank, C., Pfister, M., Kennerknecht, I., Müller-Hofstede, C., Charbel Issa, P., Heller, R., Beck, B., Rütger, K., Mitter, D., Rohrschneider, K., Steinhauer, U., Korbmacher, H. M., Huhle, D., Elsayed, S. M., Taha, H. M., Baig, S. M., ... Bolz, H. J. (2017). Next-generation sequencing reveals the mutational landscape of clinically diagnosed Usher syndrome: copy number variations, phenocopies, a predominant target for translational read-through, and PEX26 mutated in Heimler syndrome. *Molecular genetics & genomic medicine*, 5(5), 531–552.
- Nikopoulos, K., Schrauwen, I., Simon, M., Collin, R. W., Veckeneer, M., Keymolen, K., Van Camp, G., Cremers, F. P., & van den Born, L. I. (2011). Autosomal recessive Stickler syndrome in two families is caused by mutations in the COL9A1 gene. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(7), 4774–4779.
- Nishimura, D. Y., Baye, L. M., Perveen, R., Searby, C. C., Avila-Fernandez, A., Pereiro, I., Ayuso, C., Valverde, D., Bishop, P. N., Manson, F. D., Urquhart, J., Stone, E. M., Slusarski,

- D. C., Black, G. C., & Sheffield, V. C. (2010). Discovery and functional analysis of a retinitis pigmentosa gene, C2ORF71. *American journal of human genetics*, 86(5), 686–695.
- Nishimura, G., Haga, N., Kitoh, H., Tanaka, Y., Sonoda, T., Kitamura, M., Shirahama, S., Itoh, T., Nakashima, E., Ohashi, H., & Ikegawa, S. (2005). The phenotypic spectrum of COL2A1 mutations. *Human mutation*, 26(1), 36–43.
- Nolen, R. M., Hufnagel, R. B., Friedman, T. B., Turriff, A. E., Brewer, C. C., Zalewski, C. K., King, K. A., Wafa, T. T., Griffith, A. J., Brooks, B. P., & Zein, W. M. (2020). Atypical and ultra-rare Usher syndrome: a review. *Ophthalmic genetics*, 41(5), 401–412.
- Nowak C. B. (1998). Genetics and hearing loss: a review of Stickler syndrome. *Journal of communication disorders*, 31(5), 437–454.
- Nuutila, A. (1970). Dystrophia retinae pigmentosa--dysacusis syndrome (DRD): a study of the Usher- or Hallgren syndrome. *Journal de genetique humaine*, 18(1), 57–88.
- Oganesian, A., Zhu, Y., & Sandell, L. J. (1997). Type IIA procollagen amino propeptide is localized in human embryonic tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 45(11), 1469–1480.
- Opitz, J. M., France, T., Herrmann, J., & Spranger, J. W. (1972). The Stickler syndrome. *The New England journal of medicine*, 286(10), 546–547.
- Oshima, A., Jaijo, T., Aller, E., Millan, J. M., Carney, C., Usami, S., Moller, C., & Kimberling, W. J. (2008). Mutation profile of the CDH23 gene in 56 probands with Usher syndrome type I. *Human mutation*, 29(6), E37–E46.
- Otterstedde, C. R., Spandau, U., Blankenagel, A., Kimberling, W. J., & Reisser, C. (2001). A new clinical classification for Usher's syndrome based on a new subtype of Usher's syndrome type I. *The Laryngoscope*, 111(1), 84–86.
- Ouyang, X. M., Hejtmancik, J. F., Jacobson, S. G., Xia, X. J., Li, A., Du, L. L., Newton, V., Kaiser, M., Balkany, T., Nance, W. E., & Liu, X. Z. (2003). USH1C: a rare cause of USH1 in a non-Acadian population and a founder effect of the Acadian allele. *Clinical genetics*, 63(2), 150–153.
- Ouyang, X. M., Yan, D., Du, L. L., Hejtmancik, J. F., Jacobson, S. G., Nance, W. E., Li, A. R., Angeli, S., Kaiser, M., Newton, V., Brown, S. D., Balkany, T., & Liu, X. Z. (2005). Characterization of Usher syndrome type I gene mutations in an Usher syndrome patient population. *Human genetics*, 116(4), 292–299.
- Ozantürk, A., Marshall, J. D., Collin, G. B., Düzenli, S., Marshall, R. P., Candan, Ş., Tos, T., Esen, İ., Taşkesen, M., Çayır, A., Öztürk, Ş., Üstün, İ., Ataman, E., Karaca, E., Özdemir, T. R., Erol, İ., Eroğlu, F. K., Torun, D., Pariltay, E., Yılmaz-Güleç, E., ... Özgül, R. K. (2015). The phenotypic and molecular genetic spectrum of Alström syndrome in 44 Turkish kindreds and a literature review of Alström syndrome in Turkey. *Journal of human genetics*, 60(1), 1–9.

