

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce



Studium molekulární podstaty vybraných dědičně podmíněných onemocnění

Mgr. Hana Hartmannová

2013

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc

Školící pracoviště: Ústav dědičných metabolických poruch

Školitel: Ing. Stanislav Kmoch, CSc.

Disertační 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.

Obsah

Obsah	2
Abstrakt	3
Abstract	4
Úvod.....	5
Cíle práce.....	6
Nové metody sekvenování genomu	6
Identifikace kauzálních genů a mutací a studium molekulární podstaty vybraných vzácných onemocnění v Ústavu dědičných metabolických poruch v letech 1996 – 2013	8
Závěr	15
Použitá literatura.....	16
Seznam publikací, které jsou podkladem dizertace	18
Seznam publikací bez vztahu k tématu dizertace	19

Abstrakt

Vzácná onemocnění jsou klinicky a geneticky heterogenní skupinou onemocnění postihující různé orgány a projevující se v různém věku. Nalézání, charakterizace a studium funkčních dopadů genetických příčin vzácných onemocnění je efektivním nástrojem odhalování funkce lidských genů a genových produktů a otevírá cestu k pochopení molekulárně-biologických mechanismů jednotlivých onemocnění. Znalost příčin a mechanismů vzniku vzácných onemocnění je následně východiskem pro jejich efektivní diagnostiku, cílenou léčbu a prevenci a zároveň poskytuje i poznatky pro pochopení genetických a molekulárních příčin komplexních onemocnění.

Tato dizertační práce dokumentuje základní koncepční a metodický vývoj postupů biochemické genetiky, funkčního klonování, genetického mapování, pozičního klonování, DNA čipů a genomového sekvenování, které jsou dnes základními nástroji efektivního studia všech geneticky podmíněných onemocnění. Rychlý technologický vývoj a praktická využitelnost řady těchto technik je demonstrována na případech studia molekulární podstaty několika vzácných chorob - deficitu adenylosukcinát lyázy, mukopolysacharidózy typu IIIC, Rotorova syndromu, deficitu ATP syntázy, adultní formy neuronální ceroidní lipofuscinózy, GAPO syndromu a X-vázané restriktivní kardiomyopatie, na jejichž objasnění jsem se během svého studia podílela.

Abstract

Rare diseases represent a clinically and genetically heterogeneous group of diseases affecting various organs and presenting at different ages. Identification and functional characterization of genetic defects causing individual rare diseases represent unique opportunity to understand biological functions of human genes and gene products as well as to basic pathogenetic mechanisms of individual diseases. This knowledge is prerequisite for their effective diagnosis, specific treatment and prevention and it also opens up an avenue for better understanding of complex diseases.

My thesis documents basic conceptual and methodological developments of biochemical genetics, functional cloning, genetic mapping, positional cloning, DNA microarrays and genomic sequencing, which have provided a universal framework for effective characterization of the genetic architecture of almost all human diseases. This conceptual and technological developments are demonstrated on several cases of rare genetic diseases - adenylosuccinate lyase deficiency, mucopolysaccharidosis type IIIC, Rotor syndrome, deficiency of ATP synthase, neuronal ceroid lipofuscinosis, GAPO syndrome and X -linked restrictive cardiomyopathy, which genetic and molecular basis I have helped to elucidate.

Úvod

Vzácná onemocnění jsou definována jako onemocnění, jejichž prevalence je v Evropě menší než 1:2000 a v USA menší než 1:1250 (Remuzzi G. and Garattini S., 2008). Odhaduje se, že existuje přes 7 000 vzácných chorob (Heemstra H. E. *et al.*, 2009). Ve velké většině se jedná o onemocnění dědičně podmíněná, způsobená mutacemi jednotlivých genů. Mohou postihovat pacienty již od velmi útlého věku, projevovat se těžkým fyzickým či mentálním postižením výrazně zhoršujícím kvalitu života pacientů a jejich rodin (Dear J. W. *et al.*, 2006). Celkový počet pacientů trpících vzácným onemocněním se v Evropě odhaduje na 30 milionů, v Severní Americe na 25 milionů (Schieppati A. *et al.*, 2008).

Vzácná onemocnění jsou velmi heterogenní skupinou nemocí postihující různé orgány a mající nejrůznější klinické projevy. Vyskytují se jak velmi vzácně, pouze u několika pacientů na světě, tak i častěji. Příkladem častějšího onemocnění je cystická fibróza (1:2700-3800) nebo narkolepsie s kataplexií s incidencí 1:2000 (Dear J. W. *et al.*, 2006). Příkladem méně častého metabolického onemocnění je metylmalonová acidurie s frekvencí výskytu 1:50000 nově narozených dětí.

Znalosti o molekulární podstatě jednotlivých chorob, z nich plynoucí případné možnosti diagnostiky a následné léčby, jsou velmi malé, pacienti tak získávají jen málo informací o chorobě, kterou trpí. Často podstupují ve snaze o zjištění diagnózy náročná vyšetření. V současné době existuje léčba pro pouhých 5% chorob (Rohn J., 2013).

Studium vzácných onemocnění bylo dlouhodobě podceňováno, neboť postihovalo jen malou skupinu pacientů, jejich výzkum se proto jevil jako finančně nevýhodný. Až v roce 1983 byla založena organizace National Organisation of Rare Disorders (NORD), která se začala významně podílet na podpoře výzkumu způsobu léčby vzácných onemocnění. V Evropě pacienty se vzácnými onemocněními zastupuje nevládní organizace EURORDIS (Rare Diseases Europe), která sdružuje 561 organizací z 51 zemí. Tato uskupení se snaží zlepšit kvalitu života pacientů s vzácným onemocněním a jejich blízkých.

Studium vzácných onemocnění významně přispívá k pochopení základní biologie, definuje kauzální geny a může pomoci vysvětlit jejich biologickou funkci, neboť funkce většiny genů je stále neznámá.

Cíle práce

Teoretická část této dizertační práce dokumentuje základní koncepční a metodický vývoj postupů funkčního klonování, pozičního klonování, DNA čipů a genomového sekvenování, které postupně objasnilo více než 3 000 různých typů vzácných onemocnění a jsou dnes základním metodickým nástrojem efektivního studia jak vzácných, tak i populačně častých, geneticky podmíněných onemocnění.

