

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

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



MUDr. Michael Svatoň

Patogenetické mechanismy imunitní dysregulace a hematopoetických onemocnění

Pathogenetic mechanisms of immune dysregulation and hematopoietic disorders

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Eva Froňková, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval 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, 21. 6. 2022

Michael Svatoň

.....

Podpis autora

Poděkování

Děkuji především svým rodičům, JUDr. Janě Svatoňové a prom. hist. Jaroslavu Svatoňovi a celé své rodině.

Tato práce je výsledkem vynikající spolupráce s mnoha kolegyněmi a kolegy nejen v laboratořích molekulární genetiky a cytometrie CLIP Kliniky dětské hematologie a onkologie 2.LF UK a FN Motol, ale řady dalších laboratorních i klinických pracovišť na mnoha českých i zahraničních institucích. Bez těchto skvělých spolupracovníků by tato práce nemohla vzniknout a velmi si vážím jejich pomoci.

Děkuji své školitelce doc. MUDr. Evě Froňkové, Ph.D. za veškerou její ochotu, pomoc a vedení od začátku mé vědecké práce. Dále bych rád poděkoval prof. MUDr. Janu Trkovi, Ph.D., prof. MUDr. Janu Starému, DrSc., prof. MUDr. Tomášovi Kalinovi, Ph.D., prof. MUDr. Anně Šedivé, DrSc., prof. MUDr. Viktoru Kožichovi, CSc, RNDr. Veronice Kanderové, Ph.D., Mgr. Karolině Škvárové Kramarzové, Ph.D., Mgr. Janu Stuchlému, Ph.D., MUDr. Markétě Bloomfield, MUDr. Martině Sukové, MUDr. Petru Smíškovi, RNDr. Zuzaně Paračkové, Ph.D., Mgr. Martině Zwyrtkové, Ing. Lucii Winkowské a všem dalším kolegyním a kolegům za cennou spolupráci.

Děkuji všem pacientkám a pacientům a jejich rodinám za jejich důvěru a spolupráci, bez které by nebyl náš výzkum možný.

Patogenetické mechanismy imunitní dysregulace a hematopoetických onemocnění

Abstrakt

Cílem mé práce bylo zavedení vyšetření pomocí celoexomového sekvenování (WES) a rutinního algoritmu analýzy získaných dat u dětských pacientů s podezřením na vrozenou poruchu imunity (IEI) nebo selhání kostní dřeně. Kromě jasné molekulární diagnózy na základě genetického vyšetření, které bylo dosaženo u 25 % pacientů, tvoří část výsledků (9 %) také pacienti, u nichž toto vyšetření odhalilo nové mutace, které nebyly dosud popsány v patogenezi IEI nebo selhání krvevotvorby. U těchto pacientů byly na základě literárních rešerší a známých mechanismů vývoje a regulace imunitního systému navrženy validační experimenty, za účelem potvrzení kauzality identifikovaných mutací v patogenezi onemocnění. Díky WES se podařilo objasnit příčinu dvou nových vrozených onemocnění – megaloblastické anémie na podkladě homozygotní mutace genu *SLC19A1* a syndromu imunitní dysregulace s autoimunitními a autoinflamatorními projevy na podkladě X-vázané mutace genu *TLR8* u monozygotických dvojčat s chronickou autoimunitní hemolytickou anémií (AIHA). U pěti dalších pacientů se podařilo identifikovat nové mutace v genech *STAT3*, *SPTA1*, *SAMD9* a *XIAP* a prokázat jejich kauzalitu v patogenezi selhání krvevotvorby nebo IEI. U jedné pacientky s netypickým fenotypem pomohlo vyšetření WES odhalit kombinaci mutací v genech *NOD2* a *IFNGR1*. Tato práce ilustruje význam WES v diagnostice pacientů s poruchou imunity a krvevotvorby, jejich cílené léčbě a identifikaci nových klinických jednotek.

Klíčová slova

Sekvenování nové generace, celoexomové sekvenování, vrozené poruchy imunity, imunitní cytopenie, anémie

Pathogenetic mechanisms of immune dysregulation and hematopoietic disorders

Abstract

The aim of my work was to introduce whole exome sequencing (WES) and a routine algorithm for data analysis in pediatric patients with suspected inborn error of immunity (IEI) or hematopoiesis. A clear molecular diagnosis based on genetic testing was achieved in 25% of patients. Additionally, novel mutations not previously described in the pathogenesis of IEI or hematopoietic failure were revealed in 9% of the patients. Validation experiments were designed to confirm the causality of the identified mutations in the pathogenesis of the disease, based on literature review and known mechanisms of immune system development and regulation in these patients. Thanks to WES, we were able to elucidate the cause of two new congenital diseases – megaloblastic anemia due to a homozygous mutation of the *SLC19A1* gene and immune dysregulation syndrome with autoimmune and autoinflammatory manifestations due to an X-linked mutation of the *TLR8* gene in monozygotic twins with chronic autoimmune hemolytic anemia (AIHA). In five additional patients, novel mutations in the *STAT3*, *SPTA1*, *SAMD9* and *XIAP* genes were identified and their causality in the pathogenesis of hematopoietic failure or IEI was demonstrated. In one patient with an atypical phenotype, WES helped to identify a combination of mutations in the *NOD2* and *IFNGR1* genes. This work demonstrates the importance of WES in the diagnosis of patients with immune and hematopoietic disorders, their targeted treatment and the identification of new clinical entities.

Keywords

Next generation sequencing, whole exome sequencing, inborn errors of immunity, immune cytopenias, anemia

Seznam použitých zkratek

AD	autosomálně dominantní	autosomal dominant
AIHA	autoimunitní hemolytická anémie	autoimmune hemolytic anemia
AIN	autoimunitní neutropenie	autoimmune neutropenia
AR	autosomálně recesivní	autosomal recessive
BCG	bacillus Calmette-Guérin	bacillus Calmette-Guérin
CADD	kombinovaná deplece závislá na anotaci	combined annotation dependent depletion
CDA	kongenitální dyserythropoetická anémie	congenital dyserythropoietic anemia
CTLA-4	cytotoxický T lymfocytární antigen 4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
FR	folátový receptor	folate receptor
HLH	hematofagocytující lymfohistiocytóza	hemophagocytic lymphohistiocytosis
HS	hereditární sferocytóza	hereditary spherocytosis
HSCT	transplantace krvetvorných kmenových buněk	hematopoietic stem cell transplantation
IBD	nespecifický střevní zánět	inflammatory bowel disease
IEI	vrozené poruchy imunity	inborn errors of immunity
ITP	imunitní trombocytopenie	immune thrombocytopenia
KO	knock-out	knock-out
MTX	metotrexát	methotrexate
NGS	sekvenování nové generace	next generation sequencing
NSAID	nesteroidní antiflogistika	non-steroidal anti-inflammatory drugs
PCFT	protonově vázaný folátový transportér	protein-coupled folate transporter
PRRs	receptory pro alarminy	pattern recognition receptors
RFC	transportér redukováného folátu	reduced folate carrier
SCID	těžký kombinovaný imunodeficit	severe combined immunodeficiency
ssRNA	jednovláknová RNA	single-stranded RNA
WES	celoexomové sekvenování	whole exome sequencing
XLP2	X-vázaný lymfoproliferativní syndrom-2	X-linked lymphoproliferative syndrome 2

Obsah

1. Úvod	8
1.1. Vrozené poruchy imunity	8
1.2. Sekvenování nové generace.....	10
1.3. Imunitní cytopenie a další autoimunitní projevy.....	10
2. Cíle práce.....	12
3. Metodika.....	13
3.1. Vyšetření WES	13
4. Výsledky.....	15
4.1. Výsledky vyšetření WES u pacientů s poruchou imunity a krvetvorby.....	16
4.2. Nově identifikované mutace a projevy onemocnění	17
4.2.1. Imunitní cytopenie na podkladě mutace genu <i>STAT3</i>	17
4.2.2. Vrozená megaloblastická anémie v důsledku poruchy transportu folátu.....	19
4.2.3. Hydrops fetalis a těžká hereditární sferocytóza.....	21
4.2.4. Chronická autoimunitní hemolytická anémie na podkladě imunitní dysregulace.....	23
4.2.5. Imunodeficience na podkladě nové mutace <i>SAMD9</i>	24
4.2.6. Imunitní dysregulace v důsledku narušené signalizace NOD2	25
5. Diskuse	27
6. Závěr.....	32
7. Souhrn.....	33
8. Summary.....	34
9. Použitá literatura.....	35
10. Přílohy	47
11. Další publikace autora	50

1. Úvod

Předkládané výsledky této disertační práce tvoří publikace, které vznikly na základě identifikace patogenních variant u pacientů vyšetřovaných pro podezření na vrozenou poruchu imunitního systému nebo selhání kostní dřeně v laboratořích CLIP. Mým hlavním podílem na této práci bylo vyhodnocení primárních sekvenčních dat, interpretace výsledků dalších molekulárně-genetických vyšetření, identifikace nových potenciálně patogenních genetických variant a navržení patogenetických mechanismů a validačních experimentů, na nichž jsem se v uvedených případech přímo podílel.

1.1. Vrozené poruchy imunity

Vrozené poruchy imunity (*inborn errors of immunity*; IEI) zahrnují přes 400 jednotek geneticky podmíněných defektů vývoje nebo funkce imunitního systému u člověka (Notarangelo et al. 2020). Klasifikace IEI na základě fenotypu jednotlivých onemocnění a jejich genetických příčin je prováděna Komisí pro IEI (*IEI Committee*) Mezinárodní unie imunologických společností (*International Union of Immunological Societies*; IUIS) a je aktualizována a vydávána každé 2 roky. Dle poslední publikované klasifikace, aktualizované k roku 2019 je možné rozdělit tato onemocnění do 10 skupin a oproti předchozí verzi z roku 2017 zahrnuje 64 nově popsaných genetických defektů (Tangye et al. 2020). Spolu s touto klasifikací je publikován také podrobný fenotypický přehled jednotlivých onemocnění (Bousfiha et al. 2020). Exponenciální nárůst nově popsaných IEI v posledních letech vedl k publikaci předběžného doplnění této klasifikace dalšími 26 novými geneticky podmíněnými poruchami (Tangye et al. 2021) popsanými za pouhých 12 měsíců.

Velmi rychlý rozvoj poznání v oblasti imunitního systému nepochybně souvisí se stále rostoucí dostupností nových metod sekvenování lidského genomu a možností studia lidského imunitního systému na buněčných modelech. Ačkoliv se jedná o vzácná onemocnění, ukazují důležitý význam popisů jednotlivých kasuistik pacientů s genetickou mutací, neboť díky takto nově popsaným a podrobně funkčně charakterizovaným genům je možné poznat a podrobně studovat mechanismy a procesy důležité pro správný vývoj a funkci imunitního systému. Podstatná část známých IEI byla nejdříve popsána na případech jednotlivých pacientů. Dle přehledového článku Casanovy et al., se jednalo o 49 z 232 monogenně podmíněných IEI známých v roce

2014 (21 %). Až na základě znalosti patogenetického mechanismu a klinických projevů onemocnění je možné správně identifikovat a diagnostikovat další pacienty. Identifikace nových genů, jejichž mutace vedou k poruchám imunitní odpovědi je klíčová pro pochopení fyziologických a patofyziologických procesů a tím ke správné volbě adekvátní terapie (Casanova et al. 2014).

Mezi typické příklady takového onemocnění patří například X-vázaná agamaglobulinémie (XLA; OMIM #300755), také označována jako Brutonova agamaglobulinémie, jež byla popsána jako první případ vrozené poruchy vývoje B-lymfocytů (Bruton 1952) nebo těžký kombinovaný imunodeficit (*severe combined immunodeficiency*; SCID), který tvoří heterogenní skupinu onemocnění s různým stupněm postižení vývoje T-lymfocytů, B-lymfocytů a NK buněk v závislosti na konkrétním genetickém defektu. Prvním genem, jehož mutace byly identifikovány jako kauzální pro SCID byl gen *ADA*, kódující adenosin deaminasu. U pacientů s mutací v tomto genu dochází k poruše vývoje B i T lymfocytů a NK buněk a jedná se o autosomálně recesivní (AR) formu onemocnění. Identifikace genetické příčiny a molekulárního patogenetického mechanismu onemocnění umožnila veliký posun v terapii těchto onemocnění. Kromě transplantace hematopoetických kmenových buněk (*hematopoietic stem cell transplantation*; HSCT) vedla také k zavedení cílené farmakologické terapie (Notarangelo et al. 2020). V případě ADA deficiencie šlo o nahrazení chybějícího enzymu jeho uměle připravenou dlouho cirkulující formou (Hershfield et al. 1987), první takovou formu terapie schválenou *The United States Food and Drug Administration*. Stejně tak byla léčba tohoto onemocnění cílem genové terapie a v roce 2016 byla terapie pomocí *ex vivo* geneticky modifikovaných hematopoetických buněk schválena jako první komerčně dostupný produkt svého typu (Aiuti et al. 2017).

Spolu s nově popsányými syndromy imunitní dysregulace se v poslední dekádě rozšířily i možnosti cílené terapie u těch onemocnění, u kterých jsou dostupné přípravky ovlivňující patogenetickou příčinu onemocnění. Dobrým ilustrativním příkladem je autosomálně dominantní (AD) syndrom zahrnující deficit imunitního systému se zvýšenou náchylností k infekcím, ale zároveň také s autoimunitními projevy a lymfoproliferací v důsledku aktivace T-lymfocytů na podkladě mutace genu *CTLA4*. Protein kódovaný tímto genem CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) je klíčový pro regulaci T-lymfocytů po jejich aktivaci a pro funkci regulačních T-lymfocytů (Schubert et al. 2014). Vedle HSCT, která je

kurativní u většiny pacientů, a imunosupresivní léčby kortikosteroidy či mTOR (*mammalian target of rapamycin*) inhibítorem sirolimem (rapamycinem), je u pacientů možné nasadit v terapii také abatacept – fúzní protein Fc fragmentu imunoglobulinu a extracelulární domény CTLA-4 (Egg et al. 2022). Dobrá klinická odpověď na tuto léčbu byla popsána také u pacientů s deficitem LRBA (*lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein*), jelikož je tento protein klíčový pro recyklaci CTLA-4 a patogenetický mechanismus obou onemocnění spolu velmi úzce souvisí (Lo et al. 2015). Na těchto syndromech je patrná důležitost syntézy poznatků o patogenetických mechanismech již pospaných IEI a vzájemných interakcí jednotlivých molekul či signálních drah pro identifikaci nových kauzálních genů a jejich potenciální léčby.

1.2. Sekvenování nové generace

Sekvenování nové generace (*next generation sequencing*; NGS), někdy též označované jako masivně paralelní sekvenování (*massive parallel sequencing*) je souhrnné označení pro několik sekvenačních metod, které využívají odlišné způsoby samotné sekvenace DNA molekul, ale spojuje je princip paralelního čtení mnoha milionů sekvencí. Díky tomu se dramaticky snížila cena a především čas, který je nutný pro genetickou analýzu pacientů (Goodwin et al. 2016). Rostoucí dostupnost této technologie a jejích aplikací, především celoexomového sekvenování (*whole exome sequencing*; WES) a jeho postupné zavedení do diagnostických postupů u pacientů s podezřením na IEI umožnila obrovský nárůst nově popsaných onemocnění a v konečném důsledku také jejich rychlejší a spolehlivější diagnostiku (Meyts et al. 2016). Kromě WES má NGS řadu dalších aplikací. Patří mezi ně např. panelové sekvenování vybraných genů souvisejících s určitým onemocněním, amplikonové sekvenování zaměřené např. na detekci somatických mutací anebo přestaveb genů pro imunoglobuliny či T-buněčné receptory v analýze imunitního repertoáru nebo minimální residuální nemoci (Brüggemann et al. 2019), ale i celotranskriptomové sekvenování a další modifikace zaměřené na analýzu epigenetické regulace. V této disertační práci se budu soustředit především na WES a analýzu dat a hodnocení genetických variant identifikovaných pomocí této metody.