- Paisey, R. B., Steeds, R., Barrett, T., Williams, D., Geberhiwot, T., & Gunay-Aygun, M. (2003). Alström Syndrome. In M. P. Adam (Eds.) et. al., GeneReviews®. University of Washington, Seattle.
- Pakarinen, L., Karjalainen, S., Simola, K. O., Laippala, P., & Kaitalo, H. (1995). Usher's syndrome type 3 in Finland. *The Laryngoscope*, 105(6), 613–617.
- Pakarinen, L., Tuppurainen, K., Laippala, P., Mäntyjärvi, M., & Puhakka, H. (1995). The ophthalmological course of Usher syndrome type III. *International ophthalmology*, 19(5), 307–311.
- Parma, E. S., Körkkö, J., Hagler, W. S., & Ala-Kokko, L. (2002). Radial perivascular retinal degeneration: a key to the clinical diagnosis of an ocular variant of Stickler syndrome with minimal or no systemic manifestations. *American journal of ophthalmology*, 134(5), 728–734.
- Patel, D. E., Cumberland, P. M., Walters, B. C., Russell-Eggitt, I., Rahi, J. S., & OPTIC study group (2015). Study of Optimal Perimetric Testing in Children (OPTIC): Feasibility, Reliability and Repeatability of Perimetry in Children. *PloS one*, 10(6), e0130895.
- Pennings, R. 2004. Hereditary Deaf-Blindness. Clinical and genetic aspects. Thesis, University Nijmegen.
- Pennings, R. J., Te Brinke, H., Weston, M. D., Claassen, A., Orten, D. J., Weekamp, H., Van Aarem, A., Huygen, P. L., Deutman, A. F., Hoefsloot, L. H., Cremers, F. P., Cremers, C. W., Kimberling, W. J., & Kremer, H. (2004). USH2A mutation analysis in 70 Dutch families with Usher syndrome type II. *Human mutation*, 24(2), 185.
- Petit C. (2001). Usher syndrome: from genetics to pathogenesis. *Annual review of genomics and human genetics*, 2, 271–297.
- Pihlajamaa, T., Prockop, D. J., Faber, J., Winterpacht, A., Zabel, B., Giedion, A., Wiesbauer, P., Spranger, J., & Ala-Kokko, L. (1998). Heterozygous glycine substitution in the COL11A2 gene in the original patient with the Weissenbacher-Zweymüller syndrome demonstrates its identity with heterozygous OSMED (nonocular Stickler syndrome). *American journal of medical genetics*, 80(2), 115–120.
- Pingault, V., Ente, D., Dastot-Le Moal, F., Goossens, M., Marlin, S., & Bondurand, N. (2010). Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Human mutation*, 31(4), 391–406.
- Poulson, A. V., Hooymans, J. M., Richards, A. J., Bearcroft, P., Murthy, R., Baguley, D. M., Scott, J. D., & Snead, M. P. (2004). Clinical features of type 2 Stickler syndrome. *Journal of medical genetics*, 41(8), e107.
- Printzlau, A., & Andersen, M. (2004). Pierre Robin sequence in Denmark: a retrospective population-based epidemiological study. *The Cleft palate-craniofacial journal : official publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association*, 41(1), 47–52.

Prockop, D. J., Kivirikko, K. I., Tuderman, L., & Guzman, N. A. (1979). The biosynthesis of collagen and its disorders (second of two parts). *The New England journal of medicine*, 301(2), 77–85.

Puffenberger, E. G., Jinks, R. N., Sougnez, C., Cibulskis, K., Willert, R. A., Achilly, N. P., Cassidy, R. P., Fiorentini, C. J., Heiken, K. F., Lawrence, J. J., Mahoney, M. H., Miller, C. J., Nair, D. T., Politi, K. A., Worcester, K. N., Setton, R. A., Dipiazza, R., Sherman, E. A., Eastman, J. T., Francklyn, C., ... Strauss, K. A. (2012). Genetic mapping and exome sequencing identify variants associated with five novel diseases. *PloS one*, 7(1), e28936.

Rabbani, B., Mahdieh, N., Hosomichi, K., Nakaoka, H., & Inoue, I. (2012). Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. *Journal of human genetics*, 57(10), 621–632.

Rai, A., Wordsworth, P., Coppock, J. S., Zaphiropoulos, G. C., & Struthers, G. R. (1994). Hereditary arthro-ophthalmopathy (Stickler syndrome): a diagnosis to consider in familial premature osteoarthritis. *British journal of rheumatology*, 33(12), 1175–1180.

Read, A. P., & Newton, V. E. (1997). Waardenburg syndrome. *Journal of medical genetics*, 34(8), 656–665.

Reiners, J., Märker, T., Jürgens, K., Reidel, B., & Wolfrum, U. (2005). Photoreceptor expression of the Usher syndrome type 1 protein protocadherin 15 (USH1F) and its interaction with the scaffold protein harmonin (USH1C). *Molecular vision*, 11, 347–355.

Riazuddin, S., Belyantseva, I. A., Giese, A. P., Lee, K., Indzhukulian, A. A., Nandamuri, S. P., Yousaf, R., Sinha, G. P., Lee, S., Terrell, D., Hegde, R. S., Ali, R. A., Anwar, S., Andrade-Elizondo, P. B., Sirmaci, A., Parise, L. V., Basit, S., Wali, A., Ayub, M., Ansar, M., ... Ahmed, Z. M. (2012). Alterations of the CIB2 calcium- and integrin-binding protein cause Usher syndrome type 1J and nonsyndromic deafness DFNB48. *Nature genetics*, 44(11), 1265–1271.

Riazuddin, S., Nazli, S., Ahmed, Z. M., Yang, Y., Zulfiqar, F., Shaikh, R. S., Zafar, A. U., Khan, S. N., Sabar, F., Javid, F. T., Wilcox, E. R., Tsilou, E., Boger, E. T., Sellers, J. R., Belyantseva, I. A., Riazuddin, S., & Friedman, T. B. (2008). Mutation spectrum of MYO7A and evaluation of a novel nonsyndromic deafness DFNB2 allele with residual function. *Human mutation*, 29(4), 502–511.