Experimentální část dizertační práce demonstruje rychlý technologický vývoj a praktickou využitelnost řady těchto technik na příkladech několika vzácných chorob - deficitu adenylosukcinát lyázy, mukopolysacharidózy typu IIIC, Rotorova syndromu, deficitu ATP syntázy, neuronální ceroidní lipofuscinózy, GAPO syndromu a X-vázané restriktivní kardiomyopatie, na jejichž výzkumu jsem se během svého studia podílela.

Hlavní cíle:

1. Rozvoj technologie DNA čipu a její využití při studiu vzácných onemocnění.
2. Zavedení a využití postupu genetického mapování a pozičního klonování při studiu vzácných onemocnění.
3. Zavedení a využití celoexomového sekvenování.
4. Identifikace kauzálních genů a mutací a studium molekulární podstaty vybraných vzácných onemocnění (deficit ADSL, deficit ATP syntázy, MPSIIIC, Rotorův syndrom, ANCL, GAPO syndrom, X-vázaná restriktivní hypertrofická kardiomyopatie).

Nové metody sekvenování genomu

Velká většina vzácných onemocnění je způsobena mutacemi jednotlivých genů či funkčně významných genetických elementů. Základním východiskem pro efektivní studium těchto onemocnění je proto určení jejich kauzální genetické příčiny.

Sekvenování DNA je dnes jednou z hlavních metod molekulární biologie a genetiky. Znalost sekvence a její analýza umožňují předpovědět řadu základních vlastností kódovaných studovaným fragmentem (předpověď rozpoznávacích sekvencí restriktivních a DNA modifikujících enzymů, sekvencí DNA vazebných proteinů, detekce mutací, předpověď struktury genu a sekvence příslušného transkriptu a proteinu, původ a příbuznost studovaného fragmentu apod.). Obdobně znalost sekvence celého genomu umožňuje předpovědět řadu základních vlastností celého organismu. Nové metody sekvenování DNA umožnily analýzu

desetitisíců genomů případně jejich protein-kódujících oblastí. Tento vývoj odhalil základní strukturu genetické variability člověka a významným způsobem zjednodušil vyhledávání vzácných genetických mutací způsobujících vzácná onemocnění. Současný přístup určení genetických příčin vzácných onemocnění vychází z univerzálního konceptu porovnávání sekvence genomu postižených jedinců s genetickou variabilitou různých populací. U vzácných onemocnění je výsledkem takového porovnání určení populačně vzácných či privátních genetických variant studovaných jedinců. Tyto varianty jsou následně hodnoceny na základě obecného genetického modelu onemocnění a segregace jednotlivých variant se studovaným onemocněním v rodině. Významným faktorem je opakovaný výskyt vzácných variant ve vybraném kandidátním genu u nepříbuzných pacientů. Další možnosti poskytuje též analýza mezidruhové sekvenční konzervovanosti, předpokládaného efektu nalezených variant a funkční anotace genů s nalezenými variantami. Vhodným doplňkem kvalifikované analýzy a výběru kandidátních genů je též poziční informace definovaná např. paralelně provedeným genetickým mapováním, analýza RNA v postižených tkáních či tkáňových kulturách. Výsledkem takového postupu je určení omezeného počtu kandidátních genů a variant, jejichž kauzalita musí být ve většině případů ještě následně studována a charakterizována pomocí vhodných biochemických, molekulárně biologických či histopatologických metod.

Sangerova metoda sekvenování sehrála důležitou roli v genomových projektech, včetně projektu lidského genomu. Prudký rozvoj funkční a komparativní genomiky, rozšíření palety aplikací v diagnostice a perspektivy personalizované medicíny podnítily snahy o vývoj alternativních sekvenačních technologií, jejichž cílem je získávání dat podstatně rychlejším a levnějším způsobem. Nová generace sekvenačních technologií (next generation sequencing, NGS) využívá metody založené na různých principech- ligace oligonukleotidů (sequencing by ligation), syntézy DNA (sequencing by synthesis), hybridizace nukleových kyselin (sequencing by hybridization) nebo sekvenování pomocí nanoporů (nanopore sequencing). Všechny tyto technologie jsou v současné době dostupné.

Nové metody sekvenování DNA umožnily analýzu desetitisíců genomů případně jejich protein-kódujících oblastí. Tento vývoj odhalil základní strukturu genetické variability člověka a významným způsobem zjednodušil vyhledávání vzácných genetických mutací způsobujících vzácná onemocnění.

Současný přístup určení genetických příčin vzácných onemocnění vychází z univerzálního konceptu porovnávání sekvence genomu postižených jedinců s genetickou variabilitou různých populací.

Identifikace kauzálních genů a mutací a studium molekulární podstaty vybraných vzácných onemocnění v Ústavu dědičných metabolických poruch v letech 1996 – 2013

Studium molekulární podstaty deficitu adenylosukcinát lyázy

Deficit adenylosukcinát lyázy (ADSL) (OMIM 103050) je metabolická porucha *de novo* syntézy purinů a purin-nukleotidového cyklu popsána v roce 1984 (Jaeken J. and Vandenberghe G., 1984). Patogenetické mechanismy, které vedou k rozvoji individuálních klinických symptomů a způsobují fenotypovou heterogenitu, zůstávají nejasné. Hlavní patogenetický efekt je přisuzován hromadění toxických defosforylovaných substrátů ADSL – sukcinyladenosinu (S-Ado) a sukcinylaminoimidazolkarboxamidribosidu (SAICAR) v mozkomíšním moku a moči (Stone T. W. *et al.*, 1998). Typickými příznaky deficitu ADSL jsou vážné neurologické symptomy jako psychomotorická retardace, epilepsie, hypotonie a autismus. Stupeň postižení je u jednotlivých pacientů různý a klinicky klasifikovány jsou tři typy tohoto onemocnění.