1.3. Imunitní cytopenie a další autoimunitní projevy

IEI jsou vedle zvýšené náchylnosti k infekcím a neefektivní imunitní odpovědi proti patogenům také velmi často spojeny s dysregulací imunitního systému, která může vést k závažnému

autoimunitnímu onemocnění nebo lymfoproliferativním onemocněním a zvýšenému riziku malignity. Velmi častým projevem IEI jsou imunitní cytopenie, popisovány u 31 % pacientů. Nejčastějším typem u těchto pacientů je autoimunitní hemolytická anémie (AIHA), jejíž relativní riziko vzniku ve spojení s IEI je dle studie francouzského referenčního centra pro vrozené poruchy imunity (*CEREDIH-Centre de référence des déficits immunitaires héréditaires*) 830x vyšší v porovnání s běžnou populací. Kombinované relativní riziko jakékoliv cytopenie je potom 120x vyšší. Dalším velmi častým projevem u těchto pacientů je postižení gastrointestinálního traktu u 24 % pacientů, s relativním rizikem rozvoje nespecifického střevního zánětu (inflammatory bowel disease; IBD) v dětském věku 80x vyšším oproti běžné populaci. (Fischer et al. 2017)

Zvláštní pozornost v tomto kontextu zasluhuje Evansův syndrom u dětských pacientů, tedy kombinace AIHA a imunitní trombocytopenie (ITP). V některých případech je definován také jako kombinace alespoň dvou imunitně podmíněných cytopenií, tedy včetně autoimunitní neutropenie (AIN). Několik studií publikovaných v posledních letech se zaměřilo právě na genetické vyšetření dětských pacientů s Evansovým syndromem. Jejich cílem bylo odhalit možnou genetickou příčinu IEI, s ohledem na rozvoj těžkých imunitních cytopenií v nízkém věku. Jasně patogenní mutace, vysvětlující patogenezi onemocnění v genech, které byly popsány jako kauzální u IEI, byla identifikována u 40 % z 80 pacientů, kteří podstoupili genetické testování ve studii francouzského referenčního centra pro dětské imunitní cytopenie (*CEREVANCE – Centre de référence des cytopénies auto-immunes de l'enfant*). U dalších 25 % pacientů byly identifikovány mutace v genech souvisejících s imunitním systémem, které byly klasifikovány jako pravděpodobně patogenní. Funkční dopad těchto mutací však nebyl experimentálně prokázán a výsledky funkční validace nebyly ve studii prezentovány (Hadjadj et al. 2019). Podobná studie byla publikována v letošním roce také italskou skupinou s výsledky genetické analýzy cílenou NGS analýzou 315 vybraných genů popsanych v souvislosti s IEI u 40 dětských pacientů s pozitivním nálezem patogenní varianty nebo potenciálně patogenní varianty u 45 % pacientů (Miano et al. 2022). Podtrhuje tak význam genetického vyšetření u pacientů s imunitní cytopenií, obzvláště v případě cytopenie ve více liniích či v kombinaci s dalšími autoimunitními projevy s nástupem ve velmi časném věku, jejichž nemoc je často refrakterní ke standardní léčbě.

2. Cíle práce

Hlavním cílem této práce bylo odhalit genetickou příčinu a patogenetický mechanismus onemocnění u pacientů se závažnou poruchou imunitního systému nebo poruchou krvevorbny, a tím zlepšit diagnostiku těchto pacientů. Práci je možné rozdělit na 3 základní části a úkoly:

1. Zavést vyšetření pomocí WES u dětských pacientů s podezřením na IEI nebo selhání kostní dřene a nastavit jasný postup hodnocení NGS dat a identifikovaných genetických variant u těchto pacientů.
2. Identifikovat potenciálně patogenní varianty, které nebyly dříve popsány jako příčina IEI nebo selhání krvevorbny. Navrhnout a provést validační experimenty, které jasně prokážou kauzalitu identifikovaných variant v patogenezi onemocnění u konkrétních pacientů.
3. Na základě identifikovaných genetických variant, které byly již dříve popsány jako jasně patogenní anebo byly na základě provedených experimentů validovány jako kauzální v patogenezi pacientova onemocnění, navrhnout léčbu těchto pacientů a sledovat klinickou a laboratorní odpověď v souvislosti s patogenetickými mechanismy onemocnění.

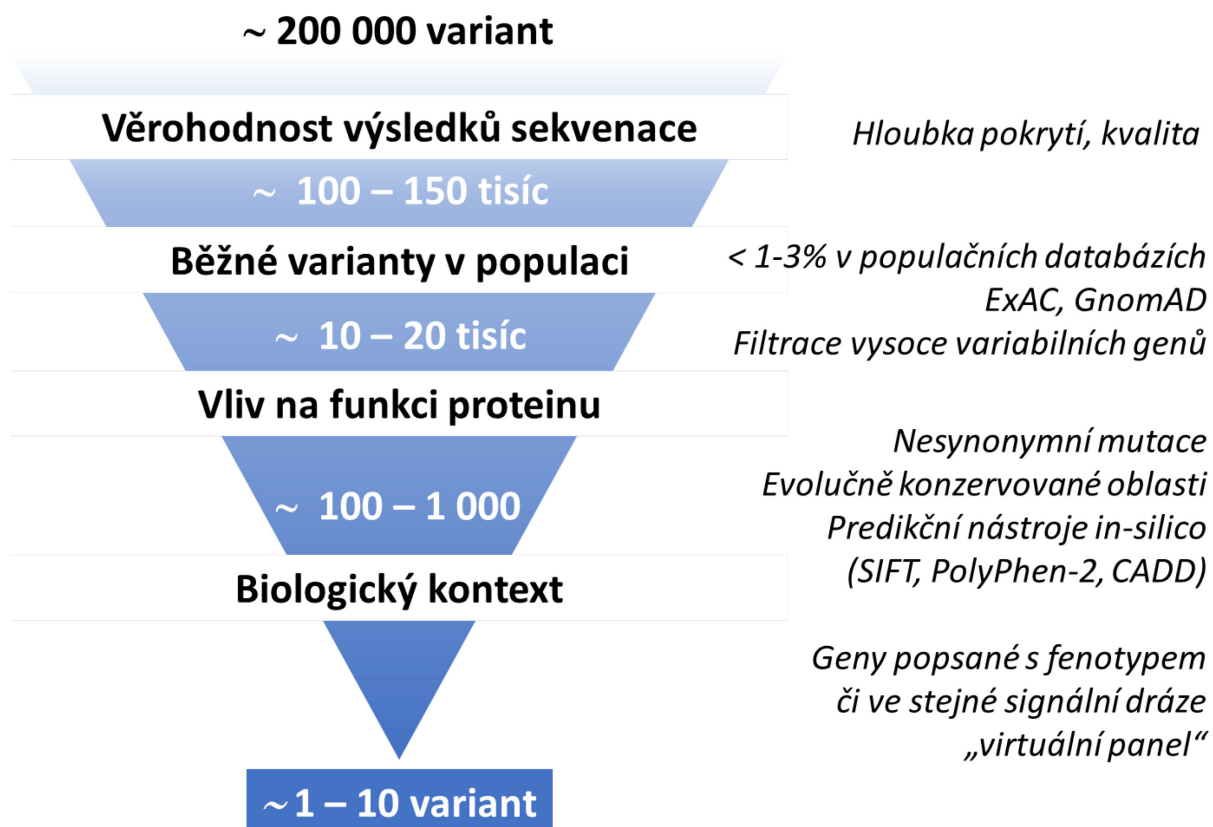
3. Metodika

Podrobný popis metod vyšetření a experimentů, které byly zaměřené na odhalení funkčního dopadu identifikovaných mutací u jednotlivých pacientů, je přiložen v rámci publikací, které tvoří hlavní obsah této práce. Stručnou metodiku vyšetření WES a základní analýzy primárních dat, postup hodnocení a identifikace pravděpodobně kauzálních variant uvádím níže.

3.1. Vyšetření WES

Základem prezentovaných výsledků bylo vyšetření WES, provedené u pacientů léčených na Klinice dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol nebo referovaných ke genetickému vyšetření do laboratoře molekulární genetiky CLIP. Sekvence byla provedena v této laboratoři na přístroji NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA, USA) s využitím kitů na přípravu sekvenačních knihoven SureSelect XT Human All Exon V5+UTRs a V6+UTRs (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) z DNA izolované z mononukleárních buněk periferní krve nebo kostní dřeně. Analýza sekvenačních dat byla provedena na serveru laboratoře CLIP pomocí vlastního bioinformatického postupu. Ve zkratce byly výsledné FASTQ soubory namapovány k lidskému referenčnímu genomu hg19 pomocí Burrows-Wheeler Aligner (Li a Durbin 2009) a varianty identifikovány s pomocí samtools (Li et al. 2009) a VarScan 2 (Koboldt et al. 2012). K anotaci a filtrování výsledných variant byl využíván nástroj Ingenuity Variant Analysis (QIAGEN, Hilden, Německo) a k jejich hodnocení používána individuální kritéria hloubky pokrytí, kvality a alelické frekvence, frekvence variant v populaci a virtuální panely genů pro jednotlivé pacienty v závislosti na jejich onemocnění a souvisejících fenotypických projevech (Obrázek 1). Přítomnost jednotlivých variant a frekvence výskytu v běžné populaci byla posouzena na základě databáze gnomAD (Karczewski et al. 2020). *In silico* predikce funkčního dopadu a patogenicity jednotlivých variant byla posuzována primárně na základě *Combined Annotation Dependent Depletion* (CADD) skóre (Kircher et al. 2014) spolu s nástroji PolyPhen-2 (Adzhubei et al. 2013) a SIFT (Kumar et al. 2009) pro hodnocení dopadu missense variant. Varianty, které mají dopad na sestřih pre-mRNA, byly hodnoceny pomocí nástroje MaxEntScan (Yeo a Burge 2004). Hodnocení variant a jejich klasifikace byla posuzována na základě doporučení *American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology (ACMG-AMP)* (Richards et al. 2015). Prioritu při analýze měly varianty v genech již popsanych v souvislosti s IEI (Tangye et al. 2020), nebo ty,

které byly identifikovány jako jasně patogenní s pomocí dostupných databází publikovaných mutací - *The Human Gene Mutation Database* (HGMD Professional, QIAGEN, Hilden, Německo) nebo *Online Mendelian Inheritance in Man*, OMIM (McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University Baltimore, MD, USA).



Obrázek 1. Schéma postupu filtrování genetických variant identifikovaných pomocí WES u jednoho pacienta s přibližnými počty očekávaných variant v jednotlivých krocích analýzy. (Svatoň, XIV. Pediatrický kongres, Olomouc, 26. 9. 2019)

Pro predikci variability v počtu kopií (*copy number variation*; CNV) z WES dat byl použit nástroj CNVkit (Talevich et al. 2016) a jako reference k normalizaci pokrytí byl použit náhodný soubor několika pacientů sekvenovaných z knihoven připravených stejným kitem.

4. Výsledky

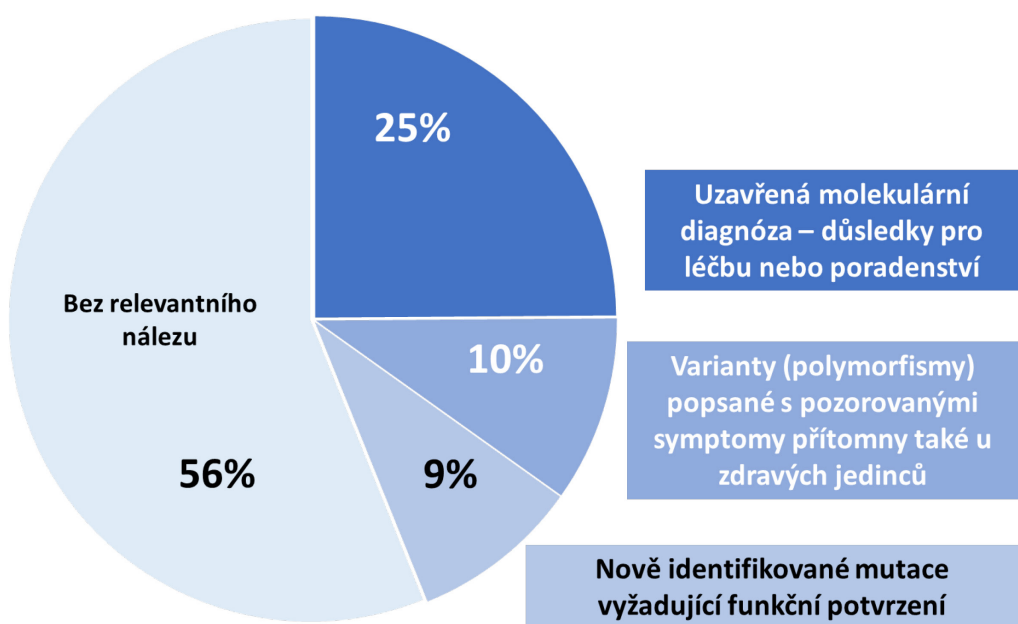
Dříve citované práce provedené na podobných souborech pacientů uvádějí výsledky rozdělené do dvou hlavních skupin: pozitivní molekulární nález a negativní výsledek genetického vyšetření, aniž by se podrobně vyjádřily k funkčnímu dopadu variant nejasného významu nebo pravděpodobně patogenních variant, které nebyly dříve popsány (Hadjadj et al. 2019; Miano et al. 2022). Podrobnější rozdělení výsledků v souboru pacientů s IEI z 278 rodin pomocí WES (Stray-Pedersen et al. 2017) bylo vzorem k rozdělení našich výsledků do 4 hlavních kategorií. Jasná molekulární diagnóza, tedy identifikace patogenní varianty, která byla již dříve popsána jako kauzální u pacientů s odpovídajícím fenotypem a vysvětluje tak příčinu onemocnění (kategorie A). Druhou kategorií tvoří případy s identifikovanou genetickou variantou, u které byla popsána souvislost s vyšším rizikem autoimunitního onemocnění nebo imunitní dysregulace, ale její frekvence v běžné populaci je vyšší než předpokládaná prevalence daného onemocnění. Jedná se tedy o rizikový faktor, který může mít vliv na fenotyp pacienta a v kombinaci s dalšími vlivy ovlivnit rozvoj klinických příznaků. Nejde však o klasický případ monogenně dědičného onemocnění. Do této kategorie řadíme i patogenní heterozygotní varianty v genech způsobující AR onemocnění, které samy o sobě nevysvětlují fenotyp pacienta (kategorie B).

Hlavní skupinu, na kterou se zaměřuji v této práci, jsou potom nové varianty v genech podmiňujících IEI, které nebyly dříve popsány v souvislosti s daným onemocněním nebo potenciálně patogenní varianty v genech, u nichž dosud nebyla popsána kauzální vazba s monogenně dědičným onemocněním, ale hrají důležitou roli ve vývoji imunitního systému anebo krvetvorbě. Uzavření výsledku v takovém případě vyžaduje jasné funkční potvrzení patogenního dopadu mutace, které objasňuje fenotyp pacienta (kategorie C).

Velkou část výsledků potom tvoří pacienti, u nichž nebylo možné identifikovat molekulárně genetickou příčinu onemocnění (kategorie D) – ať už v důsledku biologické příčiny anebo zvolené metodiky. Znalost molekulární patogeneze onemocnění pacientů je klíčová pro výběr vhodné terapie, ať už je jím jasná indikace k HSCT anebo správný výběr cílené léčby. Kromě přímého dopadu na samotné pacienty je identifikace patogenních variant důležitá pro včasné odhalení onemocnění u dalších členů rodiny, kteří do té doby nemuseli rozvinout příznaky onemocnění, i pro další genetické poradenství.

4.1. Výsledky vyšetření WES u pacientů s poruchou imunity a krvetvorby

Jako stručný přehled typických výsledků WES vyšetření uvádím průběžnou statistiku 222 pacientů vyšetřených pro podezření na IEI, vrozenou poruchu krvetvorby nebo nejasný syndrom imunitní dysregulace v naší laboratoři do r. 2019 (Obrázek 2). Publikace zaměřená na výběr pacientů s Evansovým syndromem je v přípravě. U všech těchto pacientů byla jasná molekulární příčina (kat. A) identifikována u 25 % pacientů. Kromě typických případů SCID s mutacemi *IL2RG*, *IL7R* a familiární hemofagocytující lymfohistiocytózou (HLH) na podkladě mutací *PRF1*, *UNC13D* jsme identifikovali pacienty se syndromy imunitní dysregulace na podkladě typických mutací *CTLA4*, *LRBA*, *STAT3*, *PIK3CD*.