Ricard-Blum S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(1), a004978.

Richards, A. J., Laidlaw, M., Meredith, S. P., Shankar, P., Poulson, A. V., Scott, J. D., & Snead, M. P. (2007). Missense and silent mutations in COL2A1 result in Stickler syndrome but via different molecular mechanisms. *Human mutation*, 28(6), 639.

Richards, A. J., Martin, S., Yates, J. R., Scott, J. D., Baguley, D. M., Pope, F. M., & Snead, M. P. (2000). COL2A1 exon 2 mutations: relevance to the Stickler and Wagner syndromes. *The British journal of ophthalmology*, 84(4), 364–371.

- Richards, A. J., McNinch, A., Martin, H., Oakhill, K., Rai, H., Waller, S., Treacy, B., Whittaker, J., Meredith, S., Poulson, A., & Snead, M. P. (2010). Stickler syndrome and the vitreous phenotype: mutations in COL2A1 and COL11A1. *Human mutation*, 31(6), E1461–E1471.
- Richards, A. J., Morgan, J., Bearcroft, P. W., Pickering, E., Owen, M. J., Holmans, P., Williams, N., Tysoe, C., Pope, F. M., Snead, M. P., & Hughes, H. (2002). Vitreoretinopathy with phalangeal epiphyseal dysplasia, a type II collagenopathy resulting from a novel mutation in the C-propeptide region of the molecule. *Journal of medical genetics*, 39(9), 661–665.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H. L., & ACMG Laboratory Quality Assurance Committee (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 17(5), 405–424.
- Richardson, G. P., de Monvel, J. B., & Petit, C. (2011). How the genetics of deafness illuminates auditory physiology. *Annual review of physiology*, 73, 311–334.
- Rijavec, N., & Grubic, V. N. (2009). Usher syndrome and psychiatric symptoms: a challenge in psychiatric management. *Psychiatria Danubina*, 21(1), 68–71.
- Rivolta, C., Sweklo, E. A., Berson, E. L., & Dryja, T. P. (2000). Missense mutation in the USH2A gene: association with recessive retinitis pigmentosa without hearing loss. *American journal of human genetics*, 66(6), 1975–1978.
- Rizel, L., Safieh, C., Shalev, S. A., Mezer, E., Jabaly-Habib, H., Ben-Neriah, Z., Chervinsky, E., Briscoe, D., & Ben-Yosef, T. (2011). Novel mutations of MYO7A and USH1G in Israeli Arab families with Usher syndrome type 1. *Molecular vision*, 17, 3548–3555.
- Robin, N. H., Moran, R. T., & Ala-Kokko, L. (2000). Stickler Syndrome. In M. P. Adam (Eds.) et. al., *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle.
- Rose, P. S., Ahn, N. U., Levy, H. P., Ahn, U. M., Davis, J., Liberfarb, R. M., Nallamshetty, L., Sponseller, P. D., & Francomano, C. A. (2001). Thoracolumbar spinal abnormalities in Stickler syndrome. *Spine*, 26(4), 403–409.
- Rose, P. S., Levy, H. P., Liberfarb, R. M., Davis, J., Szymko-Bennett, Y., Rubin, B. I., Tsilou, E., Griffith, A. J., & Francomano, C. A. (2005). Stickler syndrome: clinical characteristics and diagnostic criteria. *American journal of medical genetics. Part A*, 138A(3), 199–207.
- Rosenberg, T., Haim, M., Hauch, A. M., & Parving, A. (1997). The prevalence of Usher syndrome and other retinal dystrophy-hearing impairment associations. *Clinical genetics*, 51(5), 314–321.
- Roux, A. F., Faugère, V., Le Guédard, S., Pallares-Ruiz, N., Vielle, A., Chambert, S., Marlin, S., Hamel, C., Gilbert, B., Malcolm, S., Claustres, M., & French Usher Syndrome

Collaboration (2006). Survey of the frequency of USH1 gene mutations in a cohort of Usher patients shows the importance of cadherin 23 and protocadherin 15 genes and establishes a detection rate of above 90%. *Journal of medical genetics*, 43(9), 763–768.

Rouzier, C., Moore, D., Delorme, C., Lacas-Gervais, S., Ait-El-Mkadem, S., Fragaki, K., Burté, F., Serre, V., Bannwarth, S., Chaussenot, A., Catala, M., Yu-Wai-Man, P., & Paquis-Flucklinger, V. (2017). A novel CISD2 mutation associated with a classical Wolfram syndrome phenotype alters Ca²⁺ homeostasis and ER-mitochondria interactions. *Human molecular genetics*, 26(9), 1599–1611.

Russell, S., Bennett, J., Wellman, J. A., Chung, D. C., Yu, Z. F., Tillman, A., Wittes, J., Pappas, J., Elci, O., McCague, S., Cross, D., Marshall, K. A., Walshire, J., Kehoe, T. L., Reichert, H., Davis, M., Raffini, L., George, L. A., Hudson, F. P., Dingfield, L., ... Maguire, A. M. (2017). Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, 390(10097), 849–860.

Ryan, M. C., & Sandell, L. J. (1990). Differential expression of a cysteine-rich domain in the amino-terminal propeptide of type II (cartilage) procollagen by alternative splicing of mRNA. *The Journal of biological chemistry*, 265(18), 10334–10339.

Sadeghi, A. M., Eriksson, K., Kimberling, W. J., Sjöström, A., & Möller, C. (2006). Longterm visual prognosis in Usher syndrome types 1 and 2. *Acta ophthalmologica Scandinavica*, 84(4), 537–544.