V předkládané práci se nám metodou CapFinder podařilo identifikovat úplnou sekvenci genu *ADSL* včetně jeho izoform (GenBank, AF067853). Provedli jsme první podrobnou studii 7 pacientů s deficitem ADSL zahrnující podrobný klinický popis, biochemickou charakterizaci pacientů a identifikovali jsme mutace podmiňující deficit ADSL. V souvislosti s uvedenou studií jsme zároveň identifikovali a určili sukcinyladenosin jako normální složku likvoru (Krijt J. *et al.*, 1999), naznačili možnou roli sukcinylpurinů v patogenezi postižení centrální nervové soustavy, jak u deficitu ADSL, tak u deficitu fumarázy (Zeman J. *et al.*, 2000) a využili dostupnosti rekombinantního lidského enzymu k přípravě substrátů a jejich defosforylovaných produktů nezbytných pro studium patogeneze deficitu ADSL (Zikanova M. *et al.*, 2005).

Díky nově vyvinutému diagnostickému přístupu (Krijt J. *et al.*, 1999) se nám podařilo shromáždit největší světový soubor pacientů <http://www1.lf1.cuni.cz/udmp/adsl/>. Tento soubor zahrnuje pacienty s různou tíží klinického postižení a je zdrojem pro studium

patogenetických mechanismů vzniku tohoto onemocnění a pro studium základních biologických mechanismů vzniku a funkce purinozómu.

Rozvoj technologie DNA čipu a její využití při studiu vzácných chorob.

V Ústavu dědičných metabolických poruch 1.LF UK a VFN v Praze (ÚDMP) byl v roce 1998 ve spolupráci s firmou GeneAge Technologies navržen, vyroben a testován přístroj pro tisk DNA čipů, GeneSurfer. Zavedli jsme technologii přípravy skel a sond tak, že jsme byli schopni připravit v jednom cyklu až 60 čipů a nanést sondy o maximální hustotě 4900 sond/cm². Podařilo se nám zoptimalizovat metodu imobilizace sond na povrch, metodu přípravy fluorescenčně značených vzorků a metody obrazové analýzy a statistického zpracování.

DNA čipy vlastní výroby byly na ÚDMP využity v rámci několika projektů. Projekt h-MitoArray byl určen pro studium exprese genů u mitochondriálních chorob. Pomocí tohoto čipu byla studována genová exprese u pacientů s izolovaným deficitem ATP syntázy, u kterých byla následně identifikována mutace v genu *TMEM70*.

H-MitoArray obsahoval sadu 1632 genů, z nichž 992 bylo mitochondriálních, 42 lysozomálních, 277 asociovaných s apoptózou a 321 genů účastnících se karcinogeneze, dále 146 housekeeping genů a 10 genů *Arabidopsis thaliana*, které sloužily jako nástroj vnitřní kalibrace a normalizace. H-MitoArray byl využit ke studiu genové exprese u fibroblastů 13 pacientů s popsáním defektem F1Fo syntázy a 9 kontrol. Na základě porovnání expresních profilů, funkční anotace, metod genového obohacení a analýzy metabolických drah byly vzorky pacientů rozčleněny do tří skupin. První skupina vyčlenila fibroblasty pacientů se známou mutací v mitochondriální DNA; expresní profil poukazoval na supresi mitochondriální biogeneze a metabolismu a sníženou expresi genů regulujících přechod z G1 do S fáze. Tyto výsledky podpořily hypotézu o regulaci buněčného cyklu mitochondriemi na transkripční a posttranskripční úrovni (Gemin A. *et al.*, 2005; Mandal S. *et al.*, 2005). U druhé skupiny dominovaly v expresním profilu známky aktivované apoptózy a oxidativního stresu, tedy charakteristiky buněčného stárnutí (Shelton D. N. *et al.*, 1999; Stockl P. *et al.*, 2006). Třetí skupina byla i po stránce expresních profilů velmi heterogenní, což odpovídalo i její klinické a biochemické variabilitě. Výsledky expresních studií na h-MitoArray byly verifikovány provedením stejných experimentů na komerční platformě Agilent Human 44k array a byla zjištěna vysoká korelace mezi výsledky obou platform. Byl

tak vytvořen cenově výhodný spolehlivý „custom“ DNA čip, který v dané době doplňoval nedostatečné pokrytí mitochondriálních genů u komerčních čipů.

V ÚDMP jsme měli také možnost studovat pacienty s mukopolysacharidózou typu IIIC (MPSIIIC, Sanfilippo syndrom C, OMIM #252930). Jedná se o vzácné autozomálně recesivní lysozomální střádavé onemocnění. Měli jsme k dispozici celkem pět pacientů ze čtyř nepříbuzných rodin, u nichž bylo onemocnění diagnostikováno na základě biochemického vyšetření aktivity N-acetyltransferázy (Voznyi Ya V. *et al.*, 1993). U všech rodin byla provedena vazebná analýza pomocí STR markerů, zároveň bylo na spolupracujícím pracovišti v Montrealu provedeno genotypování 22 mikrosatelitních markerů u 60 pacientů a 44 nepostižených příbuzných. Tyto analýzy zúžily kandidátní oblast na interval 2,6 cM na chromozomu 8 mezi markery D8S1051 a D8S1831. Tento interval obsahoval 32 známých a predikovaných genů. Díky zavedené metodě přípravy vlastních DNA čipů pomocí robotického přístroje jsme navrhli expresní čip, který obsahoval oligonukleotidové sondy genů z kandidátní oblasti. Provedli jsme tak analýzu genové exprese v leukocytech dvou pacientů a čtyř zdravých kontrol. Výsledky ukázaly sníženou expresi transkriptu genu *TMEM76* u obou pacientů ve srovnání se zdravými kontrolami. Gen *TMEM76* byl také vybrán jako kandidátní gen na základě jeho charakteristik lysozomálního transmembránového glykoproteinu o velikosti odpovídající částečně purifikovanému enzymu (Ausseil J. *et al.*, 2004). Sekvenováním kandidátního genu byly pak identifikovány patogenní mutace v genu *TMEM76* nejprve u pěti studovaných českých pacientů, později celkem u třiceti rodin. Jednalo se o 4 nonsense mutace, 14 missense mutací, 3 mutace způsobující posun čtecího rámce a 6 sestřihových mutací. Funkční význam genu *TMEM76* v patogenezi mukopolysacharidózy typu IIIC byl dále potvrzen funkčními expresními studiemi provedených na patientských fibroblastech.