Obrázek 2. Přehled výsledků WES u pacientů s podezřením na IEI nebo vrozenou poruchu krvetvorby (Svatoň, XIV. Pediatrický kongres, Olomouc, 26. 9. 2019).

Mezi případy z kategorie B se řadí 10 % pacientů s genetickou variantou, která může mít vliv na rozvoj onemocnění, ale nejedná se o monogenně podmíněné onemocnění, jsou typické varianty v genech kódujících receptory pro cytokiny TNF (*tumor necrosis factor*) superrodiny – *TNFRSF13B* (také *Transmembrane activator and CAML interactor*; *TACI*) a *TNFRSF13C* (také *B-cell activating factor receptor*; *BAFFR*). Ačkoliv jsou popsané varianty identifikované také u našich pacientů přítomny i u zdravých jedinců a vyskytují se v běžné populaci, jejich populační alelická frekvence je pod 1 % a jsou asociovány s běžnou variabilní imunodeficiencí

(common variable immunodeficiency; CVID) a spojeny také s výskytem autoimunitních komplikací včetně imunitních cytopenií u těchto pacientů (Salzer et al. 2005; Warnatz et al. 2009).

Nejdůležitější skupinu výsledků představuje kategorie C pacientů, u nichž se podařilo pomocí WES identifikovat nové, dříve nepopsané varianty v genech spojených s vývojem imunitního systému anebo krvetvorbou. Tyto výsledky umožnily plnění druhého cíle této práce, a to konkrétně navrzení experimentů, které by umožnily potvrdit kauzální roli identifikovaných variant v rozvoji onemocnění a objasnit jeho patogenetické mechanismy a možnosti cílené terapie. Těchto výsledků se podařilo dosáhnout u 9 % všech pacientů a jsou podkladem vzniklých publikací, které jsou podrobně popsány v této disertační práci.

U pacientů, jejichž genetické vyšetření nevedlo k identifikaci patogenní varianty (kat. D), je možné předpokládat, že onemocnění není způsobeno geneticky nebo jeho genetickou příčinu není možné odhalit. Mutace mohou být v oblastech intronů, které nejsou v NGS knihovnách pro WES pokryty nebo se nachází v genech, jejichž funkce v souvislosti s imunitním systémem stále nebyla dobře popsána a nepodařilo se je identifikovat v procesu filtrace variant. Z tohoto důvodu je vhodné neuzavřené výsledky NGS vyšetření u takových pacientů s odstupem času znovu analyzovat v kontextu nově publikovaných případů IEI a nově popsáných genů v jejich patogenezi.

4.2. Nově identifikované mutace a projevy onemocnění

Podrobné výsledky, prezentované v této disertační práci, tvoří publikace vzniklé na základě výsledků kategorie C, u nichž se pomocí validačních experimentů podařilo prokázat kauzální význam nově identifikovaných mutací.

4.2.1. Imunitní cytopenie na podkladě mutace genu *STAT3*

Sediva H. et al. Short Stature in a Boy with Multiple Early-Onset Autoimmune Conditions due to a *STAT3* Activating Mutation: Could Intracellular Growth Hormone Signalling Be Compromised? *Hormone Research in Paediatrics*, 2017;88(2), 160–166.

(viz **Příloha 1**)

Výsledkem vyšetření pacientů, které spojovaly cytopenie několika linií a lymfoproliferace, a u nichž bylo významné podezření na IEI, byla identifikace nové mutace v genu *STAT3* (*signal transducer and activator of transcription 3*), který hraje významnou roli v aktivaci a vývoji lymfocytů. Mutace v tomto genu vedoucí ke ztrátě jeho funkce byly popsány jako příčina AD Hyper-IgE syndromu (Minegishi et al. 2007), který byl známý již několik desítek let. Teprve v nedávné době byly popsány také aktivační mutace, které vedou k odlišnému fenotypu a způsobují u pacientů autoimunitní onemocnění, lymfoproliferaci a imunitní cytopenie (Milner et al. 2015).

V uvedené publikaci je popsána kasuistika chlapce s významnou lymfoproliferací, autoimunitní tyreoiditidou, diabetem mellitem 1. typu, poruchou růstu a významnými rekurentními atakami ITP od 4. roku života spojenými s rozvojem AIN v 6. roce věku. Rozvoj bicytopenie vedl k indikaci HSCT, jejímž komplikacím v podobě adenovirové infekce bohužel podlehl. Vyšetření WES u tohoto pacienta odhalilo mutaci c.2144C>T vedoucí k záměně aminokyseliny p.Pro715Leu v blízkosti dříve popsané patogenní aktivační mutace p.Thr716Met (Milner et al. 2015). Jelikož tato mutace leží na hranici exonu 22 a intronu, vede také k alternativnímu sestřihu pre-mRNA. Stejná mutace byla identifikována také u druhé pacientky vyšetřované v rámci našeho souboru, která trpěla od narození poruchou růstu. Od 1. roku života se u ní potom postupně rozvinula významná hepatosplenomegalie, lymfoproliferace a chronické ITP a AIHA vyžadující imunosupresivní terapii.

Aktivační mutace v genu *STAT3* vedou k inhibici STAT1 a STAT5 signalizace v důsledku zpětné inhibice regulátoru STAT této signalizace, proteinu SOCS3 (*Suppressor of cytokine signaling 3*). Zvýšená exprese genu *SOCS3* byla v naší studii využita také k průkazu funkčního dopadu identifikované mutace, stejně tak jako snížená aktivace STAT1 po stimulaci T-lymfocytů interferonem (IFN) γ a především snížená fosforylace STAT5 v odpovědi na stimulaci interleukinem 27 po prestimulaci interleukinem 6. Právě snížená schopnost STAT5 signalizace je vysvětlením růstové poruchy u našich 2 pacientů odpovídající dříve popsaným případům vrozeného STAT5b deficitu (Kofoed et al. 2003).

Výsledkem této publikace byla identifikace nové aktivační mutace genu *STAT3* u dvou pacientů s AD syndromem multisystémového autoimunitního onemocnění (OMIM #615952). Imunitní cytopenie jsou významným příznakem pacientů s tímto syndromem. Vedle nich je ale také

významná porucha růstu, která může být v některých případech úspěšně léčena pomocí růstového hormonu. Proto je důležitá časná diagnostika těchto pacientů a nastavení optimální terapie. Vzhledem k faktu, že mutace tohoto genu mohou vést i ke ztrátě jeho funkce a syndromu s odlišnými projevy a imunofenotypem, je kromě genetického vyšetření v diagnostice těchto pacientů klíčová také průtoková cytometrie a funkční testy provedené na primárních buňkách pacientů.

4.2.2. Vrozená megaloblastická anémie v důsledku poruchy transportu folátu

Svaton M., Skvarova Kramarzova K. et al. A homozygous deletion in the *SLC19A1* gene as a cause of folate-dependent recurrent megaloblastic anemia. *Blood*, 2020;135(26), 2427–2431. (viz **Příloha 2**)

Uvedená práce popisuje první případ těžké megaloblastické anémie v důsledku AR vrozené poruchy genu *SLC19A1* u člověka. Tento gen kóduje transportér redukovaného folátu (*reduced folate carrier*; RFC), který je jedním z hlavních transportérů folátu u savců a je exprimován především v buňkách placenty, jater, a kostní dřeni (Whetstone et al. 2002). Jeho význam v krvevorbě u savců byl už dříve demonstrován studií myšího knock-out (KO) modelu, v němž úplný deficit tohoto transportéru vedl k embryonální letalitě s nápadnou absencí krvevorbě (Zhao et al. 2001). Tato studie byla základem hypotézy o kauzalitě nalezené mutace v patogenezi pacientova onemocnění. Dalšími transportéry folátu u člověka jsou protonově vázaný folátový transportér (*protein-coupled folate transporter*; PCFT), jež je kódován genem *SLC46A1* a je zodpovědný především za absorpci folátu z potravy ve střevě. Mutace v něm byly popsány jako příčina AR malabsorpce folátu, která se u člověka projevuje velmi časně, a to již v prvních měsících života průjmy, neurologickým postižením, ale také megaloblastickou anémií a poruchou imunity. V důsledku snížené absorpce mají tito pacienti nízkou hladinu folátu v séru a cerebrospinální tekutině (Qiu et al. 2006). Dalšími transportéry folátu, které se odlišují především specifickou tkáňovou expresí, jsou folátové receptory (*folate receptor*; FR) alfa, beta a gamma, kódované geny *FOLR1-3*. Jako příčina monogenně podmíněného onemocnění byly u člověka popsány pouze mutace v genu *FOLR1*, který kóduje FR α umožňující transport folátu především do centrální nervové soustavy. AR onemocnění v důsledku mutací *FOLR1* se u pacientů projevuje v prvních letech života závažným neurodegenerativním postižením s psychomotorickou retardací a epileptickými záchvaty (Steinfeld et al. 2009).

Námi vyšetřovaný pacient byl poprvé hospitalizován v 15 letech s těžkou anémií (Hb 50 g/l), s obrazem poruchy vyzrávání erytroidní linie v kostní dřeni s četnými megaloblasty a dyserytropaetickými změnami. Pacient měl zvýšenou sérovou hladinu bilirubinu (34 μ mol/l) a homocysteinu (34.7 μ mol/l). Mezi hlavní příčiny v diferenciální diagnostice megaloblastické anémie v tomto věku patří především nedostatek vitamínu B12 nebo folátu. Jelikož sérové hladiny folátu byly u tohoto pacienta v normálním rozmezí (10.7 nmol/l), zatímco naopak hladina vitamínu B12 byla snížena (138 ng/l; velmi pravděpodobně kompenzačně), byl jako hlavní příčina pacientovy anémie předpokládán nedostatek vitamínu B12. Správná diagnóza byla stanovena až po odhalení homozygotní in-frame delece c.634_636delTTC v genu *SLC19A1*, která vede k deleci fenylalaninu (p.F212del) ve vysoce konzervované doméně RFC (Liu et al. 2003).

Cílem publikované práce bylo prokázat kauzální roli této mutace v onemocnění pacienta a sníženou schopnost mutovaného RFC transportovat folát do buněk kostní dřene pacienta. RFC má vysokou afinitu k redukovaným formám folátu, ale kromě nich transportuje také analoga folátu, např. metotrexát (MTX) (Dixon et al. 1994). Somatické mutace *SLC19A1* vedoucí ke ztrátě tohoto transportéru byly popsány jako mechanismus resistance k léčbě MTX například u akutní lymfoblastické leukémie a resistantních buněčných linií (Zhao et al. 1999). V této studii byl využit radioaktivně značený ($[^3\text{H}]\text{MTX}$), abychom mohli porovnat rychlost transportu do buněk mezi wild-type klonem K562 buněčné linie a klonem s homozygotní mutací *SLC19A1* p.F212del (*SLC19A1*^{MUT}), který byl připraven pomocí genové editace systémem CRISPR/Cas9. Stejně tak byly připravené klony nesoucí pacientovu mutaci v heterozygotním stavu a klony s úplným KO genu *SLC19A1*.

Oproti *SLC19A1*^{WT} klonu K562 buněčné linie jsme u *SLC19A1*^{MUT} klonu při dlouhodobé kultivaci pozorovali také zvýšenou rezistenci k řádově vyšším koncentracím. Rezistence *SLC19A1*^{KO} byla ještě výrazně vyšší, což dokazuje sníženou kapacitu mutovaného RFC pro transport MTX, ale ne úplnou ztrátu jeho funkce. V buňkách kostní dřene pacienta jsme také prokázali zvýšenou expresi genů jiných transportérů folátu proti zdravým kontrolám – především *SLC46A1* a *FOLR2*, jejichž afinita k redukovanému folátu je nižší a tato kompenzace tedy nestačila dlouhodobě pokrýt nároky na transport folátu do hematopoetických buněk pacienta.

Kauzální léčba pacienta farmakologickými dávkami kyseliny listové, která využívá k transportu do buněk jiných mechanismů, vedla k normalizaci klinického stavu pacienta i jeho laboratorních nálezů během pouhého jednoho měsíce. Tato publikace popisuje první případ vrozeného deficitu transportu redukovaného folátu u člověka v důsledku mutace v genu *SLC19A1*, jehož hlavním projevem je těžká megaloblastická anémie (OMIM #601775) a zároveň popisuje velmi jednoduchou a efektivní dlouhodobou léčbu tohoto onemocnění.

4.2.3. Hydrops fetalis a těžká hereditární sferocytóza

Svaton M. et al. Hydrops fetalis and failure of hematopoietic stem cell transplantation – A long route to the diagnosis of *SPTAI*-associated hereditary spherocytosis. *Blood Cells Mol Dis.* 2022;Jul;95:102664.

(viz **Příloha 3**)

Kasuistika pacientky se závažnou vrozenou anémií popisuje další z případů velice komplikované diagnostiky, která mohla být uzavřena pouze díky WES, jež odhalilo 2 nové synonymní mutace v genu *SPTAI*, kódujícím spektrin α , který je součástí membrány erytrocytů. Mutace tohoto genu podmiňují vzácnou, AR formu hereditární sferocytózy (HS), či AD hereditární eliptocytózu. Pacienti trpící tímto onemocněním zpravidla profitují ze splenektomie, která vede k významnému prodloužení doby životnosti a cirkulace erytrocytů s fragilní membránou, a tím ke stabilizaci klinického stavu. Ve vzácných případech těžké AR HS způsobené úplným anebo téměř úplným deficitem spektrinu α , je membrána erytrocytů natolik nestabilní, že dochází k rozpadu retikulocytů i po splenektomii a pacienti jsou tak doživotně závislí na transfúzích erytrocytů, nebo je u nich nutná HSCT. Tito pacienti většinou trpí závažnou anémií se spojenými komplikacemi již *in utero*, která vede k hydropsu plodu (Chonat et al. 2019).

Pacientka trpěla velmi těžkou anémií (Hb 37 g/l) s obrazem fetální erytroblastózy a velmi nízkou retikulocytémií (0.06 %). Významná hyperplázie erytroidní řady v kostní dřeni, způsobená rapidním rozpadem erytrocytů již v ranných stádiích a spojené morfologické změny erytroidních prekurzorů (megaloblasty, dvoujaderné erytroblasty, nepravidelnost jader, Howell-Jollyho tělíška) odpovídal v rámci diferenciální diagnostiky obrazu kongenitální dyserythropoetické anémie (*congenital dyserythropoietic anemia*; CDA) typu II. Vzhledem k závažnosti anémie byla pacientka závislá na transfúzích erytrocytů ve velmi krátkých

intervalech 2-3 týdnů, což spolu s vysokou fragilitou jejích vlastních erytrocytů zásadně komplikovalo laboratorní diagnostiku. Vyšetření erytrocytární membrány pomocí průtokové cytometrie využívající barvení eosin-5'-maleimidem (EMA test), deformability erytrocytů pomocí ektacytometrického vyšetření s osmotickým gradientem ani SDS-PAGE vyšetření nepřinesly specifické výsledky pro HS, jelikož interval mezi transfúzemi nikdy nepřesáhl 8 týdnů. Ve 3. roce života pacientka podstoupila HSCT s dobrým post-transplantačním průběhem bez závažných časných komplikací. Nicméně po 3 měsících od transplantace u ní došlo k pozdnímu selhání štěpu a obnovení autologní krvetvorby. Splenektomie měla efekt mírného prodloužení intervalu mezi transfúzemi a zvýšení retikulocytémie, nikoliv však kurativní, jak je tomu u velké části pacientů s HS (Chonat et al. 2019).