Sakaguchi, H., Tokita, J., Müller, U., & Kachar, B. (2009). Tip links in hair cells: molecular composition and role in hearing loss. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, 17(5), 388–393.

Sandell, L. J., Morris, N., Robbins, J. R., & Goldring, M. B. (1991). Alternatively spliced type II procollagen mRNAs define distinct populations of cells during vertebral development: differential expression of the amino-propeptide. *The Journal of cell biology*, 114(6), 1307–1319.

Santana, E. E., Fuster-García, C., Aller, E., Jaijo, T., García-Bohórquez, B., García-García, G., Millán, J. M., & Lantigua, A. (2019). Genetic Screening of the Usher Syndrome in Cuba. *Frontiers in genetics*, 10, 501.

Savasta, S., Salpietro, V., Spartà, M. V., Foadelli, T., Laino, D., Lobefalo, L., Marseglia, G. L., & Verrotti, A. (2015). Stickler syndrome associated with epilepsy: report of three cases. *European journal of pediatrics*, 174(5), 697–701.

Seco, C. Z., Giese, A. P., Shafique, S., Schraders, M., Oonk, A. M., Grossheim, M., Oostrik, J., Strom, T., Hegde, R., van Wijk, E., Frolenkov, G. I., Azam, M., Yntema, H. G., Free, R. H., Riazuddin, S., Verheij, J. B., Admiraal, R. J., Qamar, R., Ahmed, Z. M., & Kremer, H. (2016). Novel and recurrent CIB2 variants, associated with nonsyndromic deafness, do not affect calcium buffering and localization in hair cells. *European journal of human genetics : EJHG*, 24(4), 542–549.

Seeliger, M., Pfister, M., Gendo, K., Paasch, S., Apfelstedt-Sylla, E., Plinkert, P., Zenner, H. P., & Zrenner, E. (1999). Comparative study of visual, auditory, and olfactory function in Usher syndrome. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 237(4), 301–307.

Seery, C. M., Pruett, R. C., Liberfarb, R. M., & Cohen, B. Z. (1990). Distinctive cataract in the Stickler syndrome. *American journal of ophthalmology*, 110(2), 143–148.

Senften, M., Schwander, M., Kazmierczak, P., Lillo, C., Shin, J. B., Hasson, T., Géléoc, G. S., Gillespie, P. G., Williams, D., Holt, J. R., & Müller, U. (2006). Physical and functional interaction between protocadherin 15 and myosin VIIa in mechanosensory hair cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(7), 2060–2071.

Seppänen, A., Suuronen, T., Hofmann, S. C., Majamaa, K., & Alafuzoff, I. (2007). Distribution of collagen XVII in the human brain. *Brain research*, 1158, 50–56.

Seyedahmadi, B. J., Rivolta, C., Keene, J. A., Berson, E. L., & Dryja, T. P. (2004). Comprehensive screening of the USH2A gene in Usher syndrome type II and non-syndromic recessive retinitis pigmentosa. *Experimental eye research*, 79(2), 167–173.

Sharp, C. W., Muir, W. J., Blackwood, D. H., Walker, M., Gosden, C., & St Clair, D. M. (1994). Schizophrenia and mental retardation associated in a pedigree with retinitis pigmentosa and sensorineural deafness. *American journal of medical genetics*, 54(4), 354–360.

Sherry, S. T., Ward, M., & Sirotkin, K. (1999). dbSNP-database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation. *Genome research*, 9(8), 677–679.

Shihab, H. A., Gough, J., Cooper, D. N., Stenson, P. D., Barker, G. L., Edwards, K. J., Day, I. N., & Gaunt, T. R. (2013). Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models. *Human mutation*, 34(1), 57–65.

Schrauwen, I., Chakchouk, I., Acharya, A., Liaqat, K., Irfanullah, University of Washington Center for Mendelian Genomics, Nickerson, D. A., Bamshad, M. J., Shah, K., Ahmad, W., & Leal, S. M. (2018). Novel digenic inheritance of PCDH15 and USH1G underlies profound non-syndromic hearing impairment. *BMC medical genetics*, 19(1), 122.

Schreiner, R. L., McAlister, W. H., Marshall, R. E., & Shearer, W. T. (1973). Stickler syndrome in a pedigree of Pierre Robin syndrome. *American journal of diseases of children* (1960), 126(1), 86–90.

Schrijver, I. (2004). Hereditary non-syndromic sensorineural hearing loss: transforming silence to sound. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 6(4), 275–284.

Schultz, J. M., Yang, Y., Caride, A. J., Filoteo, A. G., Penheiter, A. R., Lagziel, A., Morell, R. J., Mohiddin, S. A., Fananapazir, L., Madeo, A. C., Penniston, J. T., & Griffith, A. J. (2005). Modification of human hearing loss by plasma-membrane calcium pump PMCA2. *The New England journal of medicine*, 352(15), 1557–1564.

- Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M., & Seelow, D. (2014). MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature methods*, 11(4), 361–362.
- Sibulesky, L., Hayes, K. C., Pronczuk, A., Weigel-DiFranco, C., Rosner, B., & Berson, E. L. (1999). Safety of <7500 RE (<25000 IU) vitamin A daily in adults with retinitis pigmentosa. *The American journal of clinical nutrition*, 69(4), 656–663.
- Siemens, J., Kazmierczak, P., Reynolds, A., Sticker, M., Littlewood-Evans, A., & Müller, U. (2002). The Usher syndrome proteins cadherin 23 and harmonin form a complex by means of PDZ-domain interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(23), 14946–14951.
- Sloan-Heggen, C. M., Bierer, A. O., Shearer, A. E., Kolbe, D. L., Nishimura, C. J., Frees, K. L., Ephraim, S. S., Shibata, S. B., Booth, K. T., Campbell, C. A., Ranum, P. T., Weaver, A. E., Black-Ziegelbein, E. A., Wang, D., Azaiez, H., & Smith, R. (2016). Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with hearing loss. *Human genetics*, 135(4), 441–450.
- Smith, R. J., Berlin, C. I., Hejtmancik, J. F., Keats, B. J., Kimberling, W. J., Lewis, R. A., Möller, C. G., Pelias, M. Z., & Tranebjaerg, L. (1994). Clinical diagnosis of the Usher syndromes. Usher Syndrome Consortium. *American journal of medical genetics*, 50(1), 32–38.
- Snead, M. P., & Yates, J. R. (1999). Clinical and Molecular genetics of Stickler syndrome. *Journal of medical genetics*, 36(5), 353–359.
- Snead, M. P., McNinch, A. M., Poulson, A. V., Bearcroft, P., Silverman, B., Gomersall, P., Perfect, V., & Richards, A. J. (2011). Stickler syndrome, ocular-only variants and a key diagnostic role for the ophthalmologist. *Eye (London, England)*, 25(11), 1389–1400.
- Spandau, U. H., & Rohrschneider, K. (2002). Prevalence and geographical distribution of Usher syndrome in Germany. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 240(6), 495–498.
- Spranger J. (1998). The type XI collagenopathies. *Pediatric radiology*, 28(10), 745–750.
- Spranger, J., Winterpacht, A., & Zabel, B. (1994). The type II collagenopathies: a spectrum of chondrodysplasias. *European journal of pediatrics*, 153(2), 56–65.
- Steele-Stallard, H. B., Le Quesne Stabej, P., Lenassi, E., Luxon, L. M., Claustres, M., Roux, A. F., Webster, A. R., & Bitner-Glindzicz, M. (2013). Screening for duplications, deletions and a common intronic mutation detects 35% of second mutations in patients with USH2A monoallelic mutations on Sanger sequencing. *Orphanet journal of rare diseases*, 8, 122.
- Stenson, P. D., Mort, M., Ball, E. V., Evans, K., Hayden, M., Heywood, S., Hussain, M., Phillips, A. D., & Cooper, D. N. (2017). The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Human genetics*, 136(6), 665–677.

Stickler, G. B., Belau, P. G., Farrell, F. J., Jones, J. D., Pugh, D. G., Steinberg, A. G., & Ward, L. E. (1965). HEREDITARY PROGRESSIVE ARTHRO-OPHTHALMOPATHY. *Mayo Clinic proceedings*, 40, 433–455.

Stickler, G. B., Hughes, W., & Houchin, P. (2001). Clinical features of hereditary progressive arthro-ophthalmopathy (Stickler syndrome): a survey. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 3(3), 192–196.

Stickler, G.B., Pugh, D.G. (1967). Hereditary progressive arthro-ophthalmopathy. II. Additional observations on vertebral abnormalities, a hearing defect, and a report of a similar case. *Mayo Clin Proc*;42:495–500.

Sumaroka, A., Matsui, R., Cideciyan, A. V., McGuigan, D. B., 3rd, Sheplock, R., Schwartz, S. B., & Jacobson, S. G. (2016). Outer Retinal Changes Including the Ellipsoid Zone Band in Usher Syndrome 1B due to MYO7A Mutations. *Investigative ophthalmology & visual science*, 57(9), OCT253–OCT261.

Sun, T., Xu, K., Ren, Y., Xie, Y., Zhang, X., Tian, L., & Li, Y. (2018). Comprehensive Molecular Screening in Chinese Usher Syndrome Patients. *Investigative ophthalmology & visual science*, 59(3), 1229–1237.

Swift, R. G., Sadler, D. B., & Swift, M. (1990). Psychiatric findings in Wolfram syndrome homozygotes. *Lancet (London, England)*, 336(8716), 667–669.

Szymko-Bennett, Y. M., Mastroianni, M. A., Shotland, L. I., Davis, J., Ondrey, F. G., Balog, J. Z., Rudy, S. F., McCullagh, L., Levy, H. P., Liberfarb, R. M., Francomano, C. A., & Griffith, A. J. (2001). Auditory dysfunction in Stickler syndrome. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*, 127(9), 1061–1068.

Školoudík, L., Chrobok, V., Janouch, M., Vodička, J., Černý, M., Mejzlík, J. Screening sluchu pětiletých dětí – Prospektivní studie. *Otorinolaryng. a Foniatic. /Prague/*, 67, 2018, No. 1, pp. 3-6.

Tamagawa, Y., Ishikawa, K., Ishikawa, K., Ishida, T., Kitamura, K., Makino, S., Tsuru, T., & Ichimura, K. (2002). Phenotype of DFNA11: a nonsyndromic hearing loss caused by a myosin VIIA mutation. *The Laryngoscope*, 112(2), 292–297.

Tamayo, M. L., Gelvez, N., Rodriguez, M., Florez, S., Varon, C., Medina, D., & Bernal, J. E. (2008). Screening program for Waardenburg syndrome in Colombia: clinical definition and phenotypic variability. *American journal of medical genetics. Part A*, 146A(8), 1026–1031.

