

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Michaela Klugerová

Gen *SHOX* a klinické následky jeho poruch

The *SHOX* gene and clinical consequences of its defects

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Roman Šolc

Nový Bor, 2013

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Romanu Šolcovi za jeho trpělivost, vstřícnost, ochotu a věnovaný čas při odborném vedení této práce. RNDr. Pavlíně Čejkové, Ph.D. za pomoc při hledání tématu mé bakalářské práce. Jitce Klivické a Vítě Jarolímkové za technickou podporu, Tereze Kohoutové za pomoc při grafické úpravě obrázků. A v neposlední řadě patří velký dík mým rodičům, kteří mě podporovali při studiu na této škole.

Prohlášení

„Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.“

V Novém Boru

Podpis

Abstrakt

Gen *SHOX* („Short Stature Homeobox-containing Gene“) byl objeven při zkoumání genotypo-fenotypových korelací u dívek s Turnerovým syndromem. Právě absence jedné z alel tohoto genu byla příčinou malého vzrůstu takto postižených dívek. Krátce poté byly mutace genu *SHOX* nalezeny i u jedinců s Léři-Weillovým a Langerovým syndromem, tedy u jedinců také vykazujících fenotyp malého vzrůstu a skeletálních deformací.

Odhaduje se, že mutace genu *SHOX* či mutace v jeho regulačních oblastech postihují zhruba jedno z tisíce živě narozených dětí. Porucha tohoto genu je tedy jedna z nejčastějších genetických příčin vedoucích k fenotypu malého vzrůstu.

Přestože ještě není zcela objasněna role genu *SHOX* při růstu a vývoji kostí, je důležité se problematikou genu *SHOX* zabývat a pokusit se odhalit mechanismy působení kódovaného proteinu na molekulární úrovni.

Klíčová slova

Homeoboxové geny, gen *SHOX* („Short Stature Homeobox-containing gene“), Léři-Weillův syndrom (dyschondrosteóza), Langerův syndrom, idiopatický malý vzrůst, Madelungova deformita, mezomélie

Abstract

The *SHOX* gene („Short Stature Homeobox-containing Gene“) was identified during research of genotype-phenotype correlations in patients with Turner Syndrome. Absence one allele of this gene was the cause of short stature in these girls. Shortly after, mutations in *SHOX* gene were identified in patients with Léři-Weill and Langer syndrom, thus in patients with growth failure and skeletal deformities.

It is estimated that mutations in *SHOX* gene or mutations in *SHOX* regulatory regions affect one in thousand of new born children. Mutations in this gene are one of the most common genetic causation leading to growth failure phenotype.

However, the exact role of *SHOX* gene in bone growth and development is still unknown, therefore it is important to study problems with *SHOX* gene and try to discover mechanism of *SHOX* protein activity on molecular levels.

Keywords

Homeobox genes, *SHOX* gene („Short stature homeobox containing gene“), Léři-Weill syndrom (dyschondrosteosis), Langer syndrom, idiopathic short stature, Madelung deformity, mesomelia

Obsah

1. Úvod	1
2. Homeoboxové geny	1
3. Gen <i>SHOX</i>	2
3.1 Historie.....	2
3.2 Lokalizace.....	2
3.3 Struktura.....	5
3.4 Exprese.....	8
3.5 Regulace exprese.....	11
4. Homology genu <i>SHOX</i>	15
5. Patologie genu <i>SHOX</i>	17
5.5 Typy mutací.....	17
5.6 Fenotyp asociovaný s deficiencí genu <i>SHOX</i>	19
5.7 Klinické následky poruch genu <i>SHOX</i>	23
5.7.1 Léři-Weillův syndrom (dyschondrosteóza).....	23
5.7.2 Langerův syndrom.....	24
5.7.3 Idiopatický malý vzrůst.....	25
5.7.4 Fenotyp Turnerova syndromu.....	26
5.7.5 Nadbytek kopií genu <i>SHOX</i>	27
6. Diagnostika	28
7. Terapie	31
8. Závěr	32
9. Seznam použitých zkratk	33
10. Seznam použité literatury	34

1. Úvod

Výška postavy je komplexní znak podmíněný nejen genetickou predispozicí, ale i faktory vnějšího prostředí. Celosvětově se rodí zhruba 2 - 3 % dětí, které jsou (ať už ze známého či neznámého důvodu) postižené malým vzrůstem (Rao *et al.* 2001; Rappold *et al.* 2007), což mnohým z nich výrazně snižuje kvalitu jejich života. Defekt v genu *SHOX* je přitom často označován za příčinou malého vzrůstu a skeletálních deformací právě u těchto jedinců (Rappold *et al.* 2007).

