

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát dizertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

Patofyziologické a klinické aspekty Danonovy nemoci u žen

MUDr. Jiří Gurka

Praha, 2026

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc. MBA

Školící pracoviště: Fyziologický ústav 1. LF UK

Školitel: doc. MUDr. Miloš Kubánek, Ph.D.

Konzultant: MUDr. Jakub Sikora, Ph.D.

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

# Abstrakt

**Úvod:** Danonova nemoc je vzácné X-vázané střídativé lysozomální onemocnění způsobené patogenními variantami genu *LAMP2*, které vede na buněčné úrovni k poruše autofagie a následné apoptóze. Klinicky se projevuje především kardiálním postižením s rizikem časné progresy do pokročilého srdečního selhání.

U hemizygotních mužů bývá manifestace zpravidla časná a nápadná, avšak u heterozygotních žen je klinický obraz variabilní, často bez výrazných extrakardiálních projevů, a diagnostika je proto obtížnější. U obou pohlaví můžeme pozorovat typický oftalmologický fenotyp charakteru pigmentové retinopatie.

V klinické praxi může onemocnění u žen dlouho unikat rozpoznání navzdory závažné prognóze. Dizertační práce je zaměřena na patofyziologické a klinické aspekty Danonovy nemoci u žen se zvláštním důrazem na screening, diagnostiku a popis fenotypu.

**Hypotéza:** Danonova nemoc je u mladých žen s neischemickou kardiomyopatií a pokročilým srdečním selháním poddiagnostikovanou příčinou tohoto stavu. Samotné klinické známky nejsou pro spolehlivou identifikaci onemocnění dostačující. Průtoková cytometrie s detekcí *LAMP2* v periferních leukocytech může představovat účinný screeningový nástroj.

**Cíle práce:**

1. Popsat výskyt a fenotyp Danonovy nemoci u mladých žen s neischemickou kardiomyopatií a projevy pokročilého srdečního selhání.
2. Zlepšit diagnostiku Danonovy nemoci u žen s neischemickým srdečním selháním pomocí průtokové cytometrie LAMP2 v periferních leukocytech.
3. Prozkoumat genetickou architekturu Danonovy nemoci v české populaci a zhodnotit podíl X- inaktivace alely *LAMP2* v postižených tkáních.

**Metodika:** Dizertační práce je založena na čtyřech studiích. První studie hodnotila kohortu mladých žen s pokročilým srdečním selháním při neischemické kardiomyopatii a využila cílený screening Danonovy nemoci pomocí průtokové cytometrie periferních leukocytů. Druhá studie detailně popsala pacientku s komplexní *de novo* přestavbou oblasti *Xq24* a heterozygotní souvislou delecí zahrnující *LAMP2* a sousední geny. Třetí studie se zaměřila na oftalmologický fenotyp Danonovy nemoci při použití moderních zobrazovacích metod. Čtvrtá studie hodnotila průběh těhotenství u žen s kardiomyopatií různé etiologie (včetně Danonovy nemoci) a po ortotopické transplantaci srdce.

**Výsledky:** V kohortě mladých žen s pokročilým srdečním selháním byla zjištěna relativně vysoká prevalence Danonovy nemoci (12 %). Klinicky se u postižených žen častěji vyskytoval fenotyp hypertrofické kardiomyopatie a preexcitace v EKG, senzitivita těchto znaků však byla nízká. Průtoková cytometrie LAMP2 v periferních

leukocytech prokázala velmi dobrou diagnostickou výtěžnost a v naší kohortě zachytila dva nové případy. Genetická analýza potvrdila heterogenitu nálezů včetně delece v oblasti *Xq24* zasahující geny *CUL4B*, *LAMP2*, *ATP1B4*, *TMEM255A* a *ZBTB33*. Oční vyšetření prokázalo postižení charakteru pigmentové retinopatie se změnami autofluorescence a strukturálními alteracemi zevních retinálních vrstev i při relativně zachované centrální zrakové ostrosti, a to i u jinak klinicky asymptomatické přenašečky patogenní varianty *LAMP2*. V těhotenství u pacientky s Danonovou nemocí byla popsána progresse srdečního selhání s nutností časně transplantace srdce. Průběh čtyř těhotenství žen po transplantaci srdce byl převážně příznivý.

**Závěr:** Danonova nemoc představuje významnou, avšak poddiagnostikovanou příčinu pokročilého srdečního selhání u mladých žen s neischemickou kardiomyopatií. Průtoková cytometrie s detekcí *LAMP2* v periferních leukocytech představuje rychlý a praktický nástroj, který může významně zlepšit časnou diagnostiku, zejména v případě nejasného genetického nálezu. Propojení kardiologických, oftalmologických, genetických a cytometrických nálezů umožňuje přesnější diagnostiku, a tím podporuje včasné terapeutické rozhodování, genetické poradenství a cílené sledování postižených rodin.

**Klíčová slova:** Danonova nemoc, *LAMP2*, kardiomyopatie, srdeční selhání, průtoková cytometrie, X-inaktivace, pigmentová retinopatie, těhotenství, transplantace srdce.

# Abstract

**Introduction:** Danon disease is a rare X-linked lysosomal storage disorder caused by pathogenic variants of the *LAMP2* gene, leading at the cellular level to impaired autophagy and subsequent apoptosis. Clinically, it manifests primarily as cardiac involvement with a risk of early progression to advanced heart failure.

In hemizygous males, presentation is usually early and conspicuous; however, in heterozygous females, the clinical presentation is variable, often without prominent extracardiac manifestations, and diagnosis is therefore more difficult. In both sexes, a characteristic ophthalmologic phenotype of pigmentary retinopathy can be observed.

In clinical practice, the disease in women may remain unrecognized for a long time despite its serious prognosis. This dissertation focuses on the pathophysiological and clinical aspects of Danon disease in women, with particular emphasis on screening, diagnosis, and phenotypic characterization.

**Hypothesis:** Danon disease is an underdiagnosed cause of advanced heart failure in young women with non-ischemic cardiomyopathy. Clinical signs alone are insufficient for reliable disease identification. Flow cytometry with LAMP2 detection in peripheral leukocytes may represent an effective screening tool.

**Aims:**

1. To describe the prevalence and phenotype of Danon disease in young women with non-ischemic cardiomyopathy and manifestations of advanced heart failure.
2. To improve the diagnosis of Danon disease in women with non-ischemic heart failure using *LAMP2* flow cytometry in peripheral leukocytes.
3. To investigate the genetic architecture of Danon disease in the Czech population and to evaluate the contribution of X-inactivation of the *LAMP2* allele in affected tissues.

**Methods:** The dissertation is based on four studies. The first study evaluated a cohort of young women with advanced heart failure due to non-ischemic cardiomyopathy and applied targeted screening for Danon disease using flow cytometry of peripheral leukocytes. The second study provided a detailed description of a patient with a complex *de novo* rearrangement of the *Xq24* region and a heterozygous contiguous deletion involving *LAMP2* and neighboring genes. The third study focused on the ophthalmologic phenotype of Danon disease using modern imaging methods. The fourth study evaluated pregnancy outcomes in women with cardiomyopathy of various etiologies (including Danon disease) and in women after orthotopic heart transplantation.

**Results:** In the cohort of young women with advanced heart failure, a relatively high prevalence of Danon disease (12%) was found. Clinically, a hypertrophic cardiomyopathy phenotype and ECG pre-excitation were more frequent in affected women; however, the

sensitivity of these signs was low. LAMP2 flow cytometry in peripheral leukocytes demonstrated very good diagnostic yield and identified two new cases in our cohort. Genetic analysis confirmed heterogeneous findings, including a deletion in the *Xq24* region affecting the *CUL4B*, *LAMP2*, *ATP1B4*, *TMEM255A*, and *ZBTB33* genes. Ophthalmic examination showed pigmentary retinopathy with autofluorescence abnormalities and structural alterations of the outer retinal layers despite relatively preserved central visual acuity, including in an otherwise clinically asymptomatic carrier of a pathogenic *LAMP2* variant. During pregnancy in a patient with Danon disease, progression of heart failure was described, requiring early heart transplantation. The course of four pregnancies in women after heart transplantation was predominantly favorable.

**Conclusion:** Danon disease is a significant yet underdiagnosed cause of advanced heart failure in young women with non-ischemic cardiomyopathy. Flow cytometry with LAMP2 detection in peripheral leukocytes is a rapid and practical tool that may substantially improve early diagnosis, especially in cases of inconclusive genetic findings. Integration of cardiologic, ophthalmologic, genetic, and cytometric findings enables more accurate diagnosis and thereby supports timely therapeutic decision-making, genetic counseling, and targeted follow-up of affected families.

**Keywords:** Danon disease, *LAMP2*, cardiomyopathy, heart failure, flow cytometry, X-inactivation, pigmentary retinopathy, pregnancy, heart transplantation.