Temple I. K. (1989). Stickler's syndrome. *Journal of medical genetics*, 26(2), 119–126.

Terhal, P. A., van Dommelen, P., Le Merrer, M., Zankl, A., Simon, M. E., Smithson, S. F., Marcelis, C., Kerr, B., Kinning, E., Mansour, S., Hennekam, R. C., van der Hout, A. H., Cormier-Daire, V., Lund, A. M., Goodwin, L., Mégarbané, A., Lees, M., Betz, R. C., Tobias, E. S., Coucke, P., ... Mortier, G. R. (2012). Mutation-based growth charts for SEDC and other COL2A1 related dysplasias. *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics*, 160C(3), 205–216.

- Thalmann, I. (1993). Collagen of accessory structures of organ of Corti. *Connective tissue research*, 29(3), 191–201.
- Thomas, P. D., Campbell, M. J., Kejariwal, A., Mi, H., Karlak, B., Daverman, R., Diemer, K., Muruganujan, A., & Narechania, A. (2003). PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome research*, 13(9), 2129–2141.
- Tilney, L. G., Connelly, P. S., Vranich, K. A., Shaw, M. K., & Guild, G. M. (1998). Why are two different cross-linkers necessary for actin bundle formation in vivo and what does each cross-link contribute?. *The Journal of cell biology*, 143(1), 121–133.
- Tlili, A., Charfedine, I., Lahmar, I., Benzina, Z., Mohamed, B. A., Weil, D., Idriss, N., Drira, M., Masmoudi, S., & Ayadi, H. (2005). Identification of a novel frameshift mutation in the DFNB31/WHRN gene in a Tunisian consanguineous family with hereditary non-syndromic recessive hearing loss. *Human mutation*, 25(5), 503.
- Tompson, S. W., Bacino, C. A., Safina, N. P., Bober, M. B., Proud, V. K., Funari, T., Wangler, M. F., Nevarez, L., Ala-Kokko, L., Wilcox, W. R., Eyre, D. R., Krakow, D., & Cohn, D. H. (2010). Fibrochondrogenesis results from mutations in the COL11A1 type XI collagen gene. *American journal of human genetics*, 87(5), 708–712.
- Tranebjærg, L., Barrett, T., & Rendtorff, N. D. (2009). WFS1 Wolfram Syndrome Spectrum Disorder. In M. P. Adam (Eds.) et. al., *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle.
- Tsilou, E. T., Rubin, B. I., Caruso, R. C., Reed, G. F., Pikus, A., Hejtmancik, J. F., Iwata, F., Redman, J. B., & Kaiser-Kupfer, M. I. (2002). Usher syndrome clinical types I and II: could ocular symptoms and signs differentiate between the two types?. *Acta ophthalmologica Scandinavica*, 80(2), 196–201.
- Vaché, C., Besnard, T., Blanchet, C., Baux, D., Larrieu, L., Faugère, V., Mondain, M., Hamel, C., Malcolm, S., Claustres, M., & Roux, A. F. (2010). Nasal epithelial cells are a reliable source to study splicing variants in Usher syndrome. *Human mutation*, 31(6), 734–741.
- Vaché, C., Besnard, T., le Berre, P., García-García, G., Baux, D., Larrieu, L., Abadie, C., Blanchet, C., Bolz, H. J., Millan, J., Hamel, C., Malcolm, S., Claustres, M., & Roux, A. F. (2012). Usher syndrome type 2 caused by activation of an USH2A pseudoexon: implications for diagnosis and therapy. *Human mutation*, 33(1), 104–108.
- Valentine C. R. (1998). The association of nonsense codons with exon skipping. *Mutation research*, 411(2), 87–117.
- Van Camp, G., Snoeckx, R. L., Hilgert, N., van den Ende, J., Fukuoka, H., Wagatsuma, M., Suzuki, H., Smets, R. M., Vanhoenacker, F., Declau, F., Van de Heyning, P., & Usami, S. (2006). A new autosomal recessive form of Stickler syndrome is caused by a mutation in the COL9A1 gene. *American journal of human genetics*, 79(3), 449–457.
- Van Der Hout, A. H., Verlind, E., Beemer, F. A., Buys, C. H., Hofstra, R. M., & Scheffer, H. (2002). Occurrence of deletion of a COL2A1 allele as the mutation in Stickler syndrome

shows that a collagen type II dosage effect underlies this syndrome. *Human mutation*, 20(3), 236.

Van Eyken, E., Van Camp, G., & Van Laer, L. (2007). The complexity of age-related hearing impairment: contributing environmental and genetic factors. *Audiology & neuro-otology*, 12(6), 345–358.

van Steensel, M. A., Buma, P., de Waal Malefijt, M. C., van den Hoogen, F. H., & Brunner, H. G. (1997). Oto- spondylo-megaepiphyseal dysplasia (OSMED): clinical description of three patients homozygous for a missense mutation in the COL11A2 gene. *American journal of medical genetics*, 70(3), 315–323.

van Wijk, E., Pennings, R. J., te Brinke, H., Claassen, A., Yntema, H. G., Hoefsloot, L. H., Cremers, F. P., Cremers, C. W., & Kremer, H. (2004). Identification of 51 novel exons of the Usher syndrome type 2A (USH2A) gene that encode multiple conserved functional domains and that are mutated in patients with Usher syndrome type II. *American journal of human genetics*, 74(4), 738–744.

van Wijk, E., van der Zwaag, B., Peters, T., Zimmermann, U., Te Brinke, H., Kersten, F. F., Märker, T., Aller, E., Hoefsloot, L. H., Cremers, C. W., Cremers, F. P., Wolfrum, U., Knipper, M., Roepman, R., & Kremer, H. (2006). The DFNB31 gene product whirlin connects to the Usher protein network in the cochlea and retina by direct association with USH2A and VLRG1. *Human molecular genetics*, 15(5), 751–765.