U výšky postavy nelze určit pevnou hranici, od které by bylo možno člověka klasifikovat jako „malého“. Vždy záleží na věku jedince, pohlaví, genetické výbavě v rámci rodiny, ale i na etnické příslušnosti. Obecně lze ale říci, že malá postava je definována jako (< -2 SDS)¹ národních výškových standardů; což znamená, že jedinec je malé postavy tehdy, pokud jeho výškové SDS v rámci těchto standardů klesne pod -2 SD. Jako jedince s malou postavou můžeme také nazvat člověka, který svou výškou leží pod třetím (respektive někdy uváděno až pod druhým) percentilem v porovnání s ostatními jedinci svého chronologického věku (Ranke 1994 in Marchini *et al.* 2007).

Cílem této práce je shrnutí základních poznatků o genu *SHOX*, zdokumentování mutací a poruch s ním souvisejících, nastínění lékařské diagnostiky a v neposlední řadě i problematiky terapie u pacientů s deficiencí genu *SHOX*.

2. Homeoboxové geny

Jako homeoboxové geny označujeme ty geny, které obsahují tzv. homeobox, neboli specifickou sekvenci DNA, která se nachází na okraji některých genů. Tato sekvence bývá dlouhá 180 nukleových bází - kóduje tedy 60 aminokyselin. Homeobox je po své translaci do 60 aminokyselinového úseku proteinu (tzv. homeodoména) schopen navázat se na DNA a působit jako transkripční faktor. Homeodoména je tedy označení pro DNA-vazebný motiv eukaryotických transkripčních faktorů (Gehring *et al.* 1994 in Hintz 2002).

Homeoboxové geny hrají stěžejní roli v časném stádiu embryogeneze a v regulaci růstu a vývoje obecně. Určují formování mnoha tělních struktur a podílejí se na určení dorzo-ventrální polaritě embrya. Homeoboxové proteiny dokáží pozitivně či negativně regulovat buněčnou proliferaci a životaschopnost buněk; jejich exprese je rozdílná – kolísá v čase

¹ Pro určení míry extrémních odchylek od normy nám může posloužit SDS („standard deviation score“) neboli Z-skóre. Výpočet SDS byl zaveden pro porovnávání kvantitativních biomedicínských hodnot. SDS lze spočítat např. pro výšku, váhu, délku končetin, obvod hlavy apod. Ve vypočítané hodnotě SDS se odráží nejen pohlaví a věk, ale i medián a variační koeficient. Např. dítě s hodnotou SDS výšky rovno $-2,0$ je na dolní hranici širší normy. SDS kalkulátor je k dispozici na <http://www.phsim.man.ac.uk/SDSCalculator/>

i v prostoru a mnohé homeoboxové proteiny mohou dokonce kompetovat o vazebná místa na DNA (Gehring *et al.* 1994 in Hintz 2002).

Gen *SHOX* patří právě do této rozsáhlé rodiny homeoboxových genů. Hraje důležitou roli především při růstu, vývoji a maturaci kostí horních i dolních končetin.