# Obsah

1 Úvod.....	5
2 Hypotézy a cíle práce.....	10
3 Metodika.....	11
3.1 Studie I: Screening Danonovy nemoci u mladých žen s pokročilým srdečním selháním.....	11
3.2 Studie II: Komplexní genetická kazuistika s delecí <i>Xq24</i> .....	12
3.3 Studie III: Oftalmologický fenotyp Danonovy nemoci.....	12
3.4 Studie IV: Těhotenství u žen s kardiomyopatií a po transplantaci srdce.....	13
4 Výsledky.....	13
4.1 Studie I: Danonova nemoc je poddiagnostikovanou příčinou pokročilého srdečního selhání u mladých žen – průtokově cytometrický screening LAMP2.....	13
4.2 Studie II: Kazuistika pacientky se souvislou <i>de novo</i> delecí <i>Xq24</i> zahrnující <i>CUL4B</i> a <i>LAMP2</i> .....	16
4.3 Studie III: Oční nálezy u Danonovy nemoci.....	18
4.4 Studie IV: Danonova nemoc v těhotenství.....	18
5 Diskuse.....	19
Prevalence Danonovy nemoci.....	21
5.1 Fenotyp Danonovy nemoci u žen.....	22
5.2 Průtoková cytometrie periferních leukocytů s detekcí LAMP2 proteinu v porovnání s dalšími metodami pro screening Danonovy nemoci.....	23
5.3 Aplikace výsledků screeningu pro klinickou praxi.....	24
5.4 Molekulární architektura Danonovy nemoci.....	25
5.5 Případ heterozygotní delece celé alely LAMP2 a částí sousedních genů.....	26
5.6 Limitace.....	27
6 Závěr.....	27
7 Použitá literatura.....	29
8 Seznam publikací doktoranda.....	29
8.1 Publikace <i>in extenso</i> , které jsou podkladem dizertace.....	29
Publikace bez vztahu k tématu dizertace.....	29

# 1 Úvod

Kardiomyopatie jsou onemocnění srdečního svalu charakterizovaná strukturálními a/nebo funkčními abnormalitami myokardu komor, které nelze vysvětlit hemodynamickým zatížením (například při hypertenzi, chlopenní vadě či vývojové srdeční vadě) ani postižením koronárních tepen **(1)**. Kardiomyopatie mají heterogenní etiologii s významnou genetickou komponentou **(2)**. Téma postgraduálního studia a dizertační práce jsme zaměřili na vzácnou genetickou příčinu hypertrofické a méně často dilatační kardiomyopatie, Danonovu nemoc (OMIM #300257). Je to X-chromozomálně vázané onemocnění podmíněné mutacemi v genu *LAMP2* (lysozomálně asociovaný membránový protein 2) **(3)**. U X-hemizygotních mužů onemocnění napodobuje klasickou hypertrofickou kardiomyopatii, která bývá daleko častěji, minimálně v 35–40 % případů, podmíněna mutacemi genů kódujících strukturu sarkomery **(3)**.

U X-hemizygotních mužů dochází ke kompletnímu deficitu proteinu LAMP2 ve tkáních. Klinický obraz je u nich nápadný. Typicky u mužů nacházíme fenotyp hypertrofické kardiomyopatie s masivní hypertrofií stěn levé komory, který bývá doprovázen výrazným extrakardiálním postižením, nejčastěji lehkým kognitivním deficitem, myopatií kosterního svalu, očním postižením a hepatopatií. U X-heterozygotních žen má Danonova nemoc fenotyp hypertrofické nebo dilatační kardiomyopatie, obvykle bez výraznějšího systémového postižení **(4)**, onemocnění je proto obtížné u žen identifikovat. Odlišný fenotyp u žen je podmíněn variabilní inaktivací jednoho z chromozomů X v jednotlivých tkáních. Podle

podílu inaktivace chromozomu X s patogenní variantou LAMP2 nacházíme ve tkáních mozaiku buněk s variabilním podílem LAMP2-deficientních buněk. Proto je u žen klinický obraz více variabilní a také se mezi sebou liší v tíži a rychlosti progresu onemocnění. Danonova nemoc má velmi nepříznivou prognózu, vede k terminálnímu srdečnímu selhání u mužů již během 2.–3. decénia, u žen během 3.–5. decénia. Z praktického hlediska je třeba tyto nemocné časně identifikovat, neboť jejich prognózu lze zlepšit provedením srdeční transplantace **(4)**. Naši práci jsme zaměřili na patofyziologické a klinické aspekty Danonovy nemoci u žen, kde je evidence v řadě oblastí nedostatečná.

Gen *LAMP2* se nachází na dlouhém raménku X chromozomu (*Xq24*) **(6)**. Tento gen kóduje tři hlavní izoformy proteinu LAMP2 (A, B, C). Jedná se o lysozomální jedenkrát trans membránový protein. Dominantní formou je LAMP-2B izoforma s vysokou expresí v srdci, kosterním svalu a mozku **(11)**. LAMP-2C izoforma byla nedávno asociována s autofagií RNA a DNA v buňkách mozku **(12, 13)**. Většina známých mutací *LAMP2* je lokalizována do exonů 1–8 a postihuje všechny tři izoformy, bylo však reportováno několik málo mutací postihujících izolovaně LAMP-2B izoformu, které byly spojené s mírnější formou Danonovy nemoci **(14)**. Zdá se tedy, že postižení LAMP-2B izoformy je kritické pro vznik Danonovy nemoci. Tuto domněnku podporuje také korelace mezi nejvíce postiženými orgány (myokard, kosterní sval a mozek) a místy s vysokou expresí LAMP-2B **(14)**. Drtivá většina mutací *LAMP2* asociovaných s Danonovou nemocí jsou mutace typu nonsense, inzerce nebo delece menšího rozsahu, sestřihové varianty, rozsáhlé

delece, rozsáhlé duplikace, které buď vedou non-sense mediated mRNA decay nebo ke zkrácení, nestabilitě a kompletní absenci proteinu. Zcela výjimečně pak onemocnění způsobují bodové mutace **(14)**.

Absence proteinu *LAMP2* má za následek poruchu (makro)autofagie, což je homeostatický mechanismus zabezpečující odbourávání nadbytečných intracelulárních makromolekul v lysozomech **(15)**. Narušeno je především splynutí autofagozomu a lysozomu **(16)**. Dochází k akumulaci intracelulárních autofagozomálních vakuol, které obsahují glykogen a další komponenty cytoplazmy, místo toho, aby byly řádně odbourávány v lysozomech. Rozvíjí se hypertrofie kardiomyocytů. Dochází k nepoměru mezi dodávkou a spotřebou energie, roste oxidativní stres, výsledkem je buněčná smrt a difuzní fibróza, která zhoršuje vedení a přispívá k zvýšenému výskytu arytmií **(17)**. Následkem těchto změn se rozvíjí kardiomyopatie, postižení periferního svalstva (kosterní myopatie) a poškození nervové tkáně (kognitivní deficit). Absenci proteinu je možné detekovat i v buňkách bílé krevní řady, což je výhodné pro některé diagnostické metody **(8, 17, 18)**.

Gen *LAMP2* se nachází na dlouhém raménku chromozomu X (*Xq24*), fenotyp je tedy odlišný u mužů a žen. U postižených mužů, kteří jsou hemizygoti pro *LAMP2*, jsou deficitem uniformně postiženy všechny buňky exprimující tkání, ke klinickým projevům proto dochází zpravidla ještě v dětství.

Heterozygotní ženy mají v každé buňce postiženou i nepostiženou alelu. Vlivem náhodné inaktivace chromozomu X je mutovaná

LAMP2 alela exprimována formou mozaiky. Závažnost projevů je pravděpodobně úměrná zastoupení inaktivované zdravé alely v dané tkáni, postiženy jsou však ženy systematicky, a nikoliv pouze ty, u nichž došlo k výraznému zešikmení X-inaktivace ve prospěch exprese mutované LAMP2 alely. Postižené ženy proto mají mírnější kardiální fenotyp než muži (často izolovaný) s rovnoměrným zastoupením dilatační a hypertrofické kardiomyopatie. Symptomy se u postižených žen objevují v průměru o 15 let později než u mužů a průměrné dožití se pohybuje okolo 35 let; jsou také méně postiženy myopatií kosterního svalstva a kognitivním deficitem (4, 27). Avšak podobný podíl mužů i žen dospěje do terminálního srdečního selhání (28). Byly zaznamenány také případy náhlé srdeční smrti u nemocných s Danonovou nemocí (29).

Klinické projevy nemoci se, vzhledem k X-vázané dědičnosti, odlišují u mužů a u žen. U mužů se nemoc zpravidla projevuje triádou kardiomyopatie, myopatie kosterního svalstva a lehké mentální retardace. U žen se vyskytuje především kardiomyopatie, postižení kognitivních funkcí bývá mírnější a myopatie kosterního svalstva obvykle nebývá přítomna. Přesto pacienti obou pohlaví nakonec dospějí do terminálního srdečního selhání s nutností transplantace nebo implantace mechanické podpory. U mužů je medián dožití bez transplantace 21 let, u žen 38 let (28).