Vaser, R., Adusumalli, S., Leng, S. N., Sikic, M., & Ng, P. C. (2016). SIFT missense predictions for genomes. *Nature protocols*, 11(1), 1–9.

Västinsalo, H., Jalkanen, R., Bergmann, C., Neuhaus, C., Kleemola, L., Jauhola, L., Bolz, H. J., & Sankila, E. M. (2013). Extended mutation spectrum of Usher syndrome in Finland. *Acta ophthalmologica*, 91(4), 325–334.

Vernon, M. (1969). Usher's syndrome--deafness and progressive blindness. Clinical cases, prevention, theory and literature survey. *Journal of chronic diseases*, 22(3), 133–151.

Verpy, E., Leibovici, M., Zwaenepoel, I., Liu, X. Z., Gal, A., Salem, N., Mansour, A., Blanchard, S., Kobayashi, I., Keats, B. J., Slim, R., & Petit, C. (2000). A defect in harmonin, a PDZ domain-containing protein expressed in the inner ear sensory hair cells, underlies Usher syndrome type 1C. *Nature genetics*, 26(1), 51–55.

Vikkula, M., Mariman, E. C., Lui, V. C., Zhidkova, N. I., Tiller, G. E., Goldring, M. B., van Beersum, S. E., de Waal Malefijt, M. C., van den Hoogen, F. H., & Ropers, H. H. (1995). Autosomal dominant and recessive osteochondrodysplasias associated with the COL11A2 locus. *Cell*, 80(3), 431–437.

Vikkula, M., Metsäranta, M., Syvänen, A. C., Ala-Kokko, L., Vuorio, E., & Peltonen, L. (1992). Structural analysis of the regulatory elements of the type-II procollagen gene. Conservation of promoter and first intron sequences between human and mouse. *The Biochemical journal*, 285 (Pt 1)(Pt 1), 287–294.

Vissers, L. E., van Ravenswaaij, C. M., Admiraal, R., Hurst, J. A., de Vries, B. B., Janssen, I. M., van der Vliet, W. A., Huys, E. H., de Jong, P. J., Hamel, B. C., Schoenmakers, E. F., Brunner, H. G., Veltman, J. A., & van Kessel, A. G. (2004). Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nature genetics*, 36(9), 955–957.

Voelkerding, K. V., Dames, S. A., & Durtschi, J. D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical chemistry*, 55(4), 641–658.

Vozzi, D., Aaspõllu, A., Athanasakis, E., Berto, A., Fabretto, A., Licastro, D., Külm, M., Testa, F., Trevisi, P., Vahter, M., Ziviello, C., Martini, A., Simonelli, F., Banfi, S., & Gasparini, P. (2011). Molecular epidemiology of Usher syndrome in Italy. *Molecular vision*, 17, 1662–1668.

Vuristo, M. M., Pihlajamaa, T., Vandenberg, P., Prockop, D. J., & Ala-Kokko, L. (1995). The human COL11A2 gene structure indicates that the gene has not evolved with the genes for the major fibrillar collagens. *The Journal of biological chemistry*, 270(39), 22873–22881.

Wafa, T. T., Faridi, R., King, K. A., Zalewski, C., Yousaf, R., Schultz, J. M., Morell, R. J., Muskett, J., Turriff, A., Tsilou, E., Griffith, A. J., Friedman, T. B., Zein, W. M., & Brewer, C. C. (2020). Vestibular phenotype-genotype correlation in a cohort of 90 patients with Usher syndrome. *Clinical genetics*, 10.1111/cge.13868.

Wagenaar M. (2000). The Usher syndrome, a clinical and genetical correlation. PhD thesis. Univ. Nijmegen, Netherlands.

Wagenaar, M., Draaijer, P., Meek, H., ten Donkelaar, H. J., Wesseling, P., Kimberling, W., & Cremers, C. (1999). The cochlear nuclei in two patients with Usher syndrome type I. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 50(3), 185–195.

Weil, D., Blanchard, S., Kaplan, J., Guilford, P., Gibson, F., Walsh, J., Mburu, P., Varela, A., Levilliers, J., & Weston, M. D. (1995). Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature*, 374(6517), 60–61.

Weil, D., El-Amraoui, A., Masmoudi, S., Mustapha, M., Kikkawa, Y., Lainé, S., Delmaghani, S., Adato, A., Nadifi, S., Zina, Z. B., Hamel, C., Gal, A., Ayadi, H., Yonekawa, H., & Petit, C. (2003). Usher syndrome type I G (USH1G) is caused by mutations in the gene encoding SANS, a protein that associates with the USH1C protein, harmonin. *Human molecular genetics*, 12(5), 463–471.

Weil, D., Küssel, P., Blanchard, S., Lévy, G., Levi-Acobas, F., Drira, M., Ayadi, H., & Petit, C. (1997). The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nature genetics*, 16(2), 191–193.

Weiss, M.M. et al. Best Practice Guidelines for the Use of Next-Generation Sequencing Applications in Genome Diagnostics: A National Collaborative Study of Dutch Genome Diagnostic Laboratories. *Human Mutation*. 2013, vol. 34, issue 10, s. 1313-1321.