Pro funkční potvrzení dopadu obou mutací na sestřih pre-mRNA genu *SPTA1*, který je exprimován pouze během vývoje erytrocytů (Wolgast et al. 2011) jsme se rozhodli separovat časné retikulocyty pomocí FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) z periferní krve pacientky v době před transfúzí, kdy byl jejich podíl nejvyšší. Z těchto buněk byla potom izolována RNA a po reverzní transkripci jsme využili specificky navržených PCR primerů k přípravě amplikonových NGS knihoven pro analýzu sestřihu pre-mRNA přímo v postižených buňkách pacientky. Bioinformatická analýza sekvenčních dat potvrdila vznik nových sestřihových míst v důsledku obou mutací, které vedly k retenci části intronu a posunu čtecího rámce nebo přeskočení celého exonu 13. V případě obou mutací vedla k téměř úplné nepřítomnosti správně sestřížených transkriptů *SPTA1* (ty jsme detekovali pouze na úrovni 3 % sekvenovaných amplikonů), a tedy funkčního proteinu spectrinu α .

Ačkoliv HSCT v případě této pacientky bohužel selhala a splenektomie vedla pouze k částečné úpravě onemocnění, vysvětlení genetické příčiny vedlo alespoň k uzavření této diagnostické odysey a potvrzení správnosti zvoleného terapeutického postupu.

4.2.4. Chronická autoimunitní hemolytická anémie na podkladě imunitní dysregulace

Fejtikova M. et al. TLR8/TLR7 dysregulation due to a novel TLR8 mutation causes severe autoimmune hemolytic anemia and autoinflammation in identical twins. *Am J Hematol.* 2022 Mar 1;97(3):338-351.

(viz **Příloha 4**)

Novým popisem klinické jednotky monogenně podmíněného syndromu imunitní dysregulace s lymfoproliferací a chronickou AIHA byla studie dvou jednovaječných dvojčat s nápadně podobným průběhem onemocnění nastupujícím od 2. roku života. Chronická AIHA, která byla refrakterní ke všem standardním liniím léčby (kortikosteroidy, azathioprin, rituximab), byla hlavním projevem u obou bratrů a stabilizace projevů anémie bylo docíleno až nasazením sirolimu. Přetrvávající autoinflamatorní projevy však vyžadovaly dlouhodobou léčbu nesteroidními antiflogistiky (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*; NSAID) a progresse onemocnění u jednoho z bratrů, jehož onemocnění mělo dlouhodobě závažnější projevy, potom nasazení anti-TNF- α léčby a MTX, bez dlouhodobého efektu. Postupný rozvoj onemocnění připomínající systémový lupus erythematoses (*SLE-like* onemocnění) a CNS vaskulitidy, která vedla k náhlé hemoragické cévní mozkové příhodě, byly důvodem k HSCT tohoto pacienta.

Pomocí WES jsme identifikovali variantu c.1715G>T (NM_138636) v genu kódujícím Toll-like receptor 8 (*TLR8*) vedoucí k substituci aminokyseliny p.Gly572Val. TLR8 patří mezi tzv. receptory pro alarminy (*pattern recognition receptors*; PRRs), které slouží k detekci struktur patogenních mikroorganismů v lidském organismu, v případě TLR8 jde o jednovláknovou RNA (*single-stranded RNA*; ssRNA) virů a bakterií. Tento receptor je exprimován endosomálně především v monocitech a makrofázích a jeho aktivace vede k silné aktivaci NF- κ B signální dráhy a produkci prozánětlivých cytokinů – IFN typu I (de Marcken et al. 2019). Zvýšená prozánětlivá aktivita u obou pacientů a průlomové zhoršení klinických projevů v návaznosti na gastrointestinální či respirační infekty nás vedly k hypotéze, že se jedná o patogenní mutaci, která je hlavní příčinou jejich autoimunitního a autoinflamatorního onemocnění.

Velký význam pro hodnocení nalezené varianty ve vztahu k onemocnění, ale také adekvátní volbě léčebných postupů bylo navázání zahraniční spolupráce díky platformě GeneMatcher, která spojuje výzkumné týmy vyšetřující stejné geny jako potenciálně kauzální u pacientů s podobnými fenotypickými projevy (Sobreira et al. 2015). Díky této spolupráci jsme mohli

najít několik pacientů s podobnými projevy imunitní dysregulace, lymfoproliferace a cytopenií, u nichž byly identifikovány somatické mutace *TLR8*. Společná konzultace pacientů nám umožnila výměnu zkušeností s jejich léčbou a sdílení návrhů a výsledků experimentů, které vedly k odhalení patogenetických mechanismů tohoto onemocnění (Aluri et al. 2021).

Signalizace TLR8 a fylogeneticky příbuzného TLR7 je v buňkách imunitního systému úzce spjata a oba receptory jsou vzájemně regulovány. V důsledku identifikované mutace byla regulace narušena ve prospěch TLR7-mediované signalizace. V naší studii jsme demonstrovali, že mutovaný protein TLR8^{G572V} reaguje na ligandy specifické pro TLR8 v nižších koncentracích než TLR^{WT}. Zároveň je zkříženě aktivován ligandy, které jsou specifické pro TLR7. Exprese TLR8^{G572V} v primárních patientských buňkách, ale i transientně transfekovaných buněčných liniích HEK293(T) je snížena oproti TLR8^{WT} a je rychleji degradován. Ko-exprese mutovaného TLR8^{G572V} spolu s TLR7 v buněčné linii HEK-Blue nevede ke stejné schopnosti regulace TLR7-mediované odpovědi jako v případě ko-exprese TLR8^{WT}. Tyto výsledky potvrdily naši hypotézu patogenetického mechanismu onemocnění na základě dysregulace TLR7/TLR8 rovnováhy v důsledku *TLR8* mutace. Objasnění tohoto patogenetického mechanismu vedlo také k nasazení hydroxychlorochinu v léčbě netransplantovaného bratra s cílem inhibovat TLR7 signalizaci (Schrezenmeier a Dörner 2020). Tento způsob léčby vedl k dobré klinické odpovědi a umožnil postupnou redukci kortikosteroidů v jeho léčbě, a stabilizaci onemocnění v kombinaci s dlouhodobou léčbou sirolimem.

Tato studie byla prvním popsáním případem vrozené X-vázané vrozené poruchy imunity s autoimunitními a autoinflamatorními projevy na podkladě mutace genu *TLR8* (OMIM #301078). Současně také popsala vedle úspěšné HSCT u jednoho z bratrů, novou modalitu imunosupresivní léčby u druhého z nich, která vedla k dlouhodobé stabilizaci onemocnění.

4.2.5. Imunodeficiencie na podkladě nové mutace *SAMD9*

Formankova, R, et al. Novel *SAMD9* Mutation in a Patient With Immunodeficiency, Neutropenia, Impaired Anti-CMV Response, and Severe Gastrointestinal Involvement. *Frontiers in Immunology*. 2019;**10**(September), 1–8.

(viz **Příloha 5**)

V nedávné době byly popsány heterozygotní aktivační mutace genu *SAMD9* jako příčina syndromu MIRAGE (Myelodysplázie, Infekce, Růstová restrikce, Adrenální hypoplázie, Genitální abnormality a Enteropatie). Patogenetickým mechanismem tohoto syndromu je zvýšená aktivace *SAMD9*, který inhibuje růst buněk. U tohoto syndromu byl poprvé popsán mechanismus adaptace buněk pomocí aneuploidie u člověka – 2 pacienti popsaní v této studii vyvinuli myelodysplastický syndrom v důsledku monosomie chromosomu 7, na kterém se nachází gen *SAMD9*. Buňky, u nichž došlo ke ztrátě chromosomu 7 nesoucího mutovanou alelu genu, získaly selekční výhodu oproti buňkám, jejichž růst byl inhibován (Narumi et al. 2016).

Námi publikovaná kasuistika popisovala pacienta narozeného předčasně v 33. gestačním týdnu se závažnou generalizovanou cytomegalovirovou (CMV) infekcí. Významnými projevy onemocnění u tohoto pacienta byly také enteropatie a porucha polykání a časté závažné infekce. Od 6. měsíce života trpěl závažnou neutropenií a postupně vyvinul monosomii chromosomu 7. HSCT u pacienta vedla k resoluci jeho hematologického postižení, bohužel ale i přesto v 2. roce od transplantace podlehl dalším symptomům tohoto onemocnění a sepsi.

V době vyšetřování tohoto pacienta nebyl syndrom MIRAGE popsán a patogenní variantu v genu *SAMD9* se podařilo identifikovat až po jeho popsání v roce 2016, kdy byla data z WES znovu analyzována. Mutace c.2471G>A (NM_017654.4) identifikovaná u tohoto pacienta vede k záměně aminokyseliny p.R824Q a je většinou nástrojů zaměřených na *in silico* predikci dopadu na funkci proteinu charakterizována jako pravděpodobně benigní.

4.2.6. Imunitní dysregulace v důsledku narušené signalizace NOD2

Parackova Z et al., Novel XIAP mutation causing enhanced spontaneous apoptosis and disturbed NOD2 signalling in a patient with atypical adult-onset Crohn's disease. *Cell Death Dis.* 2020 Jun 8;11(6):430.

(viz **Příloha 6**)

Parackova Z et al., Mutual alteration of NOD2-associated Blau syndrome and IFN γ R1 deficiency. *J Clin Immunol.* 2020 Jan;40(1):165-178.

(viz **Příloha 7**)

Publikace dvou kasuistik pacientů se závažným postižením imunitního systému spojuje dysregulace signalizace proteinu NOD2. Tento protein patří také mezi PRRs a hraje důležitou roli především v detekci bakteriálních patogenů. Mutace genu *NOD2* byly popsány v souvislosti s AD Blauovým syndromem (OMIM #186580) – kombinací granulomatózní artritidy, uveitidy a dermatitidy (Blau 1985; Miceli-Richard et al. 2001). V první studii jsme popsali případ pacientky, u níž jsme pomocí WES identifikovali kombinaci dvou heterozygotních mutací: mutace c.2264C>T v genu *NOD2* (NM_022162.2), která vede k záměně aminokyseliny p.A755V a delece 4 nukleotidů c.819_822delTAAT v genu *IFNGRI* (NM_000416.2). Obě tyto mutace byly dříve popsány u pacientů s Blauovým syndromem – *NOD2*^{A755V} (Rose et al. 2015) a pacientů s AD formou deficience receptoru pro IFN γ (IMD27B; OMIM #615978) – *IFNGRI*^{818del4} (Jouanguy et al. 1999). Kombinace obou mutací u této pacientky vedly v důsledku vzájemné interakce k unikátnímu fenotypu Blauova syndromu s porušenou IFN γ signalizací a náchylností k mykobakteriální infekci, která se projevila již v 6 týdnech života po aplikaci BCG (bacillus Calmette-Guérin) vakcíny. Segregační analýza rodiny ukázala, že patogenní varianty v obou genech zdědila pacientka od své matky, která netrpěla žádnými symptomy onemocnění a neměla v dětství žádnou nežádoucí reakci na BCG vakcínu. Tento paradox ukazuje na neúplnou penetranci identifikovaných mutací a pravděpodobnou existenci dalších faktorů a modifikátorů v rozvoji onemocnění, které nebylo možné objasnit. Provedené funkční testy ukázaly u této pacientky alterace v signalizaci NOD2 i IFN γ a její klinický stav a laboratorní markery velmi dobře odpovíděly na léčbu MTX.

Druhým případem byl pacient s IBD, jež se rozvinul v období adolescence a rekurentní HLH, jejíž ataky nastupovaly v návaznosti na virové infekce (např. v souvislosti s infekcí virem Epstein-Barrové). Pomocí WES jsme u tohoto pacienta identifikovali dříve nepopsanou mutaci v genu *XIAP* c.266delA vedoucí k posunu čtecího rámce a předčasnému stop kodonu p.Asn89fs*41. Důsledkem této mutace je úplná absence funkčního proteinu. Mutace tohoto genu jsou popsány jako příčina X-vázaného lymfoproliferativního syndromu-2 (*X-linked lymphoproliferative syndrome 2*; XLP2), pro nějž jsou typické projevy IBD a HLH ve velmi časném věku a zvýšená sensitivita k apoptóze u T-lymfocytů, kterou jsme pozorovali také u našeho pacienta. V souvislosti s rozvojem IBD u pacientů s XLP2 byl v nedávné době popsán význam role C-terminální RING (*Really Interesting New Gene*) domény jako ubiquitin ligázy klíčové v NOD1/2 signalizaci (Damgaard et al. 2013).

5. Diskuse

Cílem mé práce bylo posoudit možnost využití WES u pacientů s podezřením na poruchu imunity nebo krvetvorby. Vzhledem k jejich nízkému věku v době nástupu onemocnění a jeho závažnému průběhu, často refrakternímu k několika liniím standardní léčby, je u nich pravděpodobná vrozená příčina. Ve srovnání s podobnými soubory pacientů, u nichž byla využita diagnostika pomocí NGS a výsledky byly rozděleny do dvou hlavních skupin pozitivního či negativního genetického nálezu (Hadjadj et al. 2019; Miano et al. 2022), navrhl jsem podrobnější rozdělení výsledků do čtyř kategorií – kromě jasného nálezu patogenní mutace (kat. A) a negativních výsledků (kat. D) také na výsledky jejichž interpretace je komplikovaná a mutace samy o sobě nevysvětlují fenotyp pacienta, v němž mohou hrát roli další faktory (kat. B) anebo vyžadují experimentální validaci (kat. C).

Prvním krokem diagnostiky pomocí WES je filtrace variant z NGS dat. Vzhledem k počtu detekovaných variant v řádech statisíců u každého pacienta (s odchylkami v závislosti na zvolené metodě přípravy knihoven, kvalitě DNA, NGS knihovny a sekvenčního běhu) je pro správnou identifikaci kauzální varianty klíčové nastavení optimálních filtračních kritérií a individuální hodnocení každého pacienta. V mnoha případech zůstávají mezi výslednými variantami i po filtraci artefakty vzniklé při přípravě knihovny, sekvenaci anebo v důsledku bioinformatického zpracování primárních dat. K jejich automatické eliminaci při analýze by bylo vhodné využít tzv. *in-house* databáze variant, které se opakují ve výsledcích pacientů sekvenovaných a analyzovaných stejným postupem. Tu se bohužel v průběhu mé práce nepodařilo vytvořit. Nicméně díky získaným zkušenostem a možnosti porovnávat průběžně nezávislé výsledky mnoha pacientů bylo možné naučit se tyto artefakty rychle a efektivně eliminovat. V tomto kontextu je dle mého názoru výhodné, aby byla NGS data jednotlivých pacientů analyzována odborníky, kteří se dlouhodobě soustředí na problematiku určitého typu onemocnění a jsou tak lépe schopni zaměřit se na několik stovek genů, které mohou být jeho příčinou.

U většiny pacientů, u kterých se podařilo identifikovat genetickou příčinu onemocnění, byla tato příčina odhalena v již známých genech, jejichž mutace byly již dříve popsány v souvislosti s IEI anebo vrozenou poruchou krvetvorby. Pro snazší analýzu a interpretaci dat je tedy možné využít místo WES cíleného panelového sekvenování klinicky významných genů pro jeden typ

onemocnění. V návrhu takového panelu, případně virtuálního panelu genů, který lze použít i pro filtraci výsledků WES, je možné využít nástrojů pro predikci funkčně podobných genů (Itan et al. 2013). Je tak možné zvýšit šanci identifikace nových kauzálních genů a zároveň snížit náklady na sekvenaci a zjednodušit analýzu dat. Takový panel pro IEI se podařilo v průběhu mé práce v naší laboratoři zavést. V současné době zahrnuje přes 500 různých genů a je průběžně aktualizován. Využití tohoto panelového sekvenování je nyní prvním krokem v diagnostice a rychlé analýze pacientů s podezřením na IEI. K WES je možné přistoupit v případě negativního výsledku. Kromě vyššího potenciálu k identifikaci nových příčin monogenně dědičných onemocnění má WES oproti panelu také výhodu v detekci CNV vzhledem k uniformnějšímu pokrytí.

Pro správnou interpretaci výsledků WES a prioritizaci variant je také klíčové posouzení fenotypu pacienta a příznaků onemocnění v kontextu dříve popsaných případů. Kromě klinických symptomů a výsledků běžných laboratorních vyšetření je zejména u poruch imunity anebo krvetvorby klíčové vyšetření imunofenotypu buněk periferní krve nebo kostní dřeně pomocí průtokové cytometrie (Kalina et al. 2020). Jak ukazuje např. publikace nové *STAT3* mutace (Příloha 1), mutace stejného genu mohou mít odlišný charakter a vést k různým projevům onemocnění, které je možné lépe klasifikovat na základě cíleného vyšetření imunofenotypu či aktivace signálních drah, jichž je mutovaný gen součástí. Stejně tak je takto cílené vyšetření na základě identifikované mutace využít k monitoraci efektu cílené terapie, např. u terapie aktivační mutace *STAT1* (Bloomfield et al. 2018). Provedení těchto vyšetření, jejich interpretace, nastavení a monitorace specifické terapie u těchto pacientů vyžaduje dlouhodobou spolupráci vědeckých pracovníků s ošetřujícími lékaři, ale především také pacientů a jejich rodin.