3. Gen *SHOX*

3.1 Historie

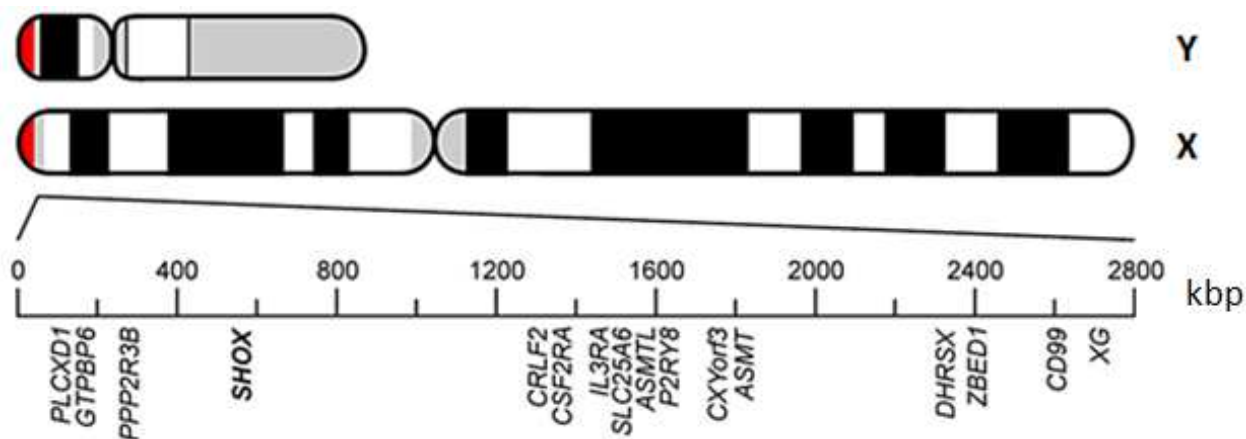
Úvahy o existenci genu, který by měl vliv na výšku postavy a zároveň se nacházel na chromozomu X, se poprvé objevily v souvislosti s Turnerovým syndromem a dalšími X-chromozomálními vadami, které korelují s výškou postavy. Na začátku stála prostá otázka – proč jsou ženy s chybějícím chromozomem X malého vzrůstu? Byla vyslovena hypotéza, že na chromozomu X se musí nacházet nějaký gen fungující jako regulátor růstu. Při zkoumání genotypo-fenotypových korelací u postižených jedinců byl jako kritický region označen distální konec krátkého raménka chromozomu X. Tento hypotetický gen byl poté roku 1997 popsán takřka zároveň dvěma nezávislými skupinami. Rao *et al.* v Německu pojmenovali gen *SHOX* („short stature homeobox-containing gene“) (Rao *et al.* 1997), zatímco Ellison *et al.* ve Spojených státech, kteří svou práci publikovali později, jej pojmenovali *PHOG* („pseudoautosomal homeobox-containing gene“) (Ellison *et al.* 1997). Název *PHOG* zavedený Ellisonem *et al.* se již dále nepoužíval.

Vliv genu *SHOX* na regulaci růstu dokazovalo několik skutečností (Hintz 2002):

- uniká lyonizaci, proto je u zdravých žen i mužů exprimován ze dvou kopií
- jeho exprimace během fetálního vývoje koresponduje s růstem plodu
- sekvence genu je vysoce konzervovaná napříč různými druhy organismů
- ztráta genu či jeho mutace je spojena s malým vzrůstem (např. Turnerův syndrom, Léri-Weillův syndrom)
- nadbytek kopií genu je asociován s vyšším vzrůstem (např. Klinefelterův syndrom)

3.2 Lokalizace

Gen *SHOX* se nachází v pseudoautozomální oblasti PAR1 na krátkých raménkách lidských pohlavních chromozomů X a Y, konkrétně v oblastech Xp22.3 a Yp11.3 (Obr. 1). Geny lokalizované v této oblasti PAR1 nepodléhají lyonizaci; obě dvě kopie genu *SHOX* jsou tudíž exprimovány u žen stejně tak jako u mužů. Není tedy žádný funkční rozdíl mezi *SHOX* (X) a *SHOX* (Y). Diploidní sada homologních genů v oblasti PAR1 obou pohlavních chromozomů je nezbytná pro normální lidský vývoj.



Obr. 1: Chromozomová lokalizace genu *SHOX* (převzato z Binder 2011).