DNA čipy byly v ÚDMP použity i pro metodu komparativní genomové hybridizace, a to při studiu molekulární podstaty Rotorova syndromu (Hrebicek M. *et al.*, 2007).

Expresní čipy připravené na ÚDMP našly využití také v zemědělství. Ve spolupráci s Jihočeskou Universitou v Českých Budějovicích jsme vytvořili oligonukleotidový čip schopný efektivně a spolehlivě detekovat viry v listech brambor (Sip M. *et al.*, 2010).

Využití postupu genetického mapování a pozičního klonování

Vzhledem k tomu, že analýza genové exprese u pacientů s izolovaným defektem ATP syntázy nepřinesla jasné kandidátní geny pro přímé sekvenování, pokračovali jsme v dalším studiu. U osmi pacientů, jejich sourozenců a rodičů ze sedmi rodin jsme provedli vazebnou

analýzu a homozygotní mapování. Tyto analýzy ukázaly jedinou homozygotní oblast na chromozomu 8 sdílenou všemi pacienty. Propojením těchto výsledků s výsledky genové exprese bylo zjištěno, že pouze jediný gen z této oblasti - *TMEM70* měl ve fibroblastech u všech pacientů sníženou expresi v porovnání s kontrolními buňkami. Sekvenováním tohoto genu byla u všech pacientů nalezena homozygotní substituce c.317-2A>G lokalizovaná v sestřihovém místě exonu 2. Dalšími studiemi bylo prokázáno, že tato mutace vede k abnormálnímu sestřihu a následné degradaci mRNA mechanismem nonsense-mediated decay. Pomocí PCR-RFLP analýzy jsme prokázali přítomnost homozygotní mutace u 23 pacientů z celkového počtu 25. Kauzalita této mutace byla prokázána komplementační studií, obnovením funkce ATP syntázy po vnesení wild-type *TMEM70* do fibroblastů pacientů. Identifikovali jsme *TMEM70* jako protein účastnící se u vyšších eukaryot biogeneze ATP syntázy a prokázali jsme, že porucha *TMEM70* je relativně častá u pacientů s poruchou tvorby energie.

Další onemocnění, kterým jsme se v ÚDMP zabývali, byl Rotorův syndrom (RS, MIM237450), autozomálně recesivní onemocnění, které se projevuje konjugovanou hyperbilirubinémií, koproporfyriurií a sníženou absorpcí diagnostických sloučenin játry s prodlouženou dobou odbourávání nekonjugovaných anionických diagnostických barev a při cholescintigrafii nedochází k zobrazení jater a žlučových. Homozygotní mapování pacientů z osmi rodin odhalilo jedinou homozygotní oblast na chromozomu 12. Po provedení analýzy změn počtu kopií byly u dvou haplotypů objeveny homozygotní delece- u prvního haplotypu delece v genu *SLCO1B3* a u druhého zasahovala delece geny *SLCO1B3*, *SLCO1B1* a *LST-3TM12*. Následná sekvenační analýza odhalila patogenní mutace v genech *SLCO1B3* a *SLCO1B1*, u každého haplotypu byly přítomny mutace nebo delece vždy v obou genech. Předpokládaným důsledkem změn byly vážné změny exprese proteinů či jejich úplná absence. Pro zjištění závažnosti onemocnění byly provedeny funkční studie. Imunochemická barvení jaterních biopsií pacientů prokázala nepřítomnost proteinů OATP1B1 a OATP1B3 kódovanými geny *SLCO1B3* a *SLCO1B3*. Proteiny OATP1B3 a OATP1B1 jsou transportéry organických anionických sloučenin, jsou lokalizovány na sinusoidní membráně hepatocytů a účastní se přenosu řady sloučenin, jako jsou konjugovaný bilirubin, žlučové kyseliny, steroidy, tyroidní hormony, některé léky, toxiny a jejich konjugáty (Hagenbuch and Meier 2004, Hagenbuch and Gui 2008). Tato studie je významná nejen objevením podstaty RS, ale má také širší klinický dopad. Přestože je výskyt kombinace defektů v obou genech velmi vzácný, výskyt mutací v jednom nebo druhém genu je v populaci mnohem častější. Jedinici

s mutacemi v proteinu OATP1B1 nebo OATP1B3 mohou vykazovat hypersenzitivitu na látky transportované těmito přenašeči, například na běžně užívané statiny. Souvislost variant v genu *SLCO1B1* se statiny indukovanou myopatií již byla popsána na základě celogenomových populačních studií (Link E. *et al.*, 2008).

Exomové sekvenování

Celoexomové sekvenování umožňuje objasnit také genetickou podstatu sporadických onemocnění a vzácných syndromů. Často se jedná o jednotky či desítky nepříbuzných pacientů s daným syndromem či onemocněním. Výhodné je proto provádět celoexomové sekvenování rodičů a postiženého jedince, výsledný seznam kandidátních variant filtrovat s ohledem na možné typy dědičnosti, na přítomnost variant nepřítomných u rodičů. V případě, že pro analýzu nejsou k dispozici vzorky rodičů postiženého jedince, lze výsledky porovnat s variabilitou v populaci.

Pro studium molekulární podstaty adultní formy neuronální ceroidní lipofuscinózy (ANCL) byla použita kombinace vazebné analýzy, expresní analýzy a exomového sekvenování. Genomová DNA všech dostupných členů rodiny byla nejprve použita pro genotypování a vazebnou analýzu. Identifikovali jsme pět kandidátních oblastí na chromozomech 1, 4, 15, 20 a 22 obsahujících zhruba 560 známých genů. U sedmi dostupných pacientů bylo dále provedeno genotypování a analýza změn počtu kopií, nenalezli jsme však žádné potenciálně patogenní rozsáhlejší delece nebo duplikace. Paralelně jsme provedli analýzu genové exprese z leukocytů čtyř pacientů a čtyř kontrol, získali jsme seznam rozdílně exprimovaných genů, z nichž 65 leželo v oblastech identifikovaných vazebnou analýzou. Funkční anotace a analýza genového obohacení (gene enrichment analysis) ukázaly významnou dysregulaci spliceosomu, upregulaci mnoha složek respiračního řetězce, změněnou expresi genů aktivních u neurodegenerativních chorob, tyto údaje však stále nebyly dostačující pro nalezení mutace v kauzálním genu. Proto jsme se rozhodli sekvenovat celý exom jednoho pacienta na sekvenátoru SOLiDTM4 v Německu. Byl identifikován kandidátní gen *DNAJC5* ležící v oblasti na chromozomu 20q13.33, jehož exprese byla v leukocytech pacienta statisticky významně zvýšena ve srovnání s kontrolami a který obsahoval unikátní heterozygotní mutaci c.346_348delCTC (p. Leu116del). Segregace této záměny byla ověřena u ostatních členů rodiny Sangerovým sekvenováním. Funkční studie prokázaly mutace v genu *DNAJC5* jako příčinou ANCL.