Mezi kardiální příznaky patří kardiomyopatie postupně progredující do srdečního selhání, poruchy srdečního rytmu, zejména preexcitace a supraventrikulární arytmie, méně často komorové arytmie. Medián

stanovení diagnózy hypertrofické kardiomyopatie je u mužů 13 let, u žen 16 let.

Dalším příznakem, postihujícím hlavně muže, je svalová slabost, zejména proximálního svalstva. Myopatie dýchacích svalů většinou výrazněji neprogreduje a nelimituje prognózu nemocných.

Postižení kognitivních funkcí se vyskytuje u obou pohlaví, u mužů častěji. Bývá většinou mírné **(4)**.

Danonova nemoc se projevuje také postižením zraku. Mezi popisované příznaky patří myopie a retinopatie. Postižení zraku obvykle není těžké, není znám žádný případ oslepnutí. Avšak podrobné vyšetření sítnice může prokázat chorobné změny i u jinak asymptomatických pacientů **(51)**.

Laboratorně můžeme u pacientů nalézt zvýšení kreatinkinázy, laktátdehydrogenázy, ALT a AST, a to na více než trojnásobek normálních hodnot. Mechanismus zvýšení těchto hodnot není přesně znám. Může souviset s poškozením jater v důsledku základního onemocnění, nebo může být způsoben sekundárně v důsledku pravostranného městnání **(28)**. Zvýšení AST může být též způsobeno postižením kosterních svalů **(52)**.

Podezření na Danonovu chorobu vzniká u mužů s hypertrofickou kardiomyopatií zachycenou v 1.–3. decéniu, která je doprovázena výraznou hypertrofií stěn levé komory srdeční, obrazem preexcitace v EKG, zvýšením transamináz a kreatinkinázy. A také tehdy, pokud rychle progreduje srdeční selhání, nebo jsou přítomny extrakardiální projevy jako lehčí mentální retardace nebo lehká myopatie

kosterních svalů s postižením proximálních svalových skupin. Složitější je situace u žen, kde se onemocnění manifestuje v 2.–5. decéniu obrazem hypertrofické nebo dilatační kardiomyopatie, s variabilním výskytem preexcitace v EKG. Obvykle chybí extrakardiální příznaky a podezření na toto onemocnění můžeme získat hlavně tehdy, pokud pozorujeme rychlou progresi srdečního selhání. Na histologické úrovni pomýšlíme na Danonovu nemoc u jedinců s histologickým nálezem vakulizovaných kardiomyocytů v biopsii. Podezření posiluje pozitivní průkaz vakuol metodou PAS, kdy v dospělém věku uvažujeme o diagnóze Danonovy nemoci, PRKAG2 kardiomyopatie nebo Pompeho nemoci. Tato onemocnění pomáhá odlišit imunohistochemie, ultrastrukturální analýza a dále molekulárně-genetická diagnostika (17).

## 2 Hypotézy a cíle práce

1. Popsat výskyt a fenotyp Danonovy nemoci u mladých žen s neischemickou kardiomyopatií a projevy pokročilého srdečního selhání.

**Hypotéza:** v populaci mladých žen s neischemickou kardiomyopatií lze na základě charakteristického fenotypu odlišit pacientky s kardiomyopatií na podkladě Danonovy nemoci od pacientek s kardiomyopatií jiných etiologií.

2. Zlepšit diagnostiku Danonovy nemoci u žen s neischemickým srdečním selháním.

**Hypotéza:** vyšetření exprese LAMP2 proteinu na

leukocytech periferní krve je užitečným screeningovým nástrojem pro Danonovu nemoc.

3. Prozkoumat genetickou architekturu Danonovy nemoci v české populaci a zhodnotit podíl X-inaktivace alely *LAMP2* v postižených tkáních.

## **3 Metodika**

Dizertační práce je založena na čtyřech vzájemně propojených studiích, které pokrývají klinický profil pacientek s Danonovou nemocí, rodokmeny a popis genetických nálezů v naší kohortě pacientek (včetně případu komplexní přestavby *Xq24*), screeningové a diagnostické postupy, zejména průtokovou cytometrii periferních leukocytů, exomové sekvenování, oční vyšetření a histopatologické nálezy a výsledky sledování těhotných pacientek s Danonovou nemocí.

### **3.1 Studie I: Screening Danonovy nemoci u mladých žen s pokročilým srdečním selháním**

Do studie byla zařazeny ženy s neischemickou kardiomyopatií, které dosáhly stadia pokročilého srdečního selhání v mladém věku (do 40 let). U pacientek s neobjasněnou etiologií bylo provedeno screeningové vyšetření exprese *LAMP2* na leukocytech periferní krve metodou průtokové cytometrie. Pozitivní či suspektní nálezy byly verifikovány molekulárně-genetickým vyšetřením. Hodnoceny byly základní klinické charakteristiky, fenotyp kardiomyopatie,

přítomnost preexcitace v EKG a výtěžnost jednotlivých diagnostických přístupů.

## **3.2 Studie II: Komplexní genetická kazuistika s delecí *Xq24***

V této studii byla detailně popsána kazuistika pacientky s komplexní *de novo* přestavbou oblasti *Xq24* zahrnující delecí genů *LAMP2* a *CUL4B*. K diagnostice byla využita průtoková cytometrie LAMP1/LAMP2 v periferních leukocytech, PCR a sekvenační analýza *LAMP2*, testování počtu kopií exonů (qPCR), hodnocení X-inaktivace (HUMARA) a imunohistochemie LAMP2 v explantovaném myokardu. Podpůrné metody zahrnovaly cytogenetická vyšetření a charakterizaci zlomových bodů re-aranžmá pomocí techniky *Alu*-PCR genome walking.

## **3.3 Studie III: Oftalmologický fenotyp Danonovy nemoci**

Třetí studie se zaměřila na charakteristiku očních změn u pacientů a pacientek s Danonovou nemocí. Bylo provedeno podrobné oftalmologické vyšetření u 10 pacientů s Danonovou nemocí (3 muži, 7 žen) a u 45leté klinicky asymptomatické ženy se somatickou (pravděpodobně i germinální) mozaikou patogenní varianty v genu *LAMP2*. Vyšetření zahrnovalo stanovení nejlépe korigované zrakové ostrosti (ETDRS), biomikroskopii, vyšetření očního pozadí, fotografii očního pozadí včetně autofluorescence, statickou perimetrii, spektrálně doménovou optickou koherenční tomografii

(SD-OCT) a doplňující elektrofyzilogická vyšetření dle protokolu studie.

### **3.4 Studie IV: Těhotenství u žen s kardiomyopatií a po transplantaci srdce**

Čtvrtá studie retrospektivně hodnotila těhotenství u žen s kardiomyopatií, včetně pacientek s Danonovou nemocí, a u žen po ortotopické transplantaci srdce. U pacientek byla provedena riziková stratifikace (mWHO, CARPREG II) a analyzovány dopady na matku i novorozence. Cílem bylo popsat reálný klinický průběh a identifikovat situace s vysokým rizikem dekompenzace.

## **4 Výsledky**

### **4.1 Studie I: Danonova nemoc je poddiagnostikovanou příčinou pokročilého srdečního selhání u mladých žen – průtokově cytometrický screening LAMP2**

Soubor tvořilo 60 žen s neischemickou kardiomyopatií, které do 40 let dospěly do pokročilého srdečního selhání (měly transplantované srdce, nebo mechanickou srdeční podporu, nebo byly na čekací listině). Etiologie byla předem známá u 15 pacientek, včetně 2 již diagnostikovaných případů Danonovy nemoci.

U 45 pacientek s neobjasněnou etiologií byla provedena průtoková cytometrie LAMP2. Subpopulaci LAMP2-deficientních granulocytů

>5 % měly 4 nově diagnostikované pacientky s Danonovou nemocí; při <5 % (0,17–2,6 %) byl zachycen ještě 1 další případ. Celkem tedy 5 nově diagnostikovaných patientek. Celková prevalence Danonovy nemoci v kohortě byla 12 % (7/60). Při cut-off  $\geq 5$  % byla senzitivita 86 % a specificita 100 % (PPV 100 %, NPV 98 %); při jakékoli odlišitelné subpopulaci byla senzitivita 100 %, specificita 92 % (PPV 63 %, NPV 100 %).

U patientek s Danonovou nemocí byl častější fenotyp hypertrofické kardiomyopatie (57 % vs. 9 %;  $p = 0,022$ ) i delta vlna na EKG (43 % vs. 0 %;  $p = 0,002$ ), ale bez laboratorního a genetického vyšetření tyto znaky samy o sobě nestačí ke stanovení diagnózy Danonovy nemoci. Exomové sekvenování odhalilo varianty ACMG 3–5 v genech asociovaných s kardiomyopatiemi u 24 patientek (53 %), včetně 5 nových případů Danonovy nemoci; u 21 (47 %) byl nález negativní nebo nejednoznačný. V dostupných vzorcích myokardu patientek s Danonovou nemocí byla prokázána mozaiková exprese LAMP2 v kardiomyocytech.