Identifikace patogenních mutací má obrovský význam pro volbu terapie jednotlivých pacientů díky odhalení molekulárního mechanismus patogeneze, ale neméně důležitá je vzhledem k vzácnosti těchto onemocnění také pro získávání poznatků o efektech různých modalit léčby u konkrétních syndromů. Díky mezinárodní spolupráci a možnosti sdílení dat o pacientech v rámci větších souborů je možné hodnotit výsledky léčby a nastavit tak doporučení pro optimální terapii a management komplikací. Naši pacienti byli zařazeni do rozsáhlé studie efektu léčby CTLA-4 deficitu (Egg et al. 2022) a díky rychlé identifikaci fenotypicky

podobných pacientů skrz databázi GeneMatcher (Sobreira et al. 2015) jsme mohli konzultovat možnosti léčby u dosud nepopsaného onemocnění na podkladě mutace genu *TLR8* (Příloha 4).

Za nejdůležitější výsledky své práce považuji identifikaci nových příčin vrozených poruch hematopoézy a imunity, které řadím do kategorie C. Hodnocení kauzálních mutací a jejich správná identifikace je u pacientů v řadě případů komplikovaná charakterem daných mutací a nesprávnou *in silico* predikcí pomocí standardně využívaných nástrojů. Uváděné příklady ilustrují důležitost individuální analýzy pacientů v souvislosti s jejich klinickým fenotypem, výsledky laboratorních vyšetření a rešerší dostupné literatury. V případě pacienta s těžkou anémií na podkladě mutace *SLC19A1* (Příloha 2) nebyla mutace v rámci běžné filtrace klasifikována jako patogenní, jelikož se jedná o in-frame delecii, která nevede k významné změně proteinu. K odhalení příčiny pacientova onemocnění vedla až cílená analýza genů spojených s metabolismem folátu a vitamínu B12 na základě jeho fenotypu.

Podobným případem byly i dvě nově identifikované mutace *SPTA1* u pacientky s AR HS (Příloha 3), jelikož obě její mutace jsou na úrovni proteinu synonymní, a tak byly odhaleny až cílenou analýzou zaměřenou na varianty ovlivňující sestřih pre-mRNA. Tento příklad podtrhuje podceňovaný význam synonymních mutací, které bývají v analýze NGS dat často filtrovány jako nevýznamné. Vzhledem k závažnému fenotypu pacientky bylo velmi obtížné i provedení vyšetření, která by odhalila příčinu onemocnění a potvrzení kauzality obou mutací.

Nižší spolehlivost predikčních nástrojů PolyPhen-2 a SIFT, které jsou běžně využívány, dokazuje i další případ pacienta s mutací *SAMD9* (Příloha 5), která má aktivační charakter, u něž jsou tyto nástroje méně spolehlivé, a tak byla predikována jako benigní (Flanagan et al. 2010). Jelikož se jednalo o dříve neznámý gen v patogenezi IEI, byla tato mutace identifikována až při reanalýze dat s odstupem času od prvního vyšetření pacienta. V identifikaci této mutace pomohlo také tzv. trio sekvenování, tedy doplnění sekvenace i o vzorky obou rodičů pacienta, které přináší značnou výhodu v diagnostice sporadických AD onemocnění na podkladě *de novo* vzniklých mutací.

Obtížná interpretace výsledků a identifikace patogenních variant je také v případě současného postižení více genů a kombinovaného fenotypu, který neodpovídá typickým příznakům onemocnění na podkladě mutací jednotlivých genů, ale je ovlivněn jejich vzájemnou interakcí.

Tak jako tomu bylo např. u pacientky s mutacemi identifikovanými v genech *NOD2* a *IFNGR1* (Příloha 7).

Ve všech těchto případech bylo klíčové navržení vhodného vyšetření na základě dostupných poznatků o biologii a fyziologických mechanismech vyšetřovaných genů. V mnoha případech k prokázání kauzální role mutace v patogenezi onemocnění stačí provedení dostupného vyšetření – typicky u nových mutací v genech, které jsou již s IEI asociovány, jestliže fenotyp pacienta odpovídá typickým projevům takového onemocnění a charakter mutace je jasně patogenní. Příkladem může být mutace vedoucí k posunu čtecího rámce a vnesení předčasného stop kodonu do mRNA v případě nové mutace genu *XIAP* (Příloha 6). V podobných případech, které vedou k úplné ztrátě proteinu, je pro uzavření diagnózy dostačující průkaz ztráty nebo snížení jeho exprese v primárních buňkách pacientů oproti zdravým kontrolám pomocí průtokové cytometrie nebo western blotu (např. vyšetření *CTLA-4*). Mutace vedoucí k záměně aminokyseliny při zachování exprese proteinu vyžadují provedení náročnějších vyšetření, specificky zaměřených na konkrétní signální dráhu, jelikož mohou mít charakter ztráty funkce proteinu nebo naopak charakter aktivační (např. vyšetření fosforylace jednotlivých STAT molekul). U nových onemocnění, jejichž patogeneze není známá, je nutné důkladné prozkoumání dopadu mutace, a to nejen v primárních buňkách pacienta, ale také pomocí experimentálního modelu, kterým je možné reprodukovat buněčný fenotyp pacienta. Přístupů k vytvoření takového modelu a ověření funkčního dopadu je mnoho a odvíjí se od konkrétního genu a procesu, který je v důsledku mutace narušen a dostupných nástrojů.

Poslední skupinu výsledků tvoří velká část pacientů, u nichž vyšetření pomocí WES neposkytne genetickou diagnózu (kat. D). Vysvětlení pro tento fakt může být několik. Obecné poznání v oblasti IEI a vývoje imunitního systému a krvetvorby se velice rychle rozvíjí a nejsou známy zdaleka všechny genetické příčiny těchto onemocnění. Důkazem je i tato práce, během níž se podařilo dvě nové příčiny identifikovat a popsat. Některé pacienty bylo možné diagnostikovat až několik let po provedení vyšetření, když byla příčina onemocnění odhalena u jiných pacientů, tak jako tomu bylo u nové mutace v genu *SAMD9* (Příloha 5). Z tohoto důvodu je vhodné neuzavřené případy s odstupem času znovu analyzovat s využitím nových biologických znalostí, aktualizovaných databází (Landrum et al. 2018; Karczewski et al. 2020) a nově vyvíjených nástrojů pro anotaci variant a predikci jejich funkčního významu. Druhým důvodem mohou být příčiny onemocnění, které není možné pomocí WES detekovat, např. na podkladě

epigenetických změn, mutací v intronech, které mohou ovlivňovat sestřih genů nebo jejich regulaci a nejsou v připravených NGS knihovnách pokryty. Tyto příčiny by mohlo potenciálně odhalit např. celogenomové sekvenování. Úspěšnost tohoto vyšetření u neuzavřených případů jsme u našich pacientů neprováděli. Další možností je také transkriptomové sekvenování, které by umožnilo odhalit změny v genové expresi, případně detekovat fúzní geny na podkladě strukturálních variant, které je pomocí WES obtížné odhalit.

Přes všechny tyto neuzavřené případy a limitace umožnilo WES vyšetření rychle a úspěšně diagnostikovat velkou část pacientů, a tím umožnit jejich cílenou terapii. Data vygenerovaná pomocí této metody je možné dále použít pro budoucí analýzy pomocí sofistikovanějších nástrojů a rozšiřujícího se poznání molekulární biologie a odhalit tak možnou příčinu bez nutnosti opakovaného vyšetření.

6. Závěr

WES vyšetření u dětských pacientů s těžkou cytopenií a podezřením na IEI nebo poruchu krve tvorby vede k odhalení genetického podkladu onemocnění zhruba u třetiny pacientů. Na základě znalosti patogenetického mechanismu poruchy imunity nebo krve tvorby je možné navrhnout specifickou terapii a možnosti sledování odpovědi na léčbu. Samotné vyšetření a identifikace patogenních mutací u těchto pacientů vyžaduje úzkou spolupráci s pacientem a jeho rodinou, ošetřujícími lékaři a dalšími laboratorními pracovníky, jelikož je k interpretaci funkčního dopadu nalezených variant pomocí WES zapotřebí specifických vyšetření. Úzká spolupráce je také důležitá v rámci volby optimální léčebné strategie a sledování jejího efektu, a to především u nově popsanych poruch krve tvorby a imunity, které nebyly doposud důkladně studovány.

Oproti omezenému sekvenování již známých genů s jasným mechanismem patogeneze otevírá WES možnosti identifikace nových klinických jednotek. Samotná identifikace kauzální mutace v takových případech je velmi složitá a potvrzení hypotézy vyžaduje zavedení specifických laboratorních vyšetření nejen primárních buněk pacienta, ale také přípravu experimentálních buněčných či zvířecích modelů, díky kterým je možné podrobně studovat dopad nových mutací. Výsledky této disertační práce ukazují příklady uzavřených případů, u nichž byl tento proces úspěšný a vedl k publikaci nových genetických příčin poruch imunity či krve tvorby nebo doplnění spektra klinických projevů a možností léčby u těchto pacientů. Tyto úspěšně uzavřené výsledky doprovázelo také mnoho identifikovaných variant, jejichž přímá role v onemocnění pacienta se nepotvrdila. I negativní výsledky také vyžadovaly velké úsilí a jsou neméně důležité v poznání funkce hematopoetických buněk a interpretaci dalších výsledků u mnoha pacientů.

Jedinou účinnou terapií IEI či poruch krve tvorby je v mnoha případech pouze HSCT, která je velmi náročná a spojená s řadou různých komplikací. Znalost patogeneze těchto onemocnění je proto nesmírně důležitá pro správnou volbu terapie, ať už je potvrzením nutnosti HSCT anebo naopak nabízí jinou možnost efektivní farmakologické terapie a jejího sledování.

Vzhledem k neustálému vývoji poznání, nástrojů a terapeutických možností v této oblasti má i v budoucnosti NGS vyšetření u takových pacientů velký potenciál a mělo by být rutinně využíváno v diagnostice. Stejně důležitá je potom zpětná analýza dat novými nástroji.

7. Souhrn

Výsledkem této disertační práce je celkem 7 publikací, z nichž 2 popisují nová monogenně dědičná onemocnění – AR megaloblastickou anémií v důsledku sníženého transportu folátu pomocí RFC do hematopoetických buněk na podkladě mutace genu *SLC19A1*, novou X-vázanou poruchu imunity na podkladě mutace genu *TLR8* u dvojčat s chronickou AIHA a autoimunitním a autoinflammatorním onemocněním. Dále byly publikovány nové mutace u dříve známých onemocnění – aktivační mutace v genu *STAT3* u dvou pacientů se syndromem imunitní dysregulace, dvě nových mutace v genu *SPTA1*, které vedou k narušení sestřihu pre-mRNA a těžké AR HS, aktivační mutace v genu *SAMD9* vedoucí k AD syndromu poruchy imunity a selhání kostní dřeně, nonsense mutace v genu *XIAP* u pacienta s XLP2 a případ atypického fenotypu u pacienty s mutacemi v genech *NOD2* a *IFNGR1*. Kromě těchto publikací vysvětlujících nové patogenetické mechanismy vedla práce především k úspěšné diagnostice mnoha pacientů s IEI nebo selháním hematopoézy a ukazuje tak důležitost WES a dalších technologií NGS v diagnostice pacientů a úspěšné volbě terapeutických postupů u pacientů.

8. Summary

The results of this work comprise 7 publications, 2 of which describe new inherited monogenic disorders – AR megaloblastic anemia due to disrupted folate transport via RFC into hematopoietic cells due to a mutation in the *SLC19A1* gene, a new X-linked immune disorder due to a mutation in the *TLR8* gene in twins with chronic AIHA and autoimmune and autoinflammatory disease. In addition, we published novel mutations in previously known disease-causing genes – an activating mutation in the *STAT3* gene in two patients with a syndrome of immune dysregulation, two novel mutations in the *SPTAI1* gene resulting in disrupted pre-mRNA splicing and severe AR HS, an activating mutation in the *SAMD9* gene leading to AD immune deficiency syndrome and bone marrow failure, a nonsense mutation in the *XIAP* gene in a patient with XLP2, and the publication of an atypical phenotype in a patient with mutations in the *NOD2* and *IFNGR1* genes. In addition to these publications explaining novel pathogenetic mechanisms, this work has mainly led to the successful diagnosis of many patients with IEI or hematopoietic failure, demonstrating the importance of WES and other NGS technologies in patient diagnostics and choice of successful therapy of these patients.

9. Použitá literatura

- Adzhubei, Ivan, Daniel M. Jordan a Shamil R. Sunyaev, 2013. *Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2*. ISBN 0471142905. doi: 10.1002/0471142905.hg0720s76
- Aiuti, Alessandro, Maria Grazia Roncarolo a Luigi Naldini, 2017. Gene therapy for ADA-SCID, the first marketing approval of an ex vivo gene therapy in Europe: paving the road for the next generation of advanced therapy medicinal products. *EMBO Molecular Medicine*. **9**(6), 737–740. doi: 10.15252/emmm.201707573
- Aluri, Jahnavi, Alicia Bach, Saara Kaviani, Luana Chiquetto Paracatu, Maleewan Kitcharoensakkul, Magdalena A. Walkiewicz, Christopher D. Putnam, Marwan Shinawi, Nermina Saucier, Elise M. Rizzi, Michael T. Harmon, Molly P. Keppel, Michelle Ritter, Morgan Similuk, Elaine Kulm, Michael Joyce, Adriana A. De Jesus, Raphaela Goldbach-Mansky, Yi-Shan Lee, Marina Cella, Peggy L. Kendall, Mary C. Dinauer, Jeffrey J. Bednarski, Christina Bemrich-Stolz, Scott W. Canna, Shirley M. Abraham, Matthew M. Demczko, Jonathan Powell, Stacie M. Jones, Amy M. Scurlock, Suk See De Ravin, Jack J. Bleesing, James A. Connelly, V. Koneti Rao, Laura G. Schuettepelz a Megan A. Cooper, 2021. Immunodeficiency and bone marrow failure with mosaic and germline TLR8 gain of function. *Blood*. **137**(18), 2450–2462. doi: 10.1182/blood.2020009620
- Blau, Edward B., 1985. Familial granulomatous arthritis, iritis, and rash. *The Journal of pediatrics*. **107**(5), 689–93. doi: 10.1016/s0022-3476(85)80394-2
- Bloomfield, Markéta, Veronika Kanderová, Zuzana Paračková, Petra Vrabcová, Michael Svatoň, Eva Froňková, Martina Fejtková, Radana Zachová, Michal Rataj, Irena Zentsová, Tomáš Milota, Adam Klocperk, Tomáš Kalina a Anna Šedivá, 2018. Utility of Ruxolitinib in a Child with Chronic Mucocutaneous Candidiasis Caused by a Novel STAT1 Gain-of-Function Mutation. *Journal of Clinical Immunology*. **38**(5), 589–601. doi: 10.1007/s10875-018-0519-6
- Bousfiha, Aziz, Leila Jeddane, Capucine Picard, Waleed Al-Herz, Fatima Ailal, Talal Chatila, Charlotte Cunningham-Rundles, Amos Etzioni, Jose Luis Franco, Steven M. Holland, Christoph Klein, Tomohiro Morio, Hans D. Ochs, Eric Oksenhendler, Jennifer Puck, Troy R. Torgerson, Jean-Laurent Casanova, Kathleen E. Sullivan a Stuart G. Tangye, 2020.

Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update of the IUIS Phenotypical Classification. *Journal of Clinical Immunology*. **40**(1), 66–81. doi: 10.1007/s10875-020-00758-x

Brüggemann, Monika, Michaela Kotrová, Henrik Knecht, Jack Bartram, Myriam Boudjogrha, Vojtech Bystry, Grazia Fazio, Eva Froňková, Mathieu Giraud, Andrea Gioni, Jeremy Hancock, Dietrich Herrmann, Cristina Jiménez, Adam Krejci, John Moppett, Tomas Reigl, Mikael Salson, Blanca Scheijen, Martin Schwarz, Simona Songia, Michael Svaton, Jacques J. M. Van Dongen, Patrick Villarese, Stephanie Wakeman, Gary Wright, Giovanni Cazzaniga, Frédéric Davi, Ramón García-Sanz, David Gonzalez, Patricia J. T. A. Groenen, Michael Hummel, Elizabeth A. Macintyre, Kostas Stamatopoulos, Christiane Pott, Jan Trka, Nikos Darzentas a Anton W. Langerak, 2019. Standardized next-generation sequencing of immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations for MRD marker identification in acute lymphoblastic leukaemia; a EuroClonality-NGS validation study. *Leukemia*. **33**(9), 2241–2253. doi: 10.1038/s41375-019-0496-7

Bruton, O. C., 1952. Agammaglobulinemia. *Pediatrics*. **9**(6), 722–727.

Casanova, Jean-Laurent, Mary Ellen Conley, Stephen J Seligman, Laurent Abel a Luigi D Notarangelo, 2014. Guidelines for genetic studies in single patients: lessons from primary immunodeficiencies. *The Journal of Experimental Medicine*. **211**(11), 2137–2149. doi: 10.1084/jem.20140520

Chonat, Satheesh, Mary Risinger, Haripriya Sakthivel, Omar Niss, Jennifer A. Rothman, Loan Hsieh, Stella T. Chou, Janet L. Kwiatkowski, Eugene Khandros, Matthew F. Gorman, Donald T. Wells, Tamara Maghathe, Neha Dagaonkar, Katie G. Seu, Kejian Zhang, Wenying Zhang a Theodosia A. Kalfa, 2019. The Spectrum of SPTA1-Associated Hereditary Spherocytosis. *Frontiers in Physiology*. **10**(July), 1–7. doi: 10.3389/fphys.2019.00815

Damgaard, Rune Busk, Berthe Katrine Fiil, Carsten Speckmann, Monica Yabal, Udo Zur Stadt, Simon Bekker-Jensen, Philipp J. Jost, Stephan Ehl, Niels Mailand a Mads Gyrd-Hansen, 2013. Disease-causing mutations in the XIAP BIR2 domain impair NOD2-dependent immune signalling. *EMBO molecular medicine*. **5**(8), 1278–95. doi: 10.1002/emmm.201303090

De Marcken, Marine, Khushwant Dhaliwal, Ann Caroline Danielsen, Anne Sophie Gautron a Margarita Dominguez-Villar, 2019. TLR7 and TLR8 activate distinct pathways in monocytes

during RNA virus infection. *Science Signaling*. **12**(605), eaaw1347. doi: 10.1126/scisignal.aaw1347

Dixon, K.H., B.C. Lanpher, Jason Chiu, Kristin Kelley a K.H. Cowan, 1994. A novel cDNA restores reduced folate carrier activity and methotrexate sensitivity to transport deficient cells. *Journal of Biological Chemistry*. **269**(1), 17–20. doi: 10.1016/S0021-9258(17)42301-5

Egg, David, Ina Caroline Rump, Noriko Mitsuiki, Jessica Rojas-Restrepo, Maria-Elena Maccari, Charlotte Schwab, Annemarie Gabrysch, Klaus Warnatz, Sigune Goldacker, Virginia Patiño, Daniel Wolff, Satoshi Okada, Seiichi Hayakawa, Yoshiaki Shikama, Kenji Kanda, Kohsuke Imai, Manabu Sotomatsu, Makoto Kuwashima, Takahiro Kamiya, Tomohiro Morio, Kazuaki Matsumoto, Takeshi Mori, Yuri Yoshimoto, Ingunn Dybedal, Maria Kanariou, Zeynep Yesim Kucuk, Hugo Chapdelaine, Lenka Petruzelkova, Hanns-Martin Lorenz, Kathleen E. Sullivan, Jennifer Heimall, Michel Moutschen, Jiri Litzman, Mike Recher, Michael H. Albert, Fabian Hauck, Suranjith Seneviratne, Jana Pachlopnik Schmid, Antonios Kolios, Gary Unglik, Christian Klemann, Scott Snapper, Lisa Giulino-Roth, Michael Svaton, Craig D. Platt, Sophie Hambleton, Olaf Neth, Geraldine Gosse, Steffen Reinsch, Dirk Holzinger, Yae-Jean Kim, Shahrzad Bakhtiar, Faranaz Atschekzei, Reinhold Schmidt, Georgios Sogkas, Shanmuganathan Chandrakasan, William Rae, Beata Derfalvi, Hanne Vibeke Marquart, Ahmet Ozen, Ayca Kiykim, Elif Karakoc-Aydiner, Pavlína Králíčková, Godelieve De Bree, Dimitra Kiritsi, Markus G. Seidel, Robin Kobbe, Jennifer Dantzer, Laia Alsina, Thais Armangue, Vassilios Lougaris, Philipp Agyeman, Sofia Nyström, David Buchbinder, Peter D. Arkwright a Bodo Grimbacher, 2022. Therapeutic options for CTLA-4 insufficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **149**(2), 736–746. doi: 10.1016/j.jaci.2021.04.039

Fischer, Alain, Johan Provot, Jean-Philippe Jais, Alexandre Alcais, Nizar Mahlaoui a Members of the CEREDIH French PID study group, 2017. Autoimmune and inflammatory manifestations occur frequently in patients with primary immunodeficiencies. *The Journal of allergy and clinical immunology*. **140**(5), 1388-1393.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2016.12.978

Flanagan, Sarah E., Ann-Marie Patch a Sian Ellard, 2010. Using SIFT and PolyPhen to Predict Loss-of-Function and Gain-of-Function Mutations. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. **14**(4), 533–537. doi: 10.1089/gtmb.2010.0036

- Goodwin, Sara, John D. McPherson a W. Richard McCombie, 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature reviews. Genetics*. **17**(6), 333–51. doi: 10.1038/nrg.2016.49
- Hadjadj, Jérôme, Nathalie Aladjidi, Helder Fernandes, Guy Leverger, Aude Magérus-Chatinet, Fabienne Mazerolles, Marie-Claude Stolzenberg, Sidonie Jacques, Capucine Picard, Jérémie Rosain, Cécile Fourrage, Sylvain Hanein, Mohammed Zarhrate, Marlène Pasquet, Wadih Abou Chahla, Vincent Barlogis, Yves Bertrand, Isabelle Pellier, Elodie Colomb Bottollier, Fanny Fouyssac, Pascale Blouin, Caroline Thomas, Nathalie Cheikh, Eric Dore, Corinne Pondarre, Dominique Plantaz, Eric Jeziorski, Frédéric Millot, Nicolas Garcelon, Stéphane Ducassou, Yves Perel, Thierry Leblanc, Bénédicte Neven, Alain Fischer a Frédéric Rieux-Laucat, 2019. Pediatric Evans syndrome is associated with a high frequency of potentially damaging variants in immune genes. *Blood*. **134**(1), 9–21. doi: 10.1182/blood-2018-11-887141
- Hershfield, Michael S., Rebecca H. Buckley, Michael L. Greenberg, Alton L. Melton, Richard Schiff, Christine Hatem, Joanne Kurtzberg, M. Louise Markert, Roger H. Kobayashi, Ai Lan Kobayashi a Abraham Abuchowski, 1987. Treatment of Adenosine Deaminase Deficiency with Polyethylene Glycol–Modified Adenosine Deaminase. *New England Journal of Medicine*. **316**(10), 589–596. doi: 10.1056/NEJM198703053161005
- Itan, Yuval, Shen-Ying Zhang, Guillaume Vogt, Avinash Abhyankar, Melina Herman, Patrick Nitschke, Dror Fried, Lluís Quintana-Murci, Laurent Abel a Jean-Laurent Casanova, 2013. The human gene connectome as a map of short cuts for morbid allele discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **110**(14), 5558–5563. doi: 10.1073/pnas.1218167110
- Jouanguy, E, S Lamhamedi-Cherradi, D Lammas, S E Dorman, M C Fondanèche, S Dupuis, R Döffinger, F Altare, J Girdlestone, J F Emile, H Ducoulombier, D Edgar, J Clarke, V a Oxelius, M Brai, V Novelli, K Heyne, A Fischer, S M Holland, D S Kumararatne, R D Schreiber a J L Casanova, 1999. A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nature genetics*. **21**(4), 370–8. doi: 10.1038/7701
- Kalina, Tomas, Marina Bakardjieva, Maartje Blom, Martin Perez-Andres, Barbara Barendregt, Veronika Kanderová, Carolien Bonroy, Jan Philippé, Elena Blanco, Ingrid Pico-

Knijnenburg, Jitse H. M. P. Paping, Beata Wolska-Kuśnierz, Malgorzata Pac, Jakub Tkaczyk, Filomeen Haerynck, Himmet Haluk Akar, Renata Formánková, Tomáš Freiburger, Michael Svatoň, Anna Šedivá, Sonia Arriba-Méndez, Alberto Orfao, Jacques J. M. Van Dongen a Mirjam Van der Burg, 2020. EuroFlow Standardized Approach to Diagnostic Immunophenotyping of Severe PID in Newborns and Young Children. *Frontiers in Immunology*. **11**(March), 1–14. doi: 10.3389/fimmu.2020.00371

Karczewski, Konrad J., Laurent C. Francioli, Grace Tiao, Beryl B. Cummings, Jessica Alföldi, Qingbo Wang, Ryan L. Collins, Kristen M. Laricchia, Andrea Ganna, Daniel P. Birnbaum, Laura D. Gauthier, Harrison Brand, Matthew Solomonson, Nicholas A. Watts, Daniel Rhodes, Moriel Singer-Berk, Eleina M. England, Eleanor G. Seaby, Jack A. Kosmicki, Raymond K. Walters, Katherine Tashman, Yossi Farjoun, Eric Banks, Timothy Poterba, Arcturus Wang, Cotton Seed, Nicola Whiffin, Jessica X. Chong, Kaitlin E. Samocha, Emma Pierce-Hoffman, Zachary Zappala, Anne H. O'Donnell-Luria, Eric Vallabh Minikel, Ben Weisburd, Monkol Lek, James S. Ware, Christopher Vittal, Irina M. Armean, Louis Bergelson, Kristian Cibulskis, Kristen M. Connolly, Miguel Covarrubias, Stacey Donnelly, Steven Ferreira, Stacey Gabriel, Jeff Gentry, Namrata Gupta, Thibault Jeandet, Diane Kaplan, Christopher Llanwarne, Ruchi Munshi, Sam Novod, Nikelle Petrillo, David Roazen, Valentin Ruano-Rubio, Andrea Saltzman, Molly Schleicher, Jose Soto, Kathleen Tibbetts, Charlotte Tolonen, Gordon Wade, Michael E. Talkowski, Carlos A. Aguilar Salinas, Tariq Ahmad, Christine M. Albert, Diego Ardissino, Gil Atzmon, John Barnard, Laurent Beaugerie, Emelia J. Benjamin, Michael Boehnke, Lori L. Bonnycastle, Erwin P. Bottinger, Donald W. Bowden, Matthew J. Bown, John C. Chambers, Juliana C. Chan, Daniel Chasman, Judy Cho, Mina K. Chung, Bruce Cohen, Adolfo Correa, Dana Dabelea, Mark J. Daly, Dawood Darbar, Ravindranath Duggirala, José Dupuis, Patrick T. Ellinor, Roberto Elosua, Jeanette Erdmann, Tõnu Esko, Martti Färkkilä, Jose Florez, Andre Franke, Gad Getz, Benjamin Glaser, Stephen J. Glatt, David Goldstein, Clicerio Gonzalez, Leif Groop, Christopher Haiman, Craig Hanis, Matthew Harms, Mikko Hiltunen, Matti M. Holi, Christina M. Hultman, Mikko Kallela, Jaakko Kaprio, Sekar Kathiresan, Bong-Jo Kim, Young Jin Kim, George Kirov, Jaspal Kooner, Seppo Koskinen, Harlan M. Krumholz, Subra Kugathasan, Soo Heon Kwak, Markku Laakso, Terho Lehtimäki, Ruth J. F. Loos, Steven A. Lubitz, Ronald C. W. Ma, Daniel G. MacArthur, Jaume Marrugat, Kari M. Mattila, Steven McCarroll, Mark I. McCarthy, Dermot McGovern, Ruth McPherson, James B. Meigs, Olle

- Melander, Andres Metspalu, Benjamin M. Neale, Peter M. Nilsson, Michael C. O'Donovan, Dost Ongur, Lorena Orozco, Michael J. Owen, Colin N. A. Palmer, Aarno Palotie, Kyong Soo Park, Carlos Pato, Ann E. Pulver, Nazneen Rahman, Anne M. Remes, John D. Rioux, Samuli Ripatti, Dan M. Roden, Danish Saleheen, Veikko Salomaa, Nilesh J. Samani, Jeremiah Scharf, Heribert Schunkert, Moore B. Shoemaker, Pamela Sklar, Hilkka Soininen, Harry Sokol, Tim Spector, Patrick F. Sullivan, Jaana Suvisaari, E. Shyong Tai, Yik Ying Teo, Tuomi Tiinamaija, Ming Tsuang, Dan Turner, Teresa Tusie-Luna, Erkki Vartiainen, Marquis P. Vawter, James S. Ware, Hugh Watkins, Rinse K. Weersma, Maija Wessman, James G. Wilson, Ramnik J. Xavier, Benjamin M. Neale, Mark J. Daly a Daniel G. MacArthur, 2020. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*. **581**(7809), 434–443. doi: 10.1038/s41586-020-2308-7
- Kircher, Martin, Daniela M Witten, Preti Jain, Brian J O'Roak, Gregory M Cooper a Jay Shendure, 2014. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nature genetics*. **46**(3), 310–315. doi: 10.1038/ng.2892
- Koboldt, Daniel C., Qunyuan Zhang, David E. Larson, Dong Shen, Michael D. McLellan, Ling Lin, Christopher A. Miller, Elaine R. Mardis, Li Ding a Richard K. Wilson, 2012. VarScan 2: Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Research*. **22**(3), 568–576. doi: 10.1101/gr.129684.111
- Kofoed, Eric M., Vivian Hwa, Brian Little, Katie A. Woods, Caroline K. Buckway, Junko Tsubaki, Katherine L. Pratt, Liliana Bezrodnik, Hector Jasper, Alejandro Tepper, Juan J. Heinrich a Ron G. Rosenfeld, 2003. Growth Hormone Insensitivity Associated with a STAT5b Mutation. *New England Journal of Medicine*. **349**(12), 1139–1147. doi: 10.1056/NEJMoa022926
- Kumar, Prateek, Steven Henikoff a Pauline C. Ng, 2009. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols*. **4**(7), 1073–1081. doi: 10.1038/nprot.2009.86
- Landrum, Melissa J., Jennifer M. Lee, Mark Benson, Garth R. Brown, Chen Chao, Shanmuga Chitipiralla, Baoshan Gu, Jennifer Hart, Douglas Hoffman, Wonhee Jang, Karen Karapetyan, Kenneth Katz, Chunlei Liu, Zenith Maddipatla, Adriana Malheiro, Kurt McDaniel, Michael Ovetsky, George Riley, George Zhou, J Bradley Holmes, Brandi L. Kattman a Donna R.