Vzhledem k tomu, že identifikací mutací v genu *DNAJC5* byla objasněna zhruba čtvrtina případů, které jsme měli k dispozici, rozhodli jsme se použít podobný přístup, jaký

byl popsán v předchozí studii, i u další rodiny, která nám byla zaslána s diagnózou autozomálně dominantní Kufsovy choroby (Noskova L. *et al.*, 2011). Vazebnou analýzou bylo nalezeno 14 kandidátních oblastí s pozitivním LOD skóre na chromosomech 3, 4, 8, 9, 10, 13, 14, 16 a 19. Zároveň jsme u jednoho pacienta provedli analýzu změn počtu kopií pomocí Affymetrix GeneChip Mapping 6.0 Array a nenalezli jsme žádné potenciálně patogenní rozsáhlejší delece nebo duplikace. Následně jsme u dvou pacientů a jednoho nepostiženého příbuzného provedli exomové sekvenování na sekvenátoru SOLiD™4 System v ÚDMP. Po propojení dat exomového sekvenování s informacemi z vazebné analýzy jsme získali seznam sedmi jednonukleotidových záměn, ve kterém jsme jako prioritní kandidátní mutaci označili heterozygotní mutaci c.509C>T (p.Ser170Phe) v genu presenilin 1 (*PSEN1*). Zároveň byl díky funkční anotaci variant nalezených exomovým sekvenováním u všech pacientů identifikován známý polymorfismus c.C173>T (rs17571) v genu kathepsin D (*CTSD*). Tato studie neodhalila další kauzální gen pro adultní formu NCL, rodina zařazena do souboru byla nesprávně diagnostikována a byla u ní identifikována již známá mutace podmiňující Alzheimerovu chorobu.

Dalším studovaným onemocněním byl GAPO syndrom (OMIM 230740) (Growth retardation, Alopecia, Pseudoanodontia, and progressive Optic atrophy), vzácné autozomálně recesivní onemocnění, které je popisováno jako komplex růstové retardace, alopecie, pseudoanodoncie s progresivní optickou atrofií. Doposud bylo popsáno kolem třiceti případů na celém světě (Demirgunes E. F. *et al.*, 2009; Goloni-Bertollo E. M. *et al.*, 2008; Kocabay G. and Mert M., 2009; Nanda A. *et al.*, 2010; Sayli B. S. and Gul D., 1996; Tipton R. E. and Gorlin R. J., 1984). Většina jedinců s tímto onemocněním pochází z příbuzenských svazků. Nejprve jsme provedli analýzu počtu kopií a homozygotní mapování pomocí Affymetrix GeneChip Mapping 6.0 Array. U pacienta ani u rodičů nebyly zjištěny žádné inserce nebo delece, byly identifikovány dvě homozygotní oblasti na chromozomech 2 a 4. Následně bylo provedeno celoexomové sekvenování pacienta i rodičů na sekvenátoru SOLiD™4. Analýza exomových dat ukázala celkem 121 kandidátních variant splňujících kritérium autozomálně recesivní dědičnosti, pouze jedna varianta se vyskytovala v homozygotní oblasti vymezené homozygotním mapováním. Jednalo se o homozygotní záměnu v genu pro antrax toxin receptor 1 (*ANTXR1*) vedoucí k vytvoření předčasného stop kodonu v exonu 7 (c.C505>T; p.R169X). Mutace nebyla přítomna v žádných běžně dostupných databázích. Díky mezinárodní spolupráci se podařilo vytvořit rozsáhlejší soubor pacientů s tímto syndromem, u nichž byla nalezena homozygotní mutace v genu *ANTXR1*

(c.C262>T; p.R88X a sestřihová mutace c.1435–12A>G). Funkční studie provedené na fibroblastech a tkáních pacientů s předčasným stop kodonem ukázaly významné snížení množství transkriptu *ANTXR1* a absenci proteinu ve tkáních, ta byla potvrzena imunohistochemicky i pomocí analýzy Western blot. Imunofluorescenční analýza ukázala u GAPO pacientů výraznou změnu v organizaci aktinových cytoskeletárních mikrofilament. Lze předpokládat, že *ANTXR1* je zásadní pro uspořádání aktinových vláken, narušení aktinové sítě by mohlo být příčinou patologických jevů popsanych u GAPO syndromu.

Zatím posledním studovaným onemocněním byla X-vázaná restriktivní hypertrofická kardiomyopatie. Výzkum byl zaměřen na rodinu, v níž byli tři muži postiženi hypertrofickou kardiomyopatií asociovanou s těžkou dysfunkcí levé komory srdeční. Vzhledem ke známé genetické heterogenitě familiárních kardiomyopatií, jsme provedli celoexomové sekvenování na sekvenátoru SOLiD™4 u dvou postižených chlapců a jejich matky.

Ze sekvenačních dat jsme následným filtrováním získali jedinou potenciálně patogenní variantu - inzerci c.599_600insT v exonu 6 genu *FHL1*. (NM_001159702). *FHL1* kóduje four-and-a-half-LIM-domain protein 1 (FHL1), je transkribován do tří alternativně sestřižených izoform, translatovaných do proteinů FHL1A, FHL1B a FHL1C. Nejčastěji se vyskytuje izoforma FHL1A, která je exprimována především v kosterním svalu, méně již ve svalu srdečním. Inzerce c.599_600insT v exonu 6 genu *FHL1* způsobuje posun čtecího rámce translatovaných izoform FHL1A a FHL1B, v obou případech vzniká předčasný stop kodón.