### **Exomové sekvenování, mutace *LAMP2*, poměry X-inaktivace dle HUMARA, hodnocení imunohistochemie myokardiálních vzorků**

Varianty třídy ACMG 3–5 v genech souvisejících s onemocněním byly nalezeny u 24 patientek (53 %), včetně pěti nově identifikovaných patientek s Danonovou nemocí, jejichž varianty byly hodnoceny jako patogenní nebo pravděpodobně patogenní (ACMG 4–5). Je důležité zdůraznit, že charakterizace mutací *LAMP2* u dvou patientek s Danonovou nemocí vyžadovala

individuální metodologický přístup, který u obou výrazně přesahoval standardní analytiku exomové sekvenace (41, 44).

Pomocí exomové sekvenace byly v souboru 45 vyšetřených žen s neischemickou kardiomyopatií zjištěny varianty některého z kardiomyopatických genů ve třídě ACMG 3-5 u 24 pacientek (53 %). Postiženy byly následující geny: 1 pacientka gen *BAG3*, 2 pacientky desmin (*DES*), 1 pacientka dystrofin (*DMD*), 1 pacientka desmoplakin (*DSP*), 1 pacientka fibrillin 1 (*FBN1*), 2 pacientky filamin C (*FLNC*), 5 pacientek *LAMP2* – referováno výše, 1 pacientka lamin A/C (*LMNA*), 1 pacientka beta-izoforma srdečního myosinu (*MYH7*), 1 pacientka gen *MYL2*, 1 pacientka gen *MYLK3*, 1 pacientka myopaladin (*MYPN*), 2 pacientky gen *TMEM43*, 1 pacientka srdeční troponin I (*TNNI3*), 2 pacientky srdeční troponin T (*TNNT2*) a 1 pacientka titin (*TTN*). 21 pacientek (47 %) mělo negativní nebo nekonkluzivní výsledky exomové sekvenace.

### **Klinické charakteristiky žen s Danonovou nemocí**

Fenotyp hypertrofické kardiomyopatie (57 % proti 9 %,  $p = 0,022^*$ ) a delta vlny na elektrokardiogramech (43 % proti 0 %,  $p = 0,002^{**}$ ) byly u žen s Danonovou nemocí významně častější ve srovnání se zbytkem pacientů v kohortě. Přítomnost hypertrofické kardiomyopatie identifikovala ženy s Danonovou nemocí se senzitivitou 57 %, specificitou 91 %, PPV 44 % a NPV 94 %. Delta vlny identifikovaly ženy s Danonovou nemocí se senzitivitou 43 %, specificitou 100 %, PPV 100 % a NPV 93 %. Senzitivita těchto klinických proměnných tak byla výrazně nižší než senzitivita testu *LAMP2* průtokovou cytometrií. Zvýšená tloušťka stěn levé komory a

širší komplexy QRS u žen s Danonovou nemocí odpovídaly vyšší prevalenci hypertrofické kardiomyopatie a delta vln u těchto jedinců.

## **4.2 Studie II: Kazuistika pacientky se souvislou *de novo* delecí *Xq24* zahrnující *CUL4B* a *LAMP2***

Pacientce byla ve 25 letech diagnostikována dilatační kardiomyopatie se závažným oboustranným srdečním selháním (EF LK 20 %), s normální tloušťkou stěn levé komory a se středně významnou mitrální a trikuspidální regurgitací. Po 10 měsících farmakoterapie došlo k refrakternímu kardiogennímu šoku s jaterním i renálním selháním, následovala implantace biventrikulární mechanické srdeční podpory a za další 3 měsíce bylo pacientce transplantováno srdce. Ve srovnání s jinými ženami s Danonovou nemocí došlo k dosažení terminálního stadia srdečního selhání výrazně dříve.

V klinickém obraze dominovalo srdeční postižení s diskrétní preexcitací (delta vlny při zpětném hodnocení EKG). Neurologicky a na MRI mozku nebyly patrné odchylky, přítomna však byla lehká kognitivní porucha. Oftalmologický nález byl kompatibilní s Danonovou nemocí (retinopatie typu „salt and pepper“, změny autofluorescence nezasahující foveu, mírné defekty zorného pole, snížená kontrastní citlivost). Histopatologie myokardu prokázala ložiskovou hypertrofii a vakuolizaci kardiomyocytů a fibrózu, imunohistochemicky se prokázala mozaiková exprese LAMP2.

Geneticky šlo o komplexní *de novo* přestavbu *Xq24* zprostředkovanou *Alu* sekvencemi s heterozygotní delecí, souvisle

zasahující exony 20–22 genu *CUL4B* a kompletní sekvence genů *LAMP2*, *ATP1B4*, *TMEM255A* a *ZBTB33*; karyotyp byl 46,XX. Genotypizace dvou jednonukleotidových polymorfismů ukázala postižení paternální alely, mutace nebyla prokázána u rodičů ani ve spermiích otce. Tato kazuistika dokumentuje, že mohou vznikat delece, které souvisle postihují geny *CUL4B* a *LAMP2*; u heterozygotních žen pak ve fenotypu dominuje kardiální obraz Danonovy nemoci.

Průtoková cytometrie v periferní krvi zachytila jen malé, ale jasně odlišitelné populace LAMP2-deficientních leukocytů (cca 3–4 % monocytů/granulocytů), což by samo o sobě mohlo vést k podcenění rozsahu onemocnění. Vysvětlením je výrazné vychýlení poměru X-inaktivace v periferní krvi (stanovené metodou HUMARA), pravděpodobně v důsledku selekce proti klonům s deficitem *CUL4B*; tento selekční tlak je zjevně tkáňově specifický, protože v myokardu byl podíl LAMP2-deficientních a LAMP2-pozitivních kardiomyocytů přibližně vyrovnaný (mozaiková exprese). Prakticky to znamená, že souvislá delece postihující *CUL4B* a *LAMP2* může komplikovat interpretaci diagnostických metod založených na vzorcích periferní krve.

### **4.3 Studie III: Oční nálezy u Danonovy nemoci**

V kohortě 10 pacientů s Danonovou nemocí (3 muži, 7 žen) a u jedné 45leté asymptomatické ženy se somatickou mozaikou patogenní varianty *LAMP2* byly zjištěny charakteristické oftalmologické nálezy. U všech pacientů s manifestní kardiomyopatií byla přítomna

„salt and pepper“ retinopatie s alterovanou autofluorescencí a difuzní poruchou zorného pole. Nejlépe korigovaná zraková ostrost byla snížena ( $<0,63$ ) u 8 z 20 očí (40 %). Závažnost nálezu narůstala s věkem a vedla k postupnému postižení čípků i tyčinek (cone-rod dystrofie). U asymptomatické mozaikové nosičky byla zraková ostrost 1,0 oboustranně, nicméně byla prokázána abnormální autofluorescence a difuzní porucha zorného pole při normálním plno-polním ERG.

Výsledky podporují význam detailního očního vyšetření jako potenciálně citlivého a rychlého screeningového nástroje k identifikaci nosičů patogenních variant *LAMP2*, a to i v případě somatické mozaiky s nízkým zastoupením *LAMP2* deficientních buněk.

#### **4.4 Studie IV: Danonova nemoc v těhotenství**

Na našem pracovišti bylo identifikováno 12 žen, které úspěšně donosily těhotenství při kardiomyopatii nebo po ortotopické transplantaci srdce: 9 těhotenství u 8 žen s preexistující kardiomyopatií a 4 porody po transplantaci. Ve skupině s kardiomyopatií došlo během gravidity a do 1 roku po porodu k vysokému výskytu komplikací: 2 dekompenzace srdečního selhání, 1 dekompenzace hypertenze a 2 TIA; kardiovaskulární příhoda komplikovala 55 % těhotenství. U 44 % žen byl po roce pokles EF LK  $\geq 10$  %.

U jedné pacientky s Danonovou nemocí a výraznou rodinnou zátěží došlo v těhotenství k progresi srdečního selhání (EF zhruba z 55 %

na 25 %), proto byla gravidita ukončena císařským řezem v 36. týdnu. Ve 26 letech porodila zdravého syna (1940 g), poté byla pro další progresi časně zařazena na čekací listinu k transplantaci srdce, kterou úspěšně podstoupila. Následně u ní byla potvrzena Danonova nemoc; u syna patogenní varianta *LAMP2* prokázána nebyla.

Naopak u 4 porodů po transplantaci srdce byl průběh převážně příznivý: kromě jedné preeklampsie bez závažných peripartálních komplikací, narodily se 4 hypotrofní, jinak zdravé děti a matky byly i při dlouhodobém sledování naživu.