Weston, M. D., Eudy, J. D., Fujita, S., Yao, S., Usami, S., Cremers, C., Greenberg, J., Ramesar, R., Martini, A., Moller, C., Smith, R. J., Sumegi, J., & Kimberling, W. J. (2000).

- Genomic structure and identification of novel mutations in usherin, the gene responsible for Usher syndrome type IIa. *American journal of human genetics*, 66(4), 1199–1210.
- Weston, M. D., Kelley, P. M., Overbeck, L. D., Wagenaar, M., Orten, D. J., Hasson, T., Chen, Z. Y., Corey, D., Mooseker, M., Sumegi, J., Cremers, C., Moller, C., Jacobson, S. G., Gorin, M. B., & Kimberling, W. J. (1996). Myosin VIIA mutation screening in 189 Usher syndrome type 1 patients. *American journal of human genetics*, 59(5), 1074–1083.
- Weston, M. D., Lujendijk, M. W., Humphrey, K. D., Möller, C., & Kimberling, W. J. (2004). Mutations in the VLGR1 gene implicate G-protein signaling in the pathogenesis of Usher syndrome type II. *American journal of human genetics*, 74(2), 357–366.
- Yagi, H., Takamura, Y., Yoneda, T., Konno, D., Akagi, Y., Yoshida, K., & Sato, M. (2005). *Vlgr1* knockout mice show audiogenic seizure susceptibility. *Journal of neurochemistry*, 92(1), 191–202.
- Yaguchi, H., Ikeda, T., Osada, H., Yoshitake, Y., Sasaki, H., & Yonekura, H. (2011). Identification of the COL2A1 mutation in patients with type I Stickler syndrome using RNA from freshly isolated peripheral white blood cells. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 15(4), 231–237.
- Yan, J., Pan, L., Chen, X., Wu, L., & Zhang, M. (2010). The structure of the harmonin/sans complex reveals an unexpected interaction mode of the two Usher syndrome proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9), 4040–4045.
- Yoshimura, H., Hashimoto, T., Murata, T., Fukushima, K., Sugaya, A., Nishio, S. Y., & Usami, S. (2015). Novel ABHD12 mutations in PHARC patients: the differential diagnosis of deaf-blindness. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 124 Suppl 1, 77S–83S.
- Yoshimura, H., Iwasaki, S., Nishio, S. Y., Kumakawa, K., Tono, T., Kobayashi, Y., Sato, H., Nagai, K., Ishikawa, K., Ikezono, T., Naito, Y., Fukushima, K., Oshikawa, C., Kimitsuki, T., Nakanishi, H., & Usami, S. (2014). Massively parallel DNA sequencing facilitates diagnosis of patients with Usher syndrome type 1. *PloS one*, 9(3), e90688.
- Zankl, A., Zabel, B., Hilbert, K., Wildhardt, G., Cuenot, S., Xavier, B., Ha-Vinh, R., Bonafé, L., Spranger, J., & Superti-Furga, A. (2004). Spondyloperipheral dysplasia is caused by truncating mutations in the C-propeptide of COL2A1. *American journal of medical genetics. Part A*, 129A(2), 144–148.
- Zechi-Ceide, R. M., Jesus Oliveira, N. A., Guion-Almeida, M. L., Antunes, L. F., Richieri-Costa, A., & Passos-Bueno, M. R. (2008). Clinical evaluation and COL2A1 gene analysis in 21 Brazilian families with Stickler syndrome: identification of novel mutations, further genotype/phenotype correlation, and its implications for the diagnosis. *European journal of medical genetics*, 51(3), 183–196.
- Zhang, B., Zhang, Y., Wu, N., Li, J., Liu, H., & Wang, J. (2020). Integrated analysis of COL2A1 variant data and classification of type II collagenopathies. *Clinical genetics*, 97(3), 383–395.

Zhao, Y., Feng, K., Liu, R., Pan, J., Zhang, L., & Lu, X. (2019). Vitamins and Mineral Supplements for Retinitis Pigmentosa. *Journal of ophthalmology*, 2019, 8524607.

Zheng, Q. Y., Yan, D., Ouyang, X. M., Du, L. L., Yu, H., Chang, B., Johnson, K. R., & Liu, X. Z. (2005). Digenic inheritance of deafness caused by mutations in genes encoding cadherin 23 and protocadherin 15 in mice and humans. *Human molecular genetics*, 14(1), 103–111.

Zina, Z. B., Masmoudi, S., Ayadi, H., Chaker, F., Ghorbel, A. M., Drira, M., & Petit, C. (2001). From DFNB2 to Usher syndrome: variable expressivity of the same disease. *American journal of medical genetics*, 101(2), 181–183.

Zlotogora, J., Sagi, M., Schuper, A., Leiba, H., & Merin, S. (1992). Variability of Stickler syndrome. *American journal of medical genetics*, 42(3), 337–339.

Zupan, A., Fakin, A., Battelino, S., Jarc-Vidmar, M., Hawlina, M., Bonnet, C., Petit, C., & Glavač, D. (2019). Clinical and Haplotypic Variability of Slovenian USH2A Patients Homozygous for the c. 11864G>A Nonsense Mutation. *Genes*, 10(12), 1015.

Zwaenepoel, I., Verpy, E., Blanchard, S., Meins, M., Apfelstedt-Sylla, E., Gal, A., & Petit, C. (2001). Identification of three novel mutations in the USH1C gene and detection of thirty-one polymorphisms used for haplotype analysis. *Human mutation*, 17(1), 34–41.