K charakterizaci identifikované mutace jsme provedli expresní analýzu *FHL1* izoform a potvrdili přítomnost FHL1 proteinů v tkáních pacientů a kontrol. Provedli jsme kvantitativní PCR a RT-PCR analýzu z celkové RNA a Western blot analýzu z homogenátů proteinů zmrazených srdečních tkání. Tyto analýzy ukázaly, že identifikované mutace nemají vliv na transkripci, sestřih a stabilitu *FHL1* mRNA a potvrdily přítomnost jediného RT-PCR produktu odpovídajícího FHL1A izoformě. Sangerovo sekvenování potvrdilo sekvenci této izoformy a zároveň přítomnost inzerce c.599_600insT vedoucí k posunu čtecího rámce. WB analýza srdečních homogenátů ukázala přítomnost imunoreaktivního proteinu odpovídajícího molekulární hmotnosti 27 kDa, předpokládaného zkráceného proteinu vzniklého posunem čtecího rámce. Imunoreaktivní protein o molekulové hmotnosti 32 kDa odpovídající FHL1A izoformě byl identifikován ve vysoké míře u kontrolních vzorků zatím co u pacientů nebyl nalezen. Žádný imunoreaktivní protein o molekulové hmotnosti 22 kDa odpovídající proteinu FHL1C nebyl detekován ani u kontrol, ani u pacientů. Imunohistochemické barvení potvrdilo

nepřítomnost všech forem imunoreaktivního proteinu pacientů. Naše výsledky vypovídají o různých rolích FHL1 proteinů v kosterním a srdečním svalu. V kosterním svalstvu má FHL1 mnoho funkcí v procesu migrace myoblastů a jejich prodlužování, při aktivaci buněk a inhibici apoptózy myoblastů, regulaci hmoty kosterního svalstva, tvorby sarkomer a Notch signalizaci (Cowling B. S. *et al.*, 2011; Shathasivam T. *et al.*, 2010).

Závěr

Moje práce významně přispěla k zavedení základních molekulárně biologických technik: PCR, klonování, sekvenování a exprese rekombinantních proteinů, celoexomového sekvenování a bioinformatické analýzy v laboratoři Ústavu dědičných metabolických poruch 1. lékařské fakulty UK a VFN v Praze. Zásadně jsem se podílela na zavedení metod genotypování, přípravy oligonukleotidových čipů, na optimalizaci přípravy vzorků a jejich fluorescenčního značení a hybridizačních experimentech, a na zavedení a rozvoji sekvenačních technik pro sekvenátory nové generace. Účastnila jsem se také bioinformatické analýzy výsledků.

Všechny tyto techniky dnes tvoří základní metodické zázemí pro kvalifikované studium molekulární podstaty širokého spektra vzácných onemocnění a umožňují rychlé přenášení metodických přístupů do dalších studií.

Souhrnnými výsledky této práce jsou:

1. Identifikace sekvence genu *ADSL* včetně jeho izoforem a identifikace mutací podmiňujících deficit *ADSL*. Byla provedena první podrobná studie pacientů s deficitem *ADSL* zahrnující podrobný klinický popis a biochemickou charakterizaci pacientů a vývoj nové diagnostické metody.
2. Zavedení čipu H-MitoArray pro studium mitochondriálních onemocnění, s jehož pomocí, v kombinaci s využitím vazebné analýzy a homozygotního mapování byl identifikován kauzální gen *TMEM70* pro vznik izolovaného deficitu ATP syntázy.
3. Identifikace kauzálního genu pro vznik mukopolysacharidózy typu IIIC - *TMEM76*, kombinací vazebné analýzy, genotypování, expresních DNA čipů a sekvenování.
4. Identifikace molekulární podstaty Rotorova syndromu s využitím metody komparativní genomové hybridizace, homozygotního mapování a sekvenování, nalezení delece a mutace v genech *SLCO1B1* a *SLCO1B3*.

5. Identifikace mutací v genu *DNAJC5* jako kauzální příčiny části případů s adultní formou neuronální ceroidní lipofuscinózy pomocí kombinace vazebné analýzy, analýzy genové exprese, analýzy změn v počtu kopií a celoexomového sekvenování.
6. Identifikace mutací v genu *PSENI* a polymorfismu v genu *CTSD* u rodiny původně zařazené do souboru suspektních případů ANCL pomocí metod vazebné analýzy a celoexomového sekvenování.
7. Identifikace mutací v genu *ANTXR1* jako kauzální příčiny GAPO syndromu pomocí kombinace analýzy počtu kopií, homozygotního mapování a celoexomového sekvenování.
8. Identifikace a charakterizace mutace v *FHL1* genu způsobující X-vázanou restriktivní hypertrofickou kardiomyopatii pomocí celoexomového sekvenování a expresní analýzy.

Použitá literatura

- Ausseil J., Loredó-Ostí J. C., Verner A., *et al.*, 2004, *Localisation of a gene for mucopolysaccharidosis IIIC to the pericentromeric region of chromosome 8*. *J Med Genet.* **41**(12): p. 941-945.
- Cowling B. S., Cottle D. L., Wilding B. R., *et al.*, 2011, *Four and a half LIM protein 1 gene mutations cause four distinct human myopathies: a comprehensive review of the clinical, histological and pathological features*. *Neuromuscul Disord.* **21**(4): p. 237-251.
- Dear J. W., Lilitkarntakul P., and Webb D. J., 2006, *Are rare diseases still orphans or happily adopted? The challenges of developing and using orphan medicinal products*. *British Journal of Clinical Pharmacology.* **62**(3): p. 264-271.
- Demirgunes E. F., Ersoy-Evans S., and Karaduman A., 2009, *GAPO syndrome with the novel features of pulmonary hypertension, ankyloglossia, and prognathism*. *Am J Med Genet A.* **149A**(4): p. 802-805.
- Gemin A., Sweet S., Preston T. J., *et al.*, 2005, *Regulation of the cell cycle in response to inhibition of mitochondrial generated energy*. *Biochem Biophys Res Commun.* **332**(4): p. 1122-1132.
- Goloni-Bertollo E. M., Ruiz M. T., Goloni C. B., *et al.*, 2008, *GAPO syndrome: three new Brazilian cases, additional osseous manifestations, and review of the literature*. *Am J Med Genet A.* **146A**(12): p. 1523-1529.
- Heemstra H. E., van Weely S., Buller H. A., *et al.*, 2009, *Translation of rare disease research into orphan drug development: disease matters*. *Drug Discovery Today.* **14**(23-24): p. 1166-1173.
- Hrebicek M., Jirasek T., Hartmannova H., *et al.*, 2007, *Rotor-type hyperbilirubinaemia has no defect in the canalicular bilirubin export pump*. *Liver International.* **27**(4): p. 485-491.
- Jaeken J. and Vandenberghe G., 1984, *AN INFANTILE AUTISTIC SYNDROME CHARACTERIZED BY THE PRESENCE OF SUCCINYL PURINES IN BODY-FLUIDS*. *Lancet.* **2**(8411): p. 1058-1061.