## 5 Diskuse

Základní výsledky naší práce můžeme shrnout následovně:

1. Prevalence Danonovy nemoci v kohortě šedesáti žen, které se ve věku do 40 let dostaly do fáze pokročilého srdečního selhání v důsledku neischemické kardiomyopatie byla relativně vysoká, dosahovala 12 %.
2. Nepodařilo se nám identifikovat spolehlivé klinické známky, které by odlišily Danonovu nemoc od ostatních příčin neischemické kardiomyopatie u žen. I když se u žen s Danonovou nemocí častěji vyskytoval fenotyp hypertrofní kardiomyopatie a preexcitace v EKG, jejich senzitivita pro diagnostiku onemocnění byla nízká.
3. Průtoková cytometrie s detekcí *LAMP2* na leukocytech v periferní žilní krvi je senzitivní a relativně specifická metoda pro diagnostiku Danonovy nemoci také u žen.

4. Z molekulárně genetického hlediska byly patogenní varianty genu *LAMP2* nonsense mutace. Vedly ve třech případech k posunu čtecího rámce (frameshift mutace), u jedno případu ke vzniku stop kodonu, ve dvou případech se jednalo o delecí několika exonů a v jednom unikátním případě došlo k rozsáhlé delecí genů *CUL4B*, *LAMP2*, *ATP1B4*, *TMEM255A*, a *ZBTB33*.
5. V očním vyšetření pacientek s Danonovou nemocí byla typická pigmentová retinopatie s abnormálním vzorem hypo-/hyperautofluorescenčních změn očního pozadí, často při dlouho zachované centrální zrakové ostrosti a jen mírných subjektivních obtížích. Na spektrálně doménové optické koherenční tomografii byly přítomny poruchy zevních retinálních vrstev a ložisková depozita v oblasti rozhraní retinálního pigmentového epitelu a elipsoidní zóny, u pokročilejších nálezů i atrofické změny, cystoidní makulární edém byl vzácný.
6. U pacientky s neobstrukční formou hypertrofické kardiomyopatie na podkladě Danonovy nemoci jsme pozorovali rozvoj pokročilého srdečního selhání v graviditě.

## **Prevalence Danonovy nemoci**

Danonova nemoc je v běžné populaci velmi vzácná (méně než 1/1 000 000) (30), ale je velmi pravděpodobné, že ženy – heterozygotky pro patogenní varianty *LAMP2* – zůstávají navzdory tomu, že jsou

často prvními postiženými členy v rodině, poddiagnostikovanou skupinou. Onemocnění se u žen typicky manifestuje v reprodukčním věku, takže včasná diagnóza je zásadní i pro genetické poradenství.

Ve vybraných kohortách se prevalence liší podle fenotypu: u dospělých s hypertrofickou kardiomyopatií 1–3 % **(31, 32)**, u dětské manifestace hypertrofické kardiomyopatie 4 % **(60)**, u terminální hypertrofické kardiomyopatie 7,7 % **(61)** a při preexcitaci v EKG výrazně více **(32, 33)**. U suspektního střádavého postižení myokardu s vyloučenou amyloidózou byla prevalence 8 % **(62)**.

Naše práce je specifická zaměřením na screening žen s pokročilým srdečním selháním při neischemické kardiomyopatii s manifestací do 40 let. Soubor tvořily převážně pacientky po transplantaci srdce (78 %); u tří byla diagnóza stanovena až více než 20 let po transplantaci, takže data neumožňují přímý odhad prospektivního záchytu.

Další přínos je metodický: jako primární screeningovou metodu jsme použili detekci *LAMP2* na leukocytech periferní krve, zatímco sekvenace nové generace sloužila ke confirmaci. Kombinace obou přístupů je výhodná zejména kvůli možným delecím *LAMP2*, které mohou být při samotné sekvenaci nové generace hůře zachytitelné.

## **5.1 Fenotyp Danonovy nemoci u žen**

V našem souboru měly pacientky s Danonovou nemocí hypertrofickou kardiomyopatii v 53 % a dilatační kardiomyopatii ve 47 %. Medián manifestace byl 16 let a progresse do pokročilého

srdečního selhání 25 let. U pacientek s Danonovou nemocí se, oproti ostatním pacientkám, častěji vyskytoval fenotyp hypertrofické kardiomyopatie (57 % vs. 9 %) i preexcitace v EKG (43 % vs. 0 %), ale samotné kardiální nálezy neumožnily spolehlivou jednoznačnou identifikaci. Výraznější extrakardiální postižení (myopatie, kognitivní deficit) bylo vzácné.

Jako klinicky nejpřínosnější rozlišující znak se ukázalo oční postižení: pigmentová retinopatie s typickým hypo-/hyperautofluorescenčním vzorem, často i při malých subjektivních obtížích a dlouho zachované centrální ostrosti. S věkem nález progredoval (dysfunkce fotoreceptorů); na spektrálně doménové optické koherenční tomografii byly poruchy zevních retinálních vrstev, ložisková depozita a u pokročilých forem atrofie, perimetricky difúzní ztráta zorného pole. Cystoidní makulární edém byl spíše výjimečný. Diagnosticky důležité je, že diskrétní oční změny byly zachytitelné i u asymptomatické nosičky se somatickým mozaicismem *LAMP2* bez kardiálních symptomů.

Fenotyp naší kohorty odpovídá literatuře: Boucek et al. popsala preexcitaci u 27 % žen (**4**), Brambatti et al. u 32 % (**28**); ve španělské práci byl fenotyp u žen v 70 % hypertrofická a ve 29 % dilatační kardiomyopatie, preexcitace ve 42 %, medián diagnózy kardiomyopatie 13 let u mužů a 16 let u žen (**50**).

## **5.2 Průtoková cytometrie periferních leukocytů s detekcí LAMP2 proteinu v porovnání s dalšími metodami pro screening Danonovy nemoci**

Sekvenace nové generace výrazně zlepšila genetickou diagnostiku Danonovy nemoci (59), ale u části nálezů zůstává patogenita nejasná a některé typy mutací *LAMP2* (zejména delece/duplikace) mohou uniknout detekci (41). Průtoková cytometrie oproti tomu hodnotí expresi přímo na úrovni proteinu a kvantifikuje podíl LAMP2-deficientních leukocytů. Na rozdíl od Western blotu (63) tak zachytí jak uniformní deficit u mužů, tak mozaikový deficit u heterozygotních žen; v modifikovaném režimu i velmi malé populace deficientních buněk (<1 %) při somatickém mozaicismu (42, 64).

Metoda je praktická: minimálně invazivní odběr, komerčně dostupné reagenie, zpracování do 24 hodin, nízké náklady a snadná implementace díky publikovanému standardnímu operačnímu protokolu (40).

## **5.3 Aplikace výsledků screeningu pro klinickou praxi**

Naše data ukazují, že Danonova nemoc je relativně častou příčinou pokročilého srdečního selhání u žen do 40 let s neischemickou kardiomyopatií. V této klinicky vysoce rizikové populaci (indikace k transplantaci či mechanické podpoře) má určení etiologie zásadní prognostický dopad: na rozdíl od heterogenního průběhu jiných

kardiomyopatií **(65)** má Danonova nemoc typicky progresi k terminálnímu selhání srdce, což podporuje nutnost časného intenzivního sledování, včasné směřování k radikální léčbě a genetické poradenství v rodinách. Přestože specifická léčba zatím není dostupná, probíhá výzkum genové terapie *LAMP2B* **(66)**.

Klinické podezření zvyšuje fenotyp hypertrofické nebo dilatační kardiomyopatie s preexcitací, definitivní diagnóza však vyžaduje molekulárně genetický přístup. Sekvence nové generace je dostupná, ale některé delece/duplikace *LAMP2* může přehlédnout a část variant má nejistou patogenitu. Při přetrvávajícím podezření navzdory negativní či nejasnému genetickému nálezu je vhodné doplnit průkaz deficitu *LAMP2* proteinu, ideálně průtokovou cytometrií leukocytů, která může nahradit invazivní biopsie. V praxi se proto jeví jako nejúčelnější kombinovat sekvenační metody (včetně cílené sekvence *LAMP2* dle Sangera) s průkazem proteinu; samotná plošná cytometrie jako rutinní screening je dnes při široké dostupnosti NGS méně praktická.

## **5.4 Molekulární architektura Danonovy nemoci**

Většina dosud popsaných mutací *LAMP2* vede k absenci proteinu; missense varianty jsou u Danonovy nemoci vzácné (OMIM #300257) **(28)**. Reziduální exprese *LAMP2* byla doložena jen u ojedinělých variant (např. „leaky splice-site“ nebo mutace v exonu 9B) **(67, 68)**. Tomu odpovídá i náš soubor: našli jsme heterozygotní patogenní varianty vedoucí k poruše syntézy proteinu (frameshift ve 3 případech, stop kodon v 1 případě, delece exonů ve

2 případech) a 1 unikátní rozsáhlou delecí *CUL4B*, *LAMP2*, *ATP1B4*, *TMEM255A* a *ZBTB33*.