- Maglott, 2018. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Research*. **46**(D1), D1062–D1067. doi: 10.1093/nar/gkx1153
- Li, Heng a Richard Durbin, 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. **25**(14), 1754–1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324
- Li, Heng, Bob Handsaker, Alec Wysoker, Tim Fennell, Jue Ruan, Nils Homer, Gabor Marth, Goncalo Abecasis a Richard Durbin, 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. **25**(16), 2078–2079. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352
- Liu, Xiang Y., Teah L. Witt a Larry H. Matherly, 2003. Restoration of high-level transport activity by human reduced folate carrier/ThTr1 thiamine transporter chimaeras: role of the transmembrane domain 6/7 linker region in reduced folate carrier function. *Biochemical Journal*. **369**(1), 31–37. doi: 10.1042/bj20020419
- Lo, Bernice, Kejian Zhang, Wei Lu, Lixin Zheng, Qian Zhang, Chrysi Kanellopoulou, Yu Zhang, Zhiduo Liu, Jill M. Fritz, Rebecca Marsh, Ammar Husami, Diane Kissell, Shannon Nortman, Vijaya Chaturvedi, Hilary Haines, Lisa R. Young, Jun Mo, Alexandra H. Filipovich, Jack J. Bleesing, Peter Mustillo, Michael Stephens, Cesar M. Rueda, Claire A. Chougnet, Kasper Hoebe, Joshua McElwee, Jason D. Hughes, Elif Karakoc-Aydiner, Helen F. Matthews, Susan Price, Helen C. Su, V. Koneti Rao, Michael J. Lenardo a Michael B. Jordan, 2015. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science*. **349**(6246), 436–440. doi: 10.1126/science.aaa1663
- Meyts, Isabelle, Barbara Bosch, Alexandre Bolze, Bertrand Boisson, Yuval Itan, Aziz Belkadi, Vincent Pedergnana, Leen Moens, Capucine Picard, Aurélie Cobat, Xavier Bossuyt, Laurent Abel a JeanLaurent Casanova, 2016. Exome and genome sequencing for inborn errors of immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **138**(4), 957–969. doi: 10.1016/j.jaci.2016.08.003
- Miano, Maurizio, Daniela Guardo, Alice Grossi, Elena Palmisani, Francesca Fioredda, Paola Terranova, Enrico Cappelli, Michela Lupia, Monica Traverso, Gianluca Dell’Orso, Fabio Corsolini, Andrea Beccaria, Marina Lanciotti, Isabella Ceccherini a Carlo Dufour, 2022. Underlying Inborn Errors of Immunity in Patients With Evans Syndrome and Multilineage Cytopenias: A Single-Centre Analysis. *Frontiers in Immunology*. **13**(May). doi: 10.3389/fimmu.2022.869033

- Miceli-Richard, Corinne, Suzanne Lesage, Michel Rybojad, Anne Marie Prieur, Sylvie Manouvrier-Hanu, Renate Häfner, Mathias Chamailard, Habib Zouali, Gilles Thomas a Jean Pierre Hugot, 2001. CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nature genetics*. **29**(1), 19–20. doi: 10.1038/ng720
- Milner, Joshua D., Tiphonie P. Vogel, Lisa Forbes, Chi A. Ma, Asbjørg Stray-Pedersen, Julie E. Niemela, Jonathan J. Lyons, Karin R. Engelhardt, Yu Zhang, Nermina Topcagic, Elisha D O Roberson, Helen Matthews, James W. Verbsky, Trivikram Dasu, Alexander Vargas-Hernandez, Nidhy Varghese, Kenneth L. McClain, Lina B. Karam, Karen Nahmod, George Makedonas, Emily M. Mace, Hanne S. Sorte, Gøri Perminow, V. Koneti Rao, Michael P O’Connell, Susan Price, Helen C. Su, Morgan Butrick, Joshua McElwee, Jason D. Hughes, Joseph Willet, David Swan, Yaobo Xu, Mauro Santibanez-Koref, Voytek Slowik, Darrell L. Dinwiddie, Christina E. Ciaccio, Carol J. Saunders, Seth Septer, Stephen F. Kingsmore, Andrew J. White, Andrew J. Cant, Sophie Hambleton a Megan A. Cooper, 2015. Early-onset lymphoproliferation and autoimmunity caused by germline STAT3 gain-of-function mutations. *Blood*. **125**(4), 591–9. doi: 10.1182/blood-2014-09-602763
- Minegishi, Yoshiyuki, Masako Saito, Shigeru Tsuchiya, Ikuya Tsuge, Hidetoshi Takada, Toshiro Hara, Nobuaki Kawamura, Tadashi Ariga, Srdjan Pasic, Oliver Stojkovic, Ayse Metin a Hajime Karasuyama, 2007. Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature*. **448**(7157), 1058–62. doi: 10.1038/nature06096
- Narumi, Satoshi, Naoko Amano, Tomohiro Ishii, Noriyuki Katsumata, Koji Muroya, Masanori Adachi, Katsuaki Toyoshima, Yukichi Tanaka, Ryuji Fukuzawa, Kenichi Miyako, Saori Kinjo, Shouichi Ohga, Kenji Ihara, Hirosuke Inoue, Tadamune Kinjo, Toshiro Hara, Miyuki Kohno, Shiro Yamada, Hironaka Urano, Yosuke Kitagawa, Koji Tsugawa, Asumi Higa, Masakazu Miyawaki, Takahiro Okutani, Zenro Kizaki, Hiroyuki Hamada, Minako Kihara, Kentaro Shiga, Tetsuya Yamaguchi, Manabu Kenmochi, Hiroyuki Kitajima, Maki Fukami, Atsushi Shimizu, Jun Kudoh, Shinsuke Shibata, Hideyuki Okano, Noriko Miyake, Naomichi Matsumoto a Tomonobu Hasegawa, 2016. SAMD9 mutations cause a novel multisystem disorder, MIRAGE syndrome and are associated with loss of chromosome 7. *Nature Genetics*. **48**(7), 792–797. doi: 10.1038/ng.3569
- Notarangelo, Luigi D., Rosa Bacchetta, Jean Laurent Casanova a Helen C. Su, 2020. Human

inborn errors of immunity: An expanding universe. *Science Immunology*. **5**(49). doi: 10.1126/sciimmunol.abb1662

Qiu, Andong, Michaela Jansen, Antoinette Sakaris, Sang Hee Min, Shrikanta Chattopadhyay, Eugenia Tsai, Claudio Sandoval, Rongbao Zhao, Myles H. Akabas a I. David Goldman, 2006. Identification of an Intestinal Folate Transporter and the Molecular Basis for Hereditary Folate Malabsorption. *Cell*. **127**(5), 917–928. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.041

Richards, Sue, Nazneen Aziz, Sherri Bale, David Bick, Soma Das, Julie Gastier-Foster, Wayne W. Grody, Madhuri Hegde, Elaine Lyon, Elaine Spector, Karl Voelkerding a Heidi L. Rehm, 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*. **17**(5), 405–423. doi: 10.1038/gim.2015.30

Rose, C. D., Steven Pans, Ingele Casteels, Jordi Anton, Brigitte Bader-Meunier, Philippe Brissaud, Roland Cimaz, Graciella Espada, Jorge Fernandez-Martin, Eric Hachulla, Miroslav Harjacek, Raju Khubchandani, Friederike Mackensen, Rosa Merino, Antonio Naranjo, Sheila Oliveira-Knupp, Christine Pajot, Ricardo Russo, C. Thomee, Sebastiaan Vastert, Nico Wulffraat, Juan I. Arostegui, Kevin P. Foley, John Bertin a Carine H. Wouters, 2015. Blau syndrome: cross-sectional data from a multicentre study of clinical, radiological and functional outcomes. *Rheumatology*. **54**(6), 1008–1016. doi: 10.1093/rheumatology/keu437

Salzer, U, H M Chapel, A D B Webster, Q Pan-Hammarström, A Schmitt-Graeff, M Schlesier, H H Peter, J K Rockstroh, P Schneider, A A Schäffer, L Hammarström a B Grimbacher, 2005. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nature Genetics*. **37**(8), 820–828. doi: 10.1038/ng1600

Schrezenmeier, Eva a Thomas Dörner, 2020. Mechanisms of action of hydroxychloroquine and chloroquine: implications for rheumatology. *Nature Reviews Rheumatology*. **16**(3), 155–166. doi: 10.1038/s41584-020-0372-x

Schubert, Desirée, Claudia Bode, Rupert Kenefeck, Tie Zheng Hou, James B Wing, Alan Kennedy, Alla Bulashevskaya, Britt-Sabina Petersen, Alejandro A Schäffer, Björn A Grüning, Susanne Unger, Natalie Frede, Ulrich Baumann, Torsten Witte, Reinhold E Schmidt, Gregor Dueckers, Tim Niehues, Suranjith Seneviratne, Maria Kanariou, Carsten Speckmann,

- Stephan Ehl, Anne Rensing-Ehl, Klaus Warnatz, Mirzokhid Rakhmanov, Robert Thimme, Peter Hasselblatt, Florian Emmerich, Toni Cathomen, Rolf Backofen, Paul Fisch, Maximilian Seidl, Annette May, Annette Schmitt-Graeff, Shinji Ikemizu, Ulrich Salzer, Andre Franke, Shimon Sakaguchi, Lucy S K Walker, David M Sansom a Bodo Grimbacher, 2014. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nature medicine*. **20**(12), 1410–6. doi: 10.1038/nm.3746
- Sobreira, Nara, François Schiettecatte, David Valle a Ada Hamosh, 2015. GeneMatcher: A Matching Tool for Connecting Investigators with an Interest in the Same Gene. *Hum Mutat*. **36**, 928–930. doi: 10.1002/humu.22844.GeneMatcher
- Steinfeld, Robert, Marcel Grapp, Ralph Kraetzner, Steffi Dreha-Kulaczewski, Gunther Helms, Peter Dechent, Ron Wevers, Salvatore Grosso a Jutta Gärtner, 2009. Folate Receptor Alpha Defect Causes Cerebral Folate Transport Deficiency: A Treatable Neurodegenerative Disorder Associated with Disturbed Myelin Metabolism. *American Journal of Human Genetics*. **85**(3), 354–363. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.08.005
- Stray-Pedersen, Asbjørg, Hanne Sørmo Sorte, Pubudu Samarakoon, Tomasz Gambin, Ivan K. Chinn, Zeynep H. Coban Akdemir, Hans Christian Erichsen, Lisa R. Forbes, Shen Gu, Bo Yuan, Shalini N. Jhangiani, Donna M. Muzny, Olaug Kristin Rødningen, Ying Sheng, Sarah K. Nicholas, Lenora M. Noroski, Filiz O. Seeborg, Carla M. Davis, Debra L. Canter, Emily M. Mace, Timothy J. Vece, Carl E. Allen, Harshal A. Abhyankar, Philip M. Boone, Christine R. Beck, Wojciech Wiszniewski, Børre Fevang, Pål Aukrust, Geir E. Tjønnfjord, Tobias Gedde-Dahl, Henrik Hjorth-Hansen, Ingunn Dybedal, Ingvild Nordøy, Silje F. Jørgensen, Tore G. Abrahamsen, Torstein Øverland, Anne Grete Bechensteen, Vegard Skogen, Liv T.N. Osnes, Mari Ann Kulseth, Trine E. Prescott, Cecilie F. Rustad, Ketil R. Heimdal, John W. Belmont, Nicholas L. Rider, Javier Chinen, Tram N. Cao, Eric A. Smith, Maria Soledad Caldirola, Liliana Bezrodnik, Saul Oswaldo Lugo Reyes, Francisco J. Espinosa Rosales, Nina Denisse Guerrero-Cursaru, Luis Alberto Pedroza, Cecilia M. Poli, Jose L. Franco, Claudia M. Trujillo Vargas, Juan Carlos Aldave Becerra, Nicola Wright, Thomas B. Issekutz, Andrew C. Issekutz, Jordan Abbott, Jason W. Caldwell, Diana K. Bayer, Alice Y. Chan, Alessandro Aiuti, Caterina Cancrini, Eva Holmberg, Christina West, Magnus Burstedt, Ender Karaca, Gözde Yesil, Hasibe Artac, Yavuz Bayram, Mehmed Musa Atik, Mohammad K. Eldomery, Mohammad S. Ehlayel, Stephen Jolles, Berit Flatø, Alison A. Bertuch, I.

- Celine Hanson, Victor W. Zhang, Lee-Jun Wong, Jianhong Hu, Magdalena Walkiewicz, Yaping Yang, Christine M. Eng, Eric Boerwinkle, Richard A. Gibbs, William T. Shearer, Robert Lyle, Jordan S. Orange a James R. Lupski, 2017. Primary immunodeficiency diseases: Genomic approaches delineate heterogeneous Mendelian disorders. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **139**(1), 232–245. doi: 10.1016/j.jaci.2016.05.042
- Talevich, Eric, A. Hunter Shain, Thomas Botton a Boris C. Bastian, 2016. CNVkit: Genome-Wide Copy Number Detection and Visualization from Targeted DNA Sequencing. *PLoS computational biology*. **12**(4), e1004873. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004873
- Tangye, Stuart G., Waleed Al-Herz, Aziz Bousfiha, Talal Chatila, Charlotte Cunningham-Rundles, Amos Etzioni, Jose Luis Franco, Steven M. Holland, Christoph Klein, Tomohiro Morio, Hans D. Ochs, Eric Oksenhendler, Capucine Picard, Jennifer Puck, Troy R. Torgerson, Jean-Laurent Casanova a Kathleen E. Sullivan, 2020. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *Journal of Clinical Immunology*. **40**(1), 24–64. doi: 10.1007/s10875-019-00737-x
- Tangye, Stuart G, Waleed Al-Herz, Aziz Bousfiha, Charlotte Cunningham-Rundles, Jose Luis Franco, Steven M Holland, Christoph Klein, Tomohiro Morio, Eric Oksenhendler, Capucine Picard, Anne Puel, Jennifer Puck, Mikko R. J. Seppänen, Raz Somech, Helen C Su, Kathleen E. Sullivan, Troy R. Torgerson a Isabelle Meyts, 2021. The Ever-Increasing Array of Novel Inborn Errors of Immunity: an Interim Update by the IUIS Committee. *Journal of Clinical Immunology*. **41**(3), 666–679. doi: 10.1007/s10875-021-00980-1
- Warnatz, Klaus, Ulrich Salzer, Marta Rizzi, Beate Fischer, Sylvia Gutenberger, Joachim Böhm, Anne-Kathrin Kienzler, Qiang Pan-Hammarström, Lennart Hammarström, Mirzokhid Rakhmanov, Michael Schlesier, Bodo Grimbacher, Hans-Hartmut Peter a Hermann Eibel, 2009. B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **106**(33), 13945–13950. doi: 10.1073/pnas.0903543106
- Whetstine, Johnathan R., Teah L. Witt a Larry H. Matherly, 2002. The human reduced folate carrier gene is regulated by the AP2 and Sp1 transcription factor families and a functional 61-base pair polymorphism. *Journal of Biological Chemistry*. **277**(46), 43873–43880. doi:

10.1074/jbc.M208296200

- Wolgast, Lucia R., Linda A. Cannizzarro, K. H. Ramesh, Xiaonan Xue, Dan Wang, Pritish K. Bhattacharyya, Jerald Z. Gong, Christine McMahon, Joseph M. Albanese, Jaya L. Sunkara a Howard Ratech, 2011. Spectrin isoforms: differential expression in normal hematopoiesis and alterations in neoplastic bone marrow disorders. *American journal of clinical pathology*. **136**(2), 300–8. doi: 10.1309/AJCPSA5RNM9IGFJF
- Yeo, Gene a Christopher B. Burge, 2004. Maximum Entropy Modeling of Short Sequence Motifs with Applications to RNA Splicing Signals. *Journal of Computational Biology*. **11**(2–3), 377–394. doi: 10.1089/1066527041410418
- Zhao, R, I G Sharina a I D Goldman, 1999. Pattern of mutations that results in loss of reduced folate carrier function under antifolate selective pressure augmented by chemical mutagenesis. *Molecular pharmacology*. **56**(1), 68–76.
- Zhao, Rongbao, Robert G. Russell, Yanhua Wang, Laibin Liu, Feng Gao, Burkhard Kneitz, Winfried Edelmann a I. David Goldman, 2001. Rescue of Embryonic Lethality in Reduced Folate Carrier-deficient Mice by Maternal Folic Acid Supplementation Reveals Early Neonatal Failure of Hematopoietic Organs. *Journal of Biological Chemistry*. **276**(13), 10224–10228. doi: 10.1074/jbc.C000905200

10. Přílohy

Příloha 1

Sediva H, Dusatkova P, Kanderova V, Obermannova B, Kayserova J, Sramkova L, Zemkova D, Elblova L, **Svaton M**, Zachova R, Kolouskova S, Fronkova E, Sumnik Z, Sediva A, Lebl J, Pruhova S. Short Stature in a Boy with Multiple Early-Onset Autoimmune Conditions due to a *STAT3* Activating Mutation: Could Intracellular Growth Hormone Signalling Be Compromised? *Horm Res Paediatr*. 2017;88(2):160-166. doi: 10.1159/000456544. [IF 1.844]
Autorský podíl: Analýza genetických dat, identifikace patogenní mutace a predikce jejího funkčního dopadu, vyšetření segregace mutace, vyšetření genové exprese, analýza sestřihu pre-mRNA, příprava odpovídajících částí manuskriptu.