Na distálních koncích ramének pohlavních chromozomů X a Y můžeme kromě PAR1 oblasti nalézt i oblast PAR2. Obě tyto oblasti reprezentují homologní regiony – oblasti identických sekvencí sdílené pohlavními chromozomy, avšak obě oblasti se značně odlišují. Oblast PAR1 je větší; zaujímá rozlohu okolo 2,7 Mb, obsahuje 24 genů a nachází se na konci krátkých ramének. Oblast PAR2 tvoří menší úsek – pouze okolo 0,33 Mb, zahrnuje 5 genů a nalézá se na konci dlouhých ramének. Oblast PAR1 je charakteristická zvýšeným obsahem CG párů a repetitivních sekvencí, a proto i značnou rekombinační frekvencí a z toho plynoucím rychlejším evolučním tempem. Naopak PAR2 nevykazuje tak velkou rekombinační frekvenci (Blaschke and Rappold 2006). Zatímco oblast PAR1 má své homologní protějšky u mnoha druhů živočichů, oblast PAR2 má krátkou evoluční historii a je specifická pouze pro člověka (Charchar *et al.* 2003 in Blaschke and Rappold 2006).

Díky těmto dvěma oblastem mohou mezi sebou vytvořit pohlavní chromozomy během meiózy homologní pár stejně jako autozomy. Nutno ještě podotknout, že za ono párování je zodpovědná především oblast PAR1, a to právě díky své větší rozloze (Helena Mangs and Morris 2007).

Během meiózy dochází při párování pohlavních chromozomů k rekombinaci, tzv. crossing-overu. Rekombinační frekvence v oblasti PAR1 je mnohem vyšší u mužů nežli u žen. Zároveň PAR1 oblast reprezentuje místo s největší rekombinační frekvencí v genomu; rekombinační frekvence u mužů je zde až dvacetinásobně vyšší než je průměrná rekombinační frekvence genomu (Schmitt *et al.* 1994 in Kant *et al.* 2011). Bylo prokázáno, že většina zděděných delecí detekovaných v genu *SHOX* byla přenesena paternálně zděděnou alelou. Spekuluje se, že právě vyšší rekombinační frekvence u mužů během meiózy by mohla být zodpovědná za tento fenomén (Lien *et al.* 2000 in Rappold *et al.* 2007).

Čím blíže je gen z oblasti PAR1 k telomeře, tím větší je pravděpodobnost, že bude během meiózy procesem crossing-over přenesen na alternativní pohlavní chromozom. Proces crossing-over tedy nepostihne geny nacházející se v blízkosti centromery, avšak velmi pravděpodobně postihne geny lokalizované na koncích chromozomů u telomerických oblastí (Evers *et al.* 2011). Region *SHOX* umístěný v oblasti PAR1 (tedy na konci chromozomu) se tedy stává tzv. „horkým místem“ („hotspot“) s vysokou frekvencí rekombinace mezi X a Y chromozomem.

Přestože jsou geny oblasti PAR1 lokalizovány na pohlavních chromozomech, tak mohou segregovat nezávisle na pohlaví, a to právě díky své poloze a tím i velmi časté rekombinaci. Výsledkem je, že mutované geny z oblasti PAR1 mohou být přeneseny z chromozomu X na chromozom Y a opačně. Zdá se, že pravděpodobnost crossing-overu není závislá na typu mutací v PAR1 oblasti (Kant *et al.* 2011). Byly popsány přenosy mutovaného genu jak maternální, z matky na dceru i na syna, tak paternální, z otce na syna i na dceru (Schiller *et al.* 2000). Kupříkladu Evers *et al.* ve své studii prezentují rodinu s LWS, kde původně Y-lokalizovaný deletovaný gen *SHOX* byl přenesen z otce na dceru i na syna. Z tohoto důvodu můžeme hovořit o tzv. pseudoautozomálně dominantní formě dědičnosti (Evers *et al.* 2011).