U mužů proto průkaz *LAMP2* typicky ukazuje uniformní deficit, zatímco u žen je kvůli X-inaktivaci exprese mozaiková **(18, 58)**. Hranice vychýlené X-inaktivace jsou sice arbitrární, ale >98 % žen má v leukocytech poměr X-inaktivovaných alel v intervalu >5:95/<95:5 **(64)**. Rozsáhlejší studie X-inaktivace u žen s Danonovou nemocí zatím chybí. Výjimkou v naší kohortě byla pacientka s extrémně vychýlenou X-inaktivací a <5 % *LAMP2*-deficientních granulocytů/monocytů, u níž byla přítomna komplexní přestavba *Xq24* se ztrátou *LAMP2* i C-terminálních exonů *CUL4B* **(44)**. U heterozygotních patientek pro *CUL4B* je takové vychýlení v bílých krvinkách vysvětlováno jako vliv selekčního tlaku proti *CUL4B*-deficientním klonům, i při klinické asymptomatickosti **(44)**.

## **5.5 Případ heterozygotní delece celé alely**

### **LAMP2 a částí sousedních genů**

Ve studii II jsme popsali probandku s komplexní *de novo* přestavbou *Xq24* a heterozygotní delecí zasahující exony 20–22 *CUL4B* a celé geny *LAMP2*, *ATP1B4*, *TMEM255A* a *ZBTB33* **(28)**. Kardiální, oftalmologický i histopatologický nálezn odpovídal fenotypu heterozygotních žen s Danonovou nemocí **(28)**.

Mimo neurokognitivní oblast byla pacientka klinicky podobná jiným heterozygotním nosičkám *CUL4B*, tedy bez výrazné symptomatiky **(69)**. Lehký kognitivní deficit a slabší verbální porozumění pravděpodobně odrážejí kombinovaný vliv *LAMP2* a *CUL4B*, ale

podíl jednotlivých genů nelze z dostupných dat přesně určit; etiologii je proto nutno považovat za multifaktoriální.

Klíčovým nálezem byla extrémně vychýlená X-inaktivace ve více tkáních včetně periferní krve, zřejmě daná selekcí proti CUL4B-deficientním klonům (69). V krvi se to projevilo jen malou, ale jasně detekovatelnou populací LAMP2-deficientních leukocytů, zatímco v myokardu byl poměr LAMP2-deficientních a pozitivních kardiomyocytů přibližně vyrovnaný, což podporuje tkáňově specifické selekční mechanismy (70). Funkční význam delece *ATP1B4*, *TMEM255A* a *ZBTB33* zůstává nejasný. U heterozygotních žen tak může dominovat kardiální fenotyp Danonovy nemoci i při minimální populaci LAMP2-deficientních leukocytů; u mužů bychom mohli při shodné genetické přestavbě naopak očekávat těžký kombinovaný fenotyp Danonovy nemoci a Cabezasova syndromu.

## 5.6 Limitace

Pokročilé srdeční selhání tvoří jen malou část všech případů srdečního selhání (asi 5 %) (71) a u žen ve věku 20–40 let je velmi vzácné (ve studii ze severovýchodní Francie 6–23 na milion obyvatel) (72). V této věkové skupině dominují genetické kardiomyopatie, myokarditidy a peripartální kardiomyopatie; chlopenní či ischemické příčiny lze obvykle dobře odlišit běžnými zobrazovacími metodami. Zatímco srdeční selhání zánětlivé a graviditou podmíněné etiologie může být reverzibilní, genetické příčiny vedou spíše k trvalému strukturálnímu poškození a progresi srdečního selhání. I proto byl v našem souboru podíl Danonovy

nemoci relativně vysoký (12 %), pravděpodobně vlivem koncentrace ireverzibilních geneticky podmíněných případů v transplantačních centrech.

Naše kohorta žen <40 let s neischemickým srdečním selháním není prospektivní dlouhodobě sledovaná populace s předem definovanými vstupními kritérii. Jde o průřez pacientek ze specializovaných center v daném období, které byly po transplantaci srdce, s mechanickou srdeční podporou, nebo podstupovaly předtransplantační vyšetření.

## 6 Závěr

Danonova nemoc představuje vzácnou, avšak klinicky závažnou příčinu kardiomyopatie s vysokým rizikem progresu do pokročilého srdečního selhání a výskytem náhlé srdeční smrti v mladém věku. V praxi je diagnostika obtížná zejména u žen, u nichž může být fenotyp variabilní (dilatační i hypertrofická kardiomyopatie) a extrakardiální projevy často chybí nebo jsou diskrétní.

Nejdůležitějším výsledkem této práce je zjištění relativně vysoké prevalence Danonovy nemoci (12 %) u mladých žen s pokročilým srdečním selháním při neischemické kardiomyopatii. Tyto údaje podporují potřebu aktivního a systematického vyhledávání Danonovy nemoci v přesně definovaných rizikových skupinách, zejména v transplantačních programech a centrech pro srdeční selhání. Současně naše data ukazují, že klinické „red flags“ (např. hypertrofický fenotyp nebo přítomnost delta vln) zvyšují podezření, ale nejsou samy o sobě dostačující pro spolehlivou identifikaci pacientek.

Průtoková cytometrie LAMP2 v periferních leukocytech se v našem souboru ukázala jako efektivní screeningový nástroj. Výhodou metody je rychlost, relativní jednoduchost a možnost zachytit mozaikový deficit LAMP2 v souladu s X inaktivací u heterozygotních žen. Limitace však představují situace s extrémně vychýlenou X inaktivací v hematopoetické tkáni nebo jiné komplexní genetické mechanismy, které mohou vést k velmi nízkému zastoupení LAMP2-deficientních buněk v periferní krvi. Tyto aspekty demonstruje kazuistika pacientky se souvislou delecí zahrnující *CUL4B* a *LAMP2*, u níž byla populace LAMP2-deficientních leukocytů minimální, zatímco v myokardu byla exprese LAMP2 výraznější.

Při současné dobré dostupnosti metod sekvenace nové generace v České republice bude jistě prvním testem u pacientky s podezřením na genetickou příčinu neischemické kardiomyopatie sekvenace nové generace. Některé typy delecí nebo duplikací genu *LAMP2* však mohou být přehlédnuty nebo některé genetické varianty mohou vzbuzovat pochybnosti, zda jsou jednoznačně patogenní. Pokud trvá klinické podezření na Danonovu nemoc při negativním výsledku molekulární genetiky nebo jsou-li pochybnosti o patogenicitě genetické varianty, je třeba prokázat deficit proteinu LAMP2 ve tkáních. Efektivní metodou je v této situaci průtoková cytometrie s detekcí proteinu LAMP2 na leukocytech. Umožní vyhnout se invazivním metodám, jako jsou svalová nebo endomyokardiální biopsie.

## 7 Použitá literatura

1. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J*. 2008;**29**:270–276.
2. Arbelo E, Protonotarios A, Gimeno JR, et al. 2023 ESC Guidelines for the management of cardiomyopathies. *Eur Heart J*. 2023;**44**(37):3503-3626.
3. Marian AJ, Braunwald E. Hypertrophic Cardiomyopathy: Genetics, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Therapy. *Circ Res*. 2017;**121**(7):749-770.
4. Boucek D, Jirikowic J, Taylor M. Natural history of Danon disease. *Genet Med* 2011;**13**(6):563–8.
5. Danon MJ, Oh SJ, DiMauro S, et al. Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase. *Neurology* 1981;**31**(1): 51–7.
6. Nishino I, Fu J, Tanji K, Yamada T, et al. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* 2000;**406**(6798):906–10.
7. Kubánek M, Elleder M, Sikora J, et al. Danonova nemoc-porucha autofagie jako příčina hypertrofické kardiomyopatie. *Cor Vasa* 2010; **52**:706-712.
8. Majer F, Vlaskova H, Krol L, et al. Danon disease: a focus on processing of the novel LAMP2 mutation and comments on the beneficial use of peripheral white blood cells in the diagnosis of LAMP2 deficiency. *Gene*. 2012;**498**(2):183-195.