- Kocabay G. and Mert M., 2009, *GAPO syndrome associated with dilated cardiomyopathy: an unreported association*. Am J Med Genet A. **149A**(3): p. 415-416.
- Krijt J., Kmoch S., Hartmannova H., *et al.*, 1999, *Identification and determination of succinyladenosine in human cerebrospinal fluid*. Journal of Chromatography B. **726**(1-2): p. 53-58.
- Link E., Parish S., Armitage J., *et al.*, 2008, *SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy--a genomewide study*. N Engl J Med. **359**(8): p. 789-799.
- Mandal S., Guptan P., Owusu-Ansah E., *et al.*, 2005, *Mitochondrial regulation of cell cycle progression during development as revealed by the tenured mutation in Drosophila*. Dev Cell. **9**(6): p. 843-854.
- Nanda A., Al-Ateeqi W. A., Al-Khawari M. A., *et al.*, 2010, *GAPO syndrome: a report of two siblings and a review of literature*. Pediatr Dermatol. **27**(2): p. 156-161.
- Noskova L., Stranecky V., Hartmannova H., *et al.*, 2011, *Mutations in DNAJC5, encoding cysteine-string protein alpha, cause autosomal-dominant adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis*. Am J Hum Genet. **89**(2): p. 241-252.
- Remuzzi G. and Garattini S., 2008, *Rare diseases: what's next?* Lancet. **371**(9629): p. 1978-1979.
- Rohn J., 2013, *Billions spent on rare diseases*. Nat Biotech. **31**(5): p. 368-368.
- Sayli B. S. and Gul D., 1996, *GAPO syndrome in Turkiye*. Am J Med Genet. **65**(3): p. 252-253.
- Shathasivam T., Kislinger T., and Gramolini A. O., 2010, *Genes, proteins and complexes: the multifaceted nature of FHL family proteins in diverse tissues*. J Cell Mol Med. **14**(12): p. 2702-2720.
- Shelton D. N., Chang E., Whittier P. S., *et al.*, 1999, *Microarray analysis of replicative senescence*. Curr Biol. **9**(17): p. 939-945.
- Schieppati A., Henter J. I., Daina E., *et al.*, 2008, *Why rare diseases are an important medical and social issue*. Lancet. **371**(9629): p. 2039-2041.
- Sip M., Bystricka D., Kmoch S., *et al.*, 2010, *Detection of viral infections by an oligonucleotide microarray*. Journal of Virological Methods. **165**(1): p. 64-70.
- Stockl P., Hutter E., Zwerschke W., *et al.*, 2006, *Sustained inhibition of oxidative phosphorylation impairs cell proliferation and induces premature senescence in human fibroblasts*. Exp Gerontol. **41**(7): p. 674-682.
- Stone T. W., Roberts L. A., Morris B. J., *et al.*, 1998, *Succinylpurines induce neuronal damage in the rat brain*. Adv Exp Med Biol. **431**: p. 185-189.
- Tipton R. E. and Gorlin R. J., 1984, *Growth retardation, alopecia, pseudo-anodontia, and optic atrophy--the GAPO syndrome: report of a patient and review of the literature*. Am J Med Genet. **19**(2): p. 209-216.
- Voznyi Ya V., Karpova E. A., Dudukina T. V., *et al.*, 1993, *A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Sanfilippo disease C (MPS III C)*. J Inherit Metab Dis. **16**(2): p. 465-472.
- Zeman J., Krijt J., Stratilova L., *et al.*, 2000, *Abnormalities in succinylpurines in fumarase deficiency: Possible role in pathogenesis of CNS impairment*. Journal of Inherited Metabolic Disease. **23**(4): p. 371-374.
- Zikanova M., Krijt J., Hartmannova H., *et al.*, 2005, *Preparation of 5-amino-4-imidazole-N-succinocarboxamide ribotide, 5-amino-4-imidazole-N-succinocarboxamide riboside and succinyladenosine, compounds usable in diagnosis and research of adenylosuccinate lyase deficiency*. Journal of Inherited Metabolic Disease. **28**(4): p. 493-499.

Seznam publikací, které jsou podkladem dizertace

Hartmannova H, Kubanek M, Sramko M, Piherova L, Noskova L, Hodanova K, Stranecky V, Pristoupilova A, Sovova J, Marek T, Maluskova J, Ridzon P, Kautzner J, Hulkova H, Kmoch S. (2013) Isolated X-Linked Hypertrophic Cardiomyopathy Caused by a Novel Mutation of the Four-and-a-Half LIM Domain 1 Gene. *Circulation Cardiovascular Genetics*, in press. IF 6,728

Stránecký V, Hoischen A, Hartmannová H, Zaki MS, Chaudhary A, Zudaire E, Nosková L, Barešová V, Přistoupilová A, Hodaňová K, Sovová J, Hůlková H, Piherová L, Hehir-Kwa JY, de Silva D, Senanayake MP, Farrag S, Zeman J, Martásek P, Baxová A, Afifi HH, St Croix B, Brunner HG, Temtamy S, Kmoch S. (2013) Mutations in ANTXR1 cause GAPO syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 92, 792-9. IF 11,202