Obecně, pokud je žena nositelkou heterozygotní mutace v genu lokalizovaném na jejím X chromozomu, každé její dítě má 50% šanci, že zdědí tuto mutaci. Její potomci (ženského i mužského pohlaví) mají stejnou šanci na zdědění mutace. Pokud je muž nositelem mutace v pseudoautozomálním genu na jeho X nebo Y chromozomu, segregace bude záviset na rekombinační frekvenci mezi lokusy pseudoautozomálních genů. Obecně je rekombinační frekvence v PAR1 oblasti u mužů přibližně 50 %. Z toho vyplývá, že polovina mužských potomků bude nositeli rekombinační oblasti PAR1 na jejich Y chromozomech. Konkrétně bylo stanoveno, že lokus genu *SHOX* se nalézá přibližně 10 cM² od telomerického konce pseudoautozomální oblasti a zhruba 40 cM od proximálního okraje pseudoautozomální oblasti („pseudoautosomal boundary“, PAB). Pokud dojde k rekombinaci v oblasti PAR1, pravděpodobnost, že bude gen *SHOX* přenesen na alternativní pohlavní chromozom je tudíž přibližně 80 %. Protože je rekombinační poměr v oblasti PAR1 zhruba 50 % a protože zhruba 80 % rekombinací postihuje gen *SHOX*, je rekombinační frekvence mezi *SHOX* a PAB2 ~40 % v případě meiózy u mužského pohlaví. To znamená, že deletovaný gen *SHOX* lokalizovaný na Y chromozomu má šanci cca 40 %, že bude přenesen na chromozom X (na potenciální dceru) a šanci cca 60 %, že zůstane na chromozomu Y (a bude tedy předán na syna) (Evers *et al.* 2011).

² CentiMorgan (cM) je jednotkou určující relativní vzdálenost mezi geny. Jeden cM je roven 1% pravděpodobnosti rekombinace mezi určitými oblastmi chromozomu během procesu crossing-over.

3.3 Struktura

Gen *SHOX* zahrnuje oblast o velikosti přibližně 40 kb z celkové genomické DNA. Skládá se ze sedmi exonů - jednoho nekódujícího a šesti kódujících exonů (Obr. 2). Šestý exon přitom podléhá alternativnímu sestřihu - může mít tedy dvě varianty – 6a, 6b (Rao *et al.* 1997).



Obr. 2: Struktura genu *SHOX* (převzato z Blaschke and Rappold 2000).

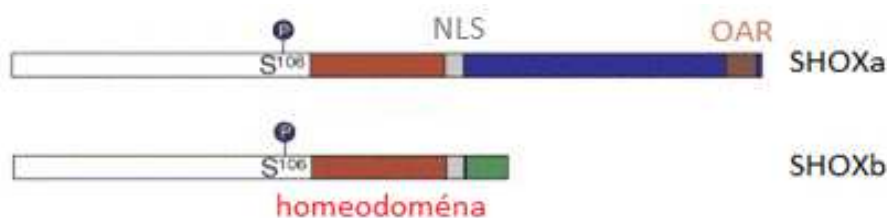
Na genu *SHOX* můžeme rozlišit několik důležitých motivů. Prvním je oblast homeoboxu, který je tvořen sekvencemi exonu 3 a 4. Homeobox kóduje proteinovou homeodoménu skládající se ze 60-ti aminokyselinové sekvence (Obr. 3), která umožňuje specifickou vazbu na DNA a společně s OAR doménou je zodpovědná za genovou transaktivaci proteinu (zvýšení míry exprese proteinu) (Rao *et al.* 2001). Dále pak je tato proteinová doména důležitá pro dimerizaci proteinu SHOX (Schneider *et al.* 2005) a pro jadernou translokaci (nasměrování proteinu z cytoplazmy do místa jeho určení, tedy do jádra), neboť právě na konci homeodomény se nachází jaderný lokalizační signál („nuclear localisation signal“, NLS) skládající se ze sekvence pěti aminokyselin – AKCRK na pozici 170-174. Analýzy proteinů SHOX mutovaných v této sekvenci AKCRK prokázaly, že protein není schopen transportu do jádra a zůstává volně v cytoplazmě (Sabherwal *et al.* 2004). Homeodoména se skládá ze tří helixů. Helix I a II jsou navzájem v antiparalelní pozici. Helix II společně s helixem III tvoří motiv „helix-turn-helix“ (Gehring *et al.* 1994 in Marchini *et al.* 2007; Rao *et al.* 2001). Helix III je nazýván „rozpoznávacím helixem“, protože právě on atakuje DNA v místě jejího velkého žlábků, zatímco N-terminální část proteinu se váže do malého žlábků DNA (Gehring *et al.* 1994 in Marchini *et al.* 2007; Wolberger 1996). Zajímavé je, že právě helix III ve své sekvenci obsahuje pětici aminokyselin AKCRK fungujících jako jaderný lokalizační signál (Sabherwal *et al.* 2004). Protein SHOX se prostřednictvím své homeodomény preferenčně váže na palindromatické motivy typu 5'-TAAT(N)₂₋₃ATTA-3' (Marchini *et al.* 2007). Tak jako mnoho proteinů obsahujících homeodoménu dimerizuje během své vazby na DNA, i protein SHOX vytváří homodimery a na DNA se preferenčně váže jako dimer (Rao *et al.* 2001). Jednonukleotidové substituce nalezeny u pacientů s LWD a ISS vedoucí ke změně aminokyseliny v řetězci v oblasti homeodomény potlačily tuto dimerizační schopnost a tím schopnost vazby proteinu na DNA. Právě homeodoména bude tedy pravděpodobně nezbytná pro dimerizaci proteinu (Schneider *et al.*, 2005).