Příloha 2

Svaton M*, Skvarova Kramarzova K*, Kanderova V, Mancikova A, Smisek P, Jesina P, Krijt J, Stiburkova B, Dobrovolny R, Sokolova J, Bakardjieva-Mihaylova V, Vodickova E, Rackova M, Stuchly J, Kalina T, Sary J, Trka J, Fronkova E*, Kozich V*. A homozygous deletion in the *SLC19A1* gene as a cause of folate-dependent recurrent megaloblastic anemia. *Blood*. 2020 Jun 25;135(26):2427-2431. doi: 10.1182/blood.2019003178. [IF 23.629]
Autorský podíl: Analýza genetických dat, identifikace patogenní mutace a predikce jejího funkčního dopadu, hypotéza patogenetického mechanismu onemocnění a návrh provedených experimentů a vyšetření, vyšetření segregace mutace, genetická analýza geneticky modifikovaných buněčných linií, analýza a zpracování klinických dat, příprava publikace a revizí publikace, recenzní řízení.

Příloha 3

Svaton M, Sukova M, Sedlacek P, Skotnicova A, Vodickova E, van Wijk R, Divoka M, Mojzickova R, Kalina T, Trka J, Fronkova E, Sary J. Hydrops fetalis and failure of hematopoietic stem cell transplantation - A long route to the diagnosis of *SPTA1*-associated hereditary spherocytosis. *Blood Cells Mol Dis*. 2022 Jul;95:102664. doi: 10.1016/j.bcmd.2022.102664. [IF 3.039]
Autorský podíl: Analýza genetických dat, identifikace patogenních mutací a predikce jejich funkčního dopadu, vyšetření segregace mutace, návrh experimentů, analýza sestřihu pre-mRNA a amplikonové sekvenování, příprava publikace a revizí publikace, recenzní řízení.

Příloha 4

Fejtikova M, Sukova M, Hlozkova K, Skvarova Kramarzova K, Rackova M, Jakubec D, Bakardjieva M, Bloomfield M, Klocperk A, Parackova Z, Sediva A, Aluri J, Novakova M, Kalina T, Fronkova E, Hrusak O, Malcova H, Sedlacek P, Liba Z, Kudr M, Sary J, Cooper MA, **Svaton M***, Kanderova V*. TLR8/TLR7 dysregulation due to a novel TLR8 mutation causes severe autoimmune hemolytic anemia and autoinflammation in identical twins. *Am J Hematol*. 2022 Mar 1;97(3):338-351. doi: 10.1002/ajh.26452. [IF 10.047]

Autorský podíl: Analýza genetických dat, identifikace patogenní mutace a predikce jejího funkčního dopadu, hypotéza patogenetického mechanismu onemocnění a návrh provedených experimentů, vyšetření segregace mutace, vyšetření repertoáru T-lymfocytů, analýza a zpracování klinických dat, příprava publikace a revizí publikace, recenzní řízení.

Příloha 5

Formankova R, Kanderova V, Rackova M, **Svaton M**, Brdicka T, Riha P, Keslova P, Mejstrikova E, Zaliova M, Freiburger T, Grombirikova H, Zemanova Z, Vlkova M, Fencel F, Copova I, Bronsky J, Jabandziev P, Sedlacek P, Soukalova J, Zapletal O, Sary J, Trka J, Kalina T, Skvarova Kramarzova K, Hlavackova E, Litzman J, Fronkova E. Novel SAMD9 Mutation in a Patient With Immunodeficiency, Neutropenia, Impaired Anti-CMV Response, and Severe Gastrointestinal Involvement. *Front Immunol*. 2019 Sep 18;10:2194. doi: 10.3389/fimmu.2019.02194. [IF 5.085]

Autorský podíl: Analýza genetických dat, identifikace patogenní mutace a predikce jejího funkčního dopadu, vyšetření segregace mutace, příprava odpovídajících částí manuskriptu.

Příloha 6

Parackova Z, Milota T, Vrabцова P, Smetanova J, **Svaton M**, Freiburger T, Kanderova V, Sediva A. Novel XIAP mutation causing enhanced spontaneous apoptosis and disturbed NOD2 signalling in a patient with atypical adult-onset Crohn's disease. *Cell Death Dis*. 2020 Jun 8;11(6):430. doi: 10.1038/s41419-020-2652-4. [IF 8.469]

Autorský podíl: Analýza genetických dat, identifikace patogenní mutace a predikce jejího funkčního dopadu, příprava odpovídajících částí manuskriptu.

Příloha 7

Parackova Z, Bloomfield M, Vrabцова P, Zentsova I, Klocperk A, Milota T, **Svaton M**, Casanova JL, Bustamante J, Fronkova E, Sediva A. Mutual alteration of NOD2-associated Blau syndrome and IFN γ R1 deficiency. J Clin Immunol. 2020 Jan;40(1):165-178. doi: 10.1007/s10875-019-00720-6. [IF 8.317]

Autorský podíl: Analýza genetických dat, identifikace patogenních mutací a predikce jejich funkčního dopadu a vzájemné interakce, vyšetření segregace mutací, příprava odpovídajících částí manuskriptu.

11. Další publikace autora

Publikace, které s tématem práce souvisí pouze okrajově nebo částečně

Fronkova E, Svaton M, Trka J. Quality Control for IG/TR Marker Identification and MRD Analysis. *Methods Mol Biol.* 2022;2453:91-99. doi: 10.1007/978-1-0716-2115-8_6. [IF 1.37]

Jakša R, Karolová J, Svatoň M, Kazantsev D, Grajciarová M, Pokorná E, Tonar Z, Klánová M, Winkowska L, Maláriková D, Vočková P, Forsterová K, Renešová N, Dolníková A, Nožičková K, Dundr P, Froňková E, Trněný M, Klener P. Complex genetic and histopathological study of 15 patient-derived xenografts of aggressive lymphomas. *Lab Invest.* 2022 Apr 29. doi: 10.1038/s41374-022-00784-w. [IF 5.662]

Kanderova V, Svobodova T, Borna S, Fejtкова M, Martinu V, Paderova J, Svaton M, Kralova J, Fronkova E, Klocperk A, Pruhova S, Lee-Kirsch MA, Hornofova L, Koblizek M, Novak P, Zimmermannova O, Parackova Z, Sediva A, Kalina T, Janda A, Kayserova J, Dvorakova M, Macek M, Pohunek P, Sedlacek P, Poh A, Ernst M, Brdicka T, Hrusak O, Lebl J. Early-onset pulmonary and cutaneous vasculitis driven by constitutively active SRC-family kinase HCK. *J Allergy Clin Immunol.* 2022 Apr;149(4):1464-1472.e3. doi: 10.1016/j.jaci.2021.07.046. [IF 10.739]

Egg D, Rump IC, Mitsuiki N, Rojas-Restrepo J, Maccari ME, Schwab C, Gabrysch A, Warnatz K, Goldacker S, Patiño V, Wolff D, Okada S, Hayakawa S, Shikama Y, Kanda K, Imai K, Sotomatsu M, Kuwashima M, Kamiya T, Morio T, Matsumoto K, Mori T, Yoshimoto Y, Dybedal I, Kanariou M, Kucuk ZY, Chapdelaine H, Petruzelkova L, Lorenz HM, Sullivan KE, Heimal J, Moutschen M, Litzman J, Recher M, Albert MH, Hauck F, Seneviratne S, Pachlöpnik Schmid J, Kolios A, Unglik G, Klemann C, Snapper S, Giulino-Roth L, Svaton M, Platt CD, Hambleton S, Neth O, Gosse G, Reinsch S, Holzinger D, Kim YJ, Bakhtiar S, Atschekzei F, Schmidt R, Sogkas G, Chandrakasan S, Rae W, Derfalvi B, Marquart HV, Ozen A, Kiykim A, Karakoc-Aydiner E, Králíčková P, de Bree G, Kiritsi D, Seidel MG, Kobbe R, Dantzer J, Alsina L, Armangue T, Lougaris V, Agyeman P, Nyström S, Buchbinder D, Arkwright PD, Grimbacher B. Therapeutic options for CTLA-4 insufficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2022 Feb;149(2):736-746. doi: 10.1016/j.jaci.2021.04.039. [IF 10.739]

Malarikova D, Berkova A, Obr A, Blahovcova P, Svaton M, Forsterova K, Kriegova E, Prihodova E, Pavlistova L, Petrackova A, Zemanova Z, Trneny M, Klener P. Concurrent TP53 and CDKN2A Gene Aberrations in Newly Diagnosed Mantle Cell Lymphoma Correlate with Chemoresistance and Call for Innovative Upfront Therapy. *Cancers (Basel)*. 2020 Jul 31;12(8):2120. doi: 10.3390/cancers12082120. **[IF 6.639]**

Vockova P, Svaton M, Karolova J, Pokorna E, Vokurka M, Klener P. Anti-CD38 Therapy with Daratumumab for Relapsed/Refractory CD20-Negative Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Folia Biol (Praha)*. 2020;66(1):17-23. **[IF 0.906]**

Kalina T, Bakardjieva M, Blom M, Perez-Andres M, Barendregt B, Kanderová V, Bonroy C, Philippé J, Blanco E, Pico-Knijnenburg I, Paping JHMP, Wolska-Kuśnierz B, Pac M, Tkaczyk J, Haerynck F, Akar HH, Formánková R, Freiburger T, Svatoň M, Šedivá A, Arriba-Méndez S, Orfao A, van Dongen JJM, van der Burg M. EuroFlow Standardized Approach to Diagnostic Immunophenotyping of Severe PID in Newborns and Young Children. *Front Immunol*. 2020 Mar 19;11:371. doi: 10.3389/fimmu.2020.00371. **[IF 7.561]**

Lemm EA, Valle-Argos B, Smith LD, Richter J, Gebreselassie Y, Carter MJ, Karolova J, Svaton M, Helman K, Weston-Bell NJ, Karydis L, Williamson CT, Lenz G, Pettigrew J, Harwig C, Stevenson FK, Cragg M, Forconi F, Steele AJ, Cross J, Mackenzie L, Klener P, Packham G. Preclinical Evaluation of a Novel SHIP1 Phosphatase Activator for Inhibition of PI3K Signaling in Malignant B Cells. *Clin Cancer Res*. 2020 Apr 1;26(7):1700-1711. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-2202. **[IF 12.531]**

Stranavova L, Pelak O, Svaton M, Hrubá P, Fronkova E, Slavcev A, Osickova K, Maluskova J, Hubacek P, Froněk J, Reinke P, Volk HD, Kalina T, Viklicky O. Heterologous Cytomegalovirus and Allo-Reactivity by Shared T Cell Receptor Repertoire in Kidney Transplantation. *Front Immunol*. 2019 Oct 31;10:2549. doi: 10.3389/fimmu.2019.02549. **[IF 5.085]**

Bakardjieva-Mihaylova V, Skvarova Kramarzova K, Slamova M, Svaton M, Rejlova K, Zaliova M, Dobiasova A, Fiser K, Stuchly J, Grega M, Rosova B, Zachoval R, Klezl P, Eis V, Kindlova E, Buchler T, Trka J, Boublikova L. Molecular Basis of Cisplatin Resistance in Testicular Germ Cell Tumors. *Cancers (Basel)*. 2019 Sep 6;11(9):1316. doi: 10.3390/cancers11091316. **[IF 6.126]**

Strakova V, Elblova L, Johnson MB, Dusatkova P, Obermannova B, Petruzelkova L, Kolouskova S, Snajderova M, Fronkova E, Svaton M, Lebl J, Hattersley AT, Sumnik Z, Pruhova S. Screening of monogenic autoimmune diabetes among children with type 1 diabetes and multiple autoimmune diseases: is it worth doing? *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2019 Oct 25;32(10):1147-1153. doi: 10.1515/jpem-2019-0261. **[IF 1.278]**

Brüggemann M, Kotrová M, Knecht H, Bartram J, Boudjogrha M, Bystry V, Fazio G, Froňková E, Giraud M, Grioni A, Hancock J, Herrmann D, Jiménez C, Krejci A, Moppett J, Reigl T, Salson M, Scheijen B, Schwarz M, Songia S, Svaton M, van Dongen JJM, Villarese P, Wakeman S, Wright G, Cazzaniga G, Davi F, García-Sanz R, Gonzalez D, Groenen PJTA, Hummel M, Macintyre EA, Stamatopoulos K, Pott C, Trka J, Darzentas N, Langerak AW; EuroClonality-NGS working group. Standardized next-generation sequencing of immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations for MRD marker identification in acute lymphoblastic leukaemia; a EuroClonality-NGS validation study. *Leukemia.* 2019 Sep;33(9):2241-2253. doi: 10.1038/s41375-019-0496-7. **[IF 8.665]**

Knecht H, Reigl T, Kotrová M, Appelt F, Stewart P, Bystry V, Krejci A, Grioni A, Pal K, Stranska K, Plevova K, Rijntjes J, Songia S, Svatoň M, Froňková E, Bartram J, Scheijen B, Herrmann D, García-Sanz R, Hancock J, Moppett J, van Dongen JJM, Cazzaniga G, Davi F, Groenen PJTA, Hummel M, Macintyre EA, Stamatopoulos K, Trka J, Langerak AW, Gonzalez D, Pott C, Brüggemann M, Darzentas N; EuroClonality-NGS Working Group. Quality control and quantification in IG/TR next-generation sequencing marker identification: protocols and bioinformatic functionalities by EuroClonality-NGS. *Leukemia.* 2019 Sep;33(9):2254-2265. doi: 10.1038/s41375-019-0499-4. **[IF 8.665]**

Prukova D, Andera L, Nahacka Z, Karolova J, Svaton M, Klanova M, Havranek O, Soukup J, Svobodova K, Zemanova Z, Tuskova D, Pokorna E, Helman K, Forsterova K, Pacheco-Blanco M, Vockova P, Berkova A, Fronkova E, Trneny M, Klener P. Cotargeting of BCL2 with Venetoclax and MCL1 with S63845 Is Synthetically Lethal In Vivo in Relapsed Mantle Cell Lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2019 Jul 15;25(14):4455-4465. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3275. **[IF 10.107]**

Kralickova P, Milota T, Litzman J, Malkusova I, Jilek D, Petanova J, Vydlakova J, Zimulova A, Fronkova E, Svaton M, Kanderova V, Bloomfield M, Parackova Z, Klocperk A, Haviger J, Kalina T, Sediva A. CVID-Associated Tumors: Czech Nationwide Study Focused on Epidemiology, Immunology, and Genetic Background in a Cohort of Patients With CVID. *Front Immunol*. 2019 Jan 22;9:3135. doi: 10.3389/fimmu.2018.03135. **[IF 5.085]**

Bloomfield M, Kanderová V, Paračková Z, Vrabcová P, Svatoň M, Froňková E, Fejtková M, Zachová R, Rataj M, Zentsová I, Milota T, Klocperk A, Kalina T, Šedivá A. Utility of Ruxolitinib in a Child with Chronic Mucocutaneous Candidiasis Caused by a Novel STAT1 Gain-of-Function Mutation. *J Clin Immunol*. 2018 Jul;38(5):589-601. doi: 10.1007/s10875-018-0519-6. **[IF 4.128]**

Froňková E, Klocperk A, Svatoň M, Nováková M, Kotrová M, Kayserová J, Kalina T, Keslová P, Votava F, Vinohradská H, Freiburger T, Mejstříková E, Trka J, Sedivá A. The TREC/KREC assay for the diagnosis and monitoring of patients with DiGeorge syndrome. *PLoS One*. 2014 Dec 8;9(12):e114514. doi: 10.1371/journal.pone.0114514. **[IF 3.234]**