Noskova, L., V. Stranecky, H. Hartmannova, A. Pristoupilova, V. Baresova, R. Ivanek, H. Hulkova, H. Jahnova, J. van der Zee, J. Staropoli, K. Sims, J. Tynnela, C. Van Broeckhoven, P. Nijssen, S. Mole, M. Elleder & S. Kmoch (2011) Mutations in *DNAJC5*, Encoding Cysteine-String Protein Alpha, Cause Autosomal-Dominant Adult-Onset Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. *American Journal of Human Genetics*, 89, 241-252. IF 11,68

Ehling, R., Noskova, L., Stranecky V., Hartmannova, H., Pristoupilova, A., Hodanova, K, Venke, T. Kovacs, GG., Strobel, T. Niedermuller, U, Wagner, M., Nachbauer, W., Janecke, A., Budka, H., Boesch, S. & Kmoch, S. (2013) Presenile dementia presenting with cerebellar dysfunction in a multigenerational family harbouring the Presenilin1 p.S170F mutation co-segregating with a Cathepsin D polymorphism. *Journal of Neurological Sciences*, accepted for publication. IF 2,353

van de Steeg, E., V. Stranecky, H. Hartmannova, L. Noskova, M. Hrebicek, E. Wagenaar, A. van Esch, D. de Waart, R. Elferink, K. Kenworthy, E. Sticova, M. al-Edreesi, A. Knisely, S. Kmoch, M. Jirsa & A. Schinkel (2012) Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver. *Journal of Clinical Investigation*, 122, 519-528. IF 14,152

Hrebicek, M., T. Jirasek, H. Hartmannova, L. Noskova, V. Stranecky, R. Ivanek, S. Kmoch, D. Cebecauerova, L. Vitek, M. Mikulecky, I. Subhanova, P. Hozak & M. Jirsa (2007) Rotor-type hyperbilirubinaemia has no defect in the canalicular bilirubin export pump. *Liver International*, 27, 485-491. IF 2,559

Cizkova, A., V. Stranecky, R. Ivanek, H. Hartmannova, L. Noskova, L. Piherova, M. Tesarova, H. Hansikova, T. Honzik, J. Zeman, P. Divina, A. Potocka, J. Paul, W. Sperl, J. Mayr, S. Seneca, J. Houstek & S. Kmoch (2008a) Development of a human mitochondrial oligonucleotide microarray (h-MitoArray) and gene expression analysis of fibroblast cell lines from 13 patients with isolated F(1)F(o) ATP synthase deficiency. *Bmc Genomics*, 9. IF 3,926

Cizkova, A., V. Stranecky, J. Mayr, M. Tesarova, V. Havlickova, J. Paul, R. Ivanek, A. Kuss, H. Hansikova, V. Kaplanova, M. Vrbacky, H. Hartmannova, L. Noskova, T. Honzik, Z. Drahota, M. Magner, K. Hejzlarova, W. Sperl, J. Zeman, J. Houstek & S. Kmoch (2008b)

TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalomyopathy. *Nature Genetics*, 40, 1288-1290. IF 30,259

Hrebicek, M., L. Mrazova, V. Seyrantepe, S. Durand, N. Roslin, L. Noskova, H. Hartmannova, R. Ivanek, A. Cizkova, H. Poupetova, J. Sikora, J. Urinovska, V. Stranecky, J. Zeman, P. Lepage, D. Roquis, A. Verner, J. Ausseil, C. Beesley, I. Maire, B. Poorthuis, J. van de Kamp, O. van Diggelen, R. Wevers, T. Hudson, T. Fujiwara, J. Majewski, K. Morgan, S. Kmoch & A. Pshezhetsky (2006) Mutations in *TMEM76** cause mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C syndrome). *American Journal of Human Genetics*, 79, 807-819. IF 12,629

Zikánová M, Krijt J, Hartmannová H, Kmoch S. (2005) Preparation of 5-amino-4-imidazole-N-succinocarboxamide ribotide, 5-amino-4-imidazole-N-succinocarboxamide riboside and succinyladenosine, compounds usable in diagnosis and research of adenylosuccinate lyase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 28, 493-9. IF 1,722

Kmoch S, Hartmannová H, Stibůrková B, Krijt J, Zikánová M, Sebesta I. (2000) Human adenylosuccinate lyase (ADSL), cloning and characterization of full-length cDNA and its isoform, gene structure and molecular basis for ADSL deficiency in six patients. *Human Molecular Genetics*, 12, 1501-13. IF 9,048

Krijt J, Kmoch S, Hartmannová H, Havlíček V, Sebesta I. (1999) Identification and determination of succinyladenosine in human cerebrospinal fluid. *Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications*, 16, 726, 53-8. IF 1,666

Sebesta I, Krijt J, Kmoch S, Hartmannová H, Wojda M, Zeman J. (1997) Adenylosuccinase deficiency: clinical and biochemical findings in 5 Czech patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 20, 343-4. IF 1,407

Seznam publikací bez vztahu k tématu dizertace

Hejzlarova, K., M. Tesarova, A. Vrbacka-Cizkova, M. Vrbacky, H. Hartmannova, V. Kaplanova, L. Noskova, H. Kratochvilova, J. Buzkova, V. Havlickova, J. Zeman, S. Kmoch & J. Houstek (2011) Expression and processing of the *TMEM70* protein. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1807, 144-149. IF 5,132

Sip, M., D. Bystricka, S. Kmoch, L. Noskova, H. Hartmannova & P. Dedic (2010) Detection of viral infections by an oligonucleotide microarray. *Journal of Virological Methods*, 165, 64-70. IF 2,133

Rezek, B., E. Ukraintsev, A. Kromka, M. Ledinsky, A. Broz, L. Noskova, H. Hartmannova & M. Kalbacova (2010) Assembly of osteoblastic cell micro-arrays on diamond guided by protein pre-adsorption. *Diamond and Related Materials*, 19, 153-157. IF 1,822

Tesarova, M., V. Stranecky, H. Kratochvilova, Z. Hajkova, J. Sladkova, J. Spacilova, H. Hansikova, T. Honzik, H. Hartmannova, L. Noskova, L. Piherova, E. Lalonde, J. Majewski, S. Kmoch and J. Zeman. "Novel Phenotype Associated with *Opal* Mutations?" *Mitochondrion* 12, no. 5 (2012): 559-559. IF 4,025