Obr. 3: Aminokyselinová sekvence homeodomény genu *SHOX*. Čísla v prvním řádku odpovídají číslování aminokyselin od začátku proteinu *SHOX*, čísla ve druhém řádku odpovídají číslování od začátku homeodomény proteinu *SHOX*. V zeleném rámečku zvýrazněna pětice aminokyselin označujících jaderný lokalizační signál (upraveno a převzato z Schneider *et al.* 2005).

Druhým důležitým motivem je doména OAR (**otp**, **aristaless**, **rax**; názvy tří genů, u kterých byla tato doména poprvé popsána), která je lokalizovaná na terminálním C-konci a je tvořena sekvencí 14 aminokyselin. OAR doménu můžeme nalézt pouze u proteinu *SHOXa* (Obr. 4). Tato doména je důležitá pro transkripčně-modulační (transaktivační) aktivitu proteinu *SHOX* (Rao *et al.* 2001). Na druhou stranu, transaktivační aktivita vyžaduje vazbu na DNA, dimerizaci a jadernou translokaci a za tyto procesy je zodpovědná homeodoména. Nelze tedy tvrdit, že za transaktivační aktivitu je zodpovědná pouze OAR doména (Schneider *et al.* 2005). Zkrácená verze proteinu *SHOXb* postrádá informaci pro OAR doménu a z tohoto důvodu nemůže protein *SHOXb* fungovat jako transkripční aktivátor (Rao *et al.* 1997). Na druhou stranu se však *SHOXb* váže na stejné sekvence DNA jako *SHOXa* a dokonce mohou tyto dva proteiny tvořit heterodimery. Je tedy možné, že *SHOXb* je jakýmsi modulátorem aktivity *SHOXa* (Rao *et al.* 2001).

Exon 6a (pravděpodobně ale nikoliv exon 6b) obsahuje třetí motiv a tím je předpokládané, domnělé místo pro navázání domény SH3 („Src homology 3“), čili místo, které by mohlo být zprostředkovatelem interakce s jinými proteiny (Rao *et al.* 1997). Vazebné domény SH3 jsou obecně nalézány u proteinů interagujících s jinými proteiny a zahrnutých v signálních kaskádách (Koch *et al.* 1991 in Hintz 2002).



Obr. 4: Struktura genu *SHOX*: homeodoména, OAR doména, umístění jaderného lokalizačního signálu („nuclear localisation signal“, NLS) skládajícího se z pěti aminokyselin AKCRK, místo nejčastější fosforylace - serin na pozici 106 (převzato z Blaschke and Rappold 2006).