9. Fukuda M. Biogenesis of the lysosomal membrane. *Subcell Biochem.* 1994;22:199–230.
10. Cuervo AM, Dice JF. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science.* 1996;273:501–503.
11. Konecki DS, Foetisch K, Zimmer KP, et al. An alternatively spliced form of the human lysosome-associated membrane protein-2 gene is expressed in a tissue-specific manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;215:757–767.
12. Fujiwara Y, Furuta A, Kikuchi H, et al. Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. *Autophagy.* 2013;9:403–409.
13. Fujiwara Y, Kikuchi H, Aizawa S, et al. Direct uptake and degradation of DNA by lysosomes. *Autophagy.* 2013;9(8):1167-71.
14. D'souza RS, Levandowski C, Slavov D, et al. Danon disease: clinical features, evaluation, and management. *Circ Heart Fail.* 2014 Sep;7(5):843-9.
15. Fanin M, Nascimben AC, Fulizio L et al. Generalised lysosome-associated membrane protein-2 defect explains multisystem clinical involvement and allows leukocyte diagnostic screening in Danon disease. *Am J Pathol* 2006; **168**:1309-20.
16. Chi C, Leonard A, Knight WE, et al. LAMP-2B regulates human cardiomyocyte function by mediating autophagosome-lysosome fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(2):556-565. doi:10.1073/pnas.1808618116

17. Hong KN, Eshraghian EA, Arad M, et al. International Consensus on Differential Diagnosis and Management of Patients With Danon Disease: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2023;**82**(16):1628-1647.
18. Regelsberger G, Höftberger R, Pickl WF, Zlabinger GJ, Körmöczi U, Salzer-Muhar U, Luckner D, Bodamer OA, Mayr JA, Muss WH, Budka H, Bernheimer H. Danon disease: case report and detection of new mutation. *J Inherit Metab Dis*. 2009 Dec;**32** Suppl 1:S115-22.
19. Tanaka Y, Guhde G, Suter A, et al. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature*. 2000;**406**(6798):902-906.
20. Hashem SI, Perry CN, Bauer M, et al. Brief Report: Oxidative Stress Mediates Cardiomyocyte Apoptosis in a Human Model of Danon Disease and Heart Failure. *Stem Cells*. 2015;**33**(7):2343-2350.
21. Stypmann, J., Janssen, P.M., Prestle, J. *et al.* LAMP-2 deficient mice show depressed cardiac contractile function without significant changes in calcium handling. *Basic Res Cardiol* **101**, 281–291 (2006).
22. Saftig P, Tanaka Y, Lüllmann-Rauch R, von Figura K. Disease model: LAMP-2 enlightens Danon disease. *Trends Mol Med*. 2001;**7**(1):37-39.
23. Wang L, Wang J, Cai W, et al. A Critical Evaluation of Liver Pathology in Humans with Danon Disease and Experimental Correlates in a Rat Model of LAMP-2 Deficiency. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017;**53**(1):105-116.

24. Ma S, Zhang M, Zhang S, et al. Characterisation of Lamp2-deficient rats for potential new animal model of Danon disease. *Sci Rep*. 2018;**8**(1):6932.
25. Dvornikov AV, Wang M, Yang J, et al. Phenotyping an adult zebrafish lamp2 cardiomyopathy model identifies mTOR inhibition as a candidate therapy. *J Mol Cell Cardiol*. 2019;**133**:199-208.
26. Hashem SI, Murphy AN, Divakaruni AS, et al. Impaired mitophagy facilitates mitochondrial damage in Danon disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2017;**108**:86-94.
27. D'Souza RS, Levandowski C, Slavov D, Graw SL, Allen LA, Adler E, Mestroni L, Taylor MR. Danon disease: clinical features, evaluation, and management. *Circ Heart Fail* 2014;**7**(5):843–9.
28. Brambatti M, Caspi O, Maolo A, Koshi E, Greenberg B, Taylor MRG, Adler ED. Danon disease: Gender differences in presentation and outcomes. *Int J Cardiol* 2019;**286**:92–98.
29. Miani D, Taylor M, Mestroni L, D'Aurizio F, Finato N, Fanin M, Brigido S, Proclemer A. Sudden death associated with Danon disease in women. *Am J Cardiol* 2012;**109**(3):406–11.
30. ORPHANET. *Danon disease* [online]. Orpha.net [cit. 2026-02-01]. Dostupné z: <https://www.orpha.net/en/disease/detail/34587>
31. Charron P, Villard E, Sebillon P, et al. Danon's disease as a cause of hypertrophic cardiomyopathy: a systematic survey. *Heart* 2004;**90**:842–846.

32. Arad M, Maron BJ, Gorham JM, et al. Glycogen storage diseases presenting as hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2005;**352**(4):362-372.
33. Liu Y, Chen X, Wang F, Liang Y, Deng H, Liao H, Zhang Q, Zhang B, Zhan X, Fang X, Shehata M, Wang X, Xue Y, Wu S. Prevalence and clinical characteristics of Danon disease among patients with left ventricular hypertrophy and concomitant electrocardiographic preexcitation. *Mol Genet Genomic Med* 2019;**7**(5):e638.
34. Novelli M, Cossu A, Oukrif D, et al. X-inactivation patch size in human female tissue confounds the assessment of tumor clonality. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;**100**(6):3311-3314.
35. Pessia E, Makino T, Bailly-Bechet M, McLysaght A, Marais GA. Mammalian X chromosome inactivation evolved as a dosage-compensation mechanism for dosage-sensitive genes on the X chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;**109**(14):5346-5351.
36. Sivitskaya L, Vaikhanskaya T, Danilenko N, Liaudanski A, Davydenko O, Zhelev N. New deletion in LAMP2 causing familial Danon disease. Effect of the X-chromosome inactivation. *Folia Med (Plovdiv)*. 2022;**64**(5):853-862.
37. Bottillo I, Giordano C, Cerbelli B, et al. A novel LAMP2 mutation associated with severe cardiac hypertrophy and microvascular remodeling in a female with Danon disease: a case report and literature review. *Cardiovasc Pathol*. 2016;**25**(5):423-431.

38. Sivitskaya L, Vaikhanskaya T, Danilenko N, et al. Splicing mutation in LAMP2 gene leading to exon skipping and cardiomyopathy development. *Gene Reports* 2020; 18:100564.
39. Chen XL, Zhao Y, Ke HP, Liu WT, Du ZF, Zhang XN. Detection of somatic and germline mosaicism for the LAMP2 gene mutation c.808dupG in a Chinese family with Danon disease. *Gene*. 2012;**507**(2):174-176.
40. Gurka J, Piherova L, Majer F, et al. Danon disease is an underdiagnosed cause of advanced heart failure in young female patients: a LAMP2 flow cytometric study. *ESC Heart Fail*. 2020;**7**(5):2534-2543.
41. Majer F, Piherova L, Reboun M, et al. LAMP2 exon-copy number variations in Danon disease heterozygote female probands: Infrequent or underdetected?. *Am J Med Genet A*. 2018;**176**(11):2430-2434.
42. Majer F, Pelak O, Kalina T, et al. Mosaic tissue distribution of the tandem duplication of LAMP2 exons 4 and 5 demonstrates the limits of Danon disease cellular and molecular diagnostics. *J Inherit Metab Dis*. 2014;**37**(1):117-124.
43. Xu J, Wang L, Liu X, Dai Q. A novel LAMP2 p.G93R mutation associated with mild Danon disease presenting with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;**7**(10):e00941.
44. Majer F, Kousal B, Dusek P, Piherova L, Reboun M, Mihalova R, Gurka J, Krebsova A, Vlaskova H, Dvorakova L, Krihova J, Liskova P, Kmoch S, Kalina T, Kubanek M, Sikora J. *Alu*-mediated contiguous *Xq24* deletion encompassing *CUL4B*,

- LAMP2, ATP1B4, TMEM255A, and ZBTB33* genes causes Danon disease in a female patient. *Am J Med Genet A* 2020;**182**:219–223.
45. Jhaveri S, Herber J, Zahka K, Boyle GJ, Saarel EV, Aziz PF. Arrhythmias and fasciculoventricular pathways in patients with Danon disease: A single center experience. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2019;**30**(10):1932-1938.
  46. Liu Y, Wang F, Chen X, et al. Fasciculoventricular Pathways Responsible for Ventricular Preexcitation in Patients With Danon Disease. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2018;**11**(9):e006704.
  47. Hoffmayer KS, Han FT, Singh D, Scheinman MM. Variants of accessory pathways. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2020;**43**(1):21-29.
  48. Darden D, Hsu JC, Tzou WS, et al. Fasciculoventricular and atrioventricular accessory pathways in patients with Danon disease and preexcitation: A multicenter experience. *Heart Rhythm*. 2021;**18**(7):1194-1202.
  49. Lotan D, Salazar-Mendiguchía J, Mogensen J, et al. Clinical Profile of Cardiac Involvement in Danon Disease: A Multicenter European Registry. *Circ Genom Precis Med*. 2020;**13**(6):e003117.
  50. López-Sainz Á, Salazar-Mendiguchía J, García-Álvarez A, Campuzano Larrea O, López-Garrido MÁ, García-Guereta L, et al. Clinical Findings and Prognosis of Danon Disease. An Analysis of the Spanish Multicenter Danon Registry. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2019 Jun;**72**(6):479–86.

51. Kousal B, Majer F, Vlaskova H, Dvorakova L, Piherova L, Meliska M, Langrova H, Palecek T, Kubanek M, Krebsova A, Gurka J, Stara V, Michaelides M, Kalina T, Sikora J, Liskova P. Pigmentary retinopathy can indicate the presence of pathogenic LAMP2 variants even in somatic mosaic carriers with no additional signs of Danon disease. *Acta Ophthalmol.* 2021 Feb;99(1):61-68. doi: 10.1111/aos.14478. Epub 2020 Jun 13. PMID: 32533651.
52. Hunmin Kim MD, et al. A 13-year-old girl with proximal weakness and hypertrophic cardiomyopathy with Danon disease
53. Kubánek M. Nové postupy v diagnostice hypertrofické kardiomyopatie. *Vnitřní lékařství* 2024;**70**(6):376-383.
54. Hong KN, Battikha C, John S, Lin A, Bui QM, Brambatti M, et al. Cardiac Transplantation in Danon Disease. *J Card Fail.* 2022 Apr;**28**(4):664–9.
55. Rossano J, Taylor M, Lin K, et al. Abstract 11117: Phase 1 Danon Disease Results: The First Single Dose Intravenous (IV) Gene Therapy (RP-A501) With Recombinant Adeno-Associated Virus (AAV9:LAMP2B) for a Monogenic Cardiomyopathy. *Circulation.* 2022;**146**. doi:10.1161/circ.146.suppl\_1.11117
56. Greenberg B, Taylor M, Adler E, et al. Phase 1 Study of AAV9.LAMP2B Gene Therapy in Danon Disease. *N Engl J Med* 2025; 392: 972-983.
57. Amos-Landgraf JM, Cottle A, Plenge RM, Friez M, Schwartz CE, Longshore J, Willard HF. X chromosome-inactivation

- patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. *Am J Hum Genet* 2006;**79**(3):493–9.
58. Kalia, S., Adelman, K., Bale, S. *et al.* Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med* 2017;**19**:249–255.
59. Fu L, Luo S, Cai S, Hong W, Guo Y, Wu J, Liu T, Zhao C, Li F, Huang H, Huang M, Wang J. Identification of LAMP2 Mutations in Early-Onset Danon Disease With Hypertrophic Cardiomyopathy by Targeted Next-Generation Sequencing. *Am J Cardiol* 2016;**118**(6):888–894.
60. Yang Z, McMahan CJ, Smith LR, Bersola J, Adesina AM, Breinholt JP, Kearney DL, Dreyer WJ, Denfield SW, Price JF, Grenier M, Kertesz NJ, Clunie SK, Fernbach SD, Southern JF, Berger S, Towbin JA, Bowles KR, Bowles NE. Danon disease as an underrecognized cause of hypertrophic cardiomyopathy in children. *Circulation* 2005;**112**(11):1612–7.
61. Garcia-Pavia P, Vázquez ME, Segovia J, Salas C, Avellana P, Gómez-Bueno M, Vilches C, Gallardo ME, Garesse R, Molano J, Bornstein B, Alonso-Pulpon L. Genetic basis of end-stage hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2011;**13**(11):1193-201.
62. Cheng Z, Cui Q, Tian Z, Xie H, Chen L, Fang L, Zhu K, Fang Q. Danon disease as a cause of concentric left ventricular hypertrophy in patients who underwent endomyocardial biopsy. *Eur Heart J* 2012; **33**(5):649-56.

63. Fanin M, Nascimbeni AC, Fulizio L, Spinazzi M, Melacini P, Angelini C. Generalized lysosome-associated membrane protein-2 defect explains multisystem clinical involvement and allows leukocyte diagnostic screening in Danon disease. *Am J Pathol.* 2006;**168**(4):1309-20
64. Sikora J, Majer F, Kalina T. LAMP2 flow cytometry in peripheral white blood cells is an established method that facilitates identification of heterozygous Danon disease female patients and mosaic mutation carriers. *J Cardiol* 2015;**66**(1):88–9.
65. Givertz MM, Mann DL. Epidemiology and natural history of recovery of left ventricular function in recent onset dilated cardiomyopathies. *Curr Heart Fail Rep* 2013;**10**(4):321–30.
66. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000 Feb 29 - . Identifier NCT03882437, Gene Therapy for Male Patients With Danon Disease Using RP-A501; AAV9.LAMP2B; 2019 Mar 20 [cited 2020 Jan 12]. Available from:  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03882437>
67. Cetin H, Wöhrer A, Rittelmeyer I, Gencik M, Zulehner G, Zimprich F, Ströbel T, Zimprich A. The c.65-2A>G splice site mutation is associated with a mild phenotype in Danon disease due to the transcription of normal LAMP2 mRNA. *Clin Genet* 2016;**90**:366–371.
68. van der Kooi AJ, van Langen IM, Aronica E, van Doorn PA, Wokke JHJ, Brusse E, Langerhorst CT, Bergin P, Dekker LRC, dit Deprez RH, de Visser M. Extension of the clinical

- spectrum of Danon disease. *Neurology Apr* 2008;**70**(16):1358–1359.
69. Zou Y, Liu Q, Chen B et al. Mutation in *CUL4B*, which encodes a member of cullin-RING ubiquitin ligase complex, causes X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 2007; 80: 561-566.
  70. Jiang B, Zhao W, Yuan J et al. Lack of Cul4b, an E3 ubiquitin ligase component, leads to embryonic lethality and abnormal placental development. *PLoS One* 2012; 7: e37070.
  71. Costanzo MR, Mills RM, Wynne J. Characteristics of "Stage D" heart failure: insights from the Acute Decompensated Heart Failure National Registry Longitudinal Module (ADHERE LM). *Am Heart J* 2008;**155**(2):339-47.
  72. Zannad F, Briancon S, Juilliere Y, Mertes PM, Villemot JP, Alla F, Virion JM. Incidence, clinical and etiologic features, and outcomes of advanced chronic heart failure: the EPICAL Study. *Epidemiologie de l'Insuffisance Cardiaque Avancee en Lorraine. J Am Coll Cardiol* 1999; **33**(3): 734–742.

## **8 Seznam publikací doktoranda**

### **8.1 Publikace *in extenso*, které jsou podkladem dizertace**

1. **Gurka J**, Piherova L, Majer F, Chaloupka A, Zakova D, Pelak O, Krebsova A, Peichl P, Krejci J, Freiberger T, Melenovsky V, Kautzner J, Kalina T, Sikora J, Kubanek M.

Danon disease is an underdiagnosed cause of advanced heart failure in young female patients: a LAMP2 flow cytometric study. *ESC Heart Fail.* 2020;**7**(5):2534-2543.

2. Majer F, Kousal B, Dusek P, Piherova L, Reboun M, Mihalova R, **Gurka J**, Krebsova A, Vlaskova H, Dvorakova L, Krihova J, Liskova P, Kmoch S, Kalina T, Kubanek M, Sikora J. Alu-mediated Xq24 deletion encompassing CUL4B, LAMP2, ATP1B4, TMEM255A, and ZBTB33 genes causes Danon disease in a female patient. *Am J Med Genet A.* 2020;**182**(1):219-223.
3. Kousal B, Majer F, Vlaskova H, Dvorakova L, Piherova L, Meliska M, Langrova H, Palecek T, Kubanek M, Krebsova A, **Gurka J**, Stara V, Michaelides M, Kalina T, Sikora J, Liskova P. Pigmentary retinopathy can indicate the presence of pathogenic LAMP2 variants even in somatic mosaic carriers with no additional signs of Danon disease. *Acta Ophthalmol.* 2021;**99**(1):61-68.
4. Vojtičková L, Kubánek M, Bínová J, **Gurka J**, Hegarová M, Podzimková M, Hošková L, Krebsová A, Málek I, Melenovský V, Netuka I, Kautzner J, Pařízek A. Těhotenství u pacientek se srdečním selháním na podkladě preexistující kardiomyopatie a po transplantaci srdce. *Cor Vasa* 2022;**64**:381–389.

## Publikace bez vztahu k tématu dizertace

1. Yu FPS, Islam D, Sikora J, Dworski S, **Gurka J**, López-Vásquez L, Liu M, Kuebler WM, Levade T, Zhang H, Medin JA. Chronic lung injury and impaired pulmonary function in a mouse model of acid ceramidase deficiency. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2018;**314**(3):L406-L420.
2. Musalkova D, Sticova E, Reboun M, Sokolova J, Krijt J, Honzikova J, **Gurka J**, Neroldova M, Honzik T, Zeman J, Jirsa M, Dvorakova L, Hrebicek M. Variable X-chromosome inactivation and enlargement of pericentral glutamine synthetase zones in the liver of heterozygous females with OTC deficiency. *Virchows Arch*. 2018;**472**(6):1029-1039.
3. Yu FPS, Sajdak BS, Sikora J, Salmon AE, Nagree MS, **Gurka J**, Kassem IS, Lipinski DM, Carroll J, Medin JA. Acid Ceramidase Deficiency in Mice Leads to Severe Ocular Pathology and Visual Impairment. *Am J Pathol*. 2019;**189**(2):320-338.
4. Magicova M, Zahradka I, Fialova M, Neskudla T, **Gurka J**, Modos I, Hojny M, Raska P, Smejkal P, Striz I, Viklicky O. Determinants of Immune Response to Anti-SARS-CoV-2 mRNA Vaccines in Kidney Transplant Recipients: A Prospective Cohort Study. *Transplantation*. 2022;**106**(4):842-852.

5. Schmalz M, Vankova H, Rajnochova-Bloudickova S, Hrubá P, Fialova M, **Gurka J**, Magicova M, Striz I, Zahradka I, Viklicky O. The impact of frailty syndrome on humoral response to SARS-CoV-2 mRNA vaccines in older kidney transplant recipients. *Int Urol Nephrol.* 2023;**55**(11):2959-2965.