V roce 2011 však došlo k převratnému objevu skupiny Durand *et al.* týkajícímu se struktury genu *SHOX*. Tato skupina identifikovala čtyři nové exony genu *SHOX* (2a, 7-1³, 7-2, 7-3), které vytvářejí nové kódující a nepřekládané oblasti. Vložení exonu 2a mezi exony 2 a 3 však vede k předčasnému vzniku STOP kodonu v exonu 3, takže vznikná zkrácený protein (délka 124 aminokyselin), který postrádá homeodoménu. Většinou však k translaci do proteinu ani nedojde, protože tato mRNA podléhá degradaci v dráze nesmyslných mRNA obsahujících předčasný STOP kodon („nonsense-mediated mRNA decay“). Přesto byla tato krátká mRNA detekována v několika fetálních a adultních tkáních s maximem exprese ve fetálním mozku a oku a v adultní kostní dřeni a skeletální svalovině. Přidání nových exonů 7 přímo na 3' konec prodlužuje 3'-UTR oblast transkriptu *SHOX*. Exon 7-2 a exon 7-3 jsou navíc připojeny přímo za exon 5 a stávají se tak součástí otevřeného čtecího rámce, zatímco exon 6 chybí. Zajímavé je, že varianty exonu 7 nebyly exprimovány v žádné adultní tkáni, byly však exprimovány ve fetální neurální tkáni, což by mohlo značit specifickou roli těchto variant během časného vývoje mozku. Většina těchto nových sestřihových variant je exprimována ve většině tkání, avšak pouze velmi slabě (Durand *et al.* 2011). Jako zajímavá se také jeví myšlenka, že tyto tři nové exony 7 by mohly poskytovat nová vazebná místa pro interakci s miRNA. Většina interakcí mezi mRNA a miRNA se totiž odehrává prostřednictvím 3'-UTR oblasti genu (Bartel 2004 in Durand *et al.* 2011). Skupina Durand *et al.* analyzovala 3'-UTR oblasti různých sestřihových variant genu *SHOX*. Nejvíce vazebných míst pro miRNA objevili v exonu 6a, který dává vznik zatím nejdelší známé 3'-UTR oblasti. Největší hustotu vazebných míst však detekovali v exonu 6b. Regulace pomocí miRNA bude tedy pravděpodobně v největší míře prováděna přes exon 6a. Regulace prostřednictvím sestřihových variant exonu 7 se zdá tedy méně pravděpodobná, nikoliv však nemožná, neboť bylo prokázáno, že varianty exonu 7 jsou exprimovány ve fetální neurální tkáni. Regulace prostřednictvím exonu 7 by tak mohla být tkáňově specifická, fungující jen během vývoje mozku. Časově a tkáňově specifický sestřih by mohl být způsoben přítomností rozdílných regulačně-sestřihových faktorů, které fungují jako transkripční faktory regulující expresi genu

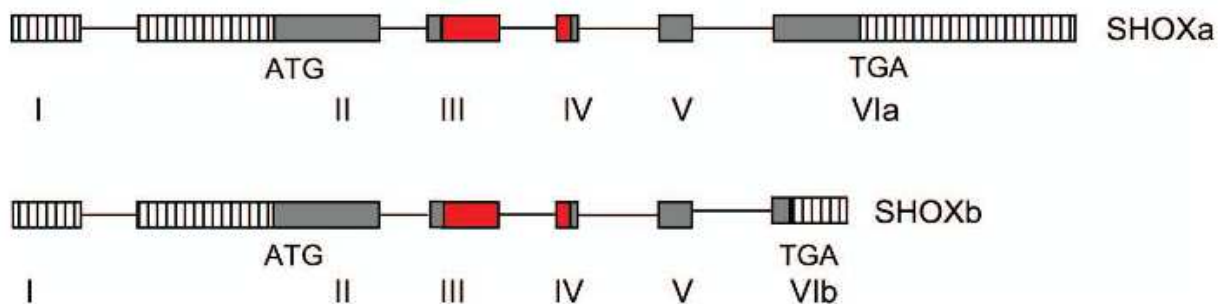
³ Sekvence izoformy proteinu *SHOX* obsahující exon 7-1 je identická se sekvencí proteinu *SHOXa*.

pomocí alternativního sestřihu pre-mRNA. Alternativní sestřih se tak může podílet na časově a tkáňově specifické regulaci exprese genu *SHOX* a stejně tak užití rozdílných 3'-UTR oblastí (Durand *et al.* 2011).

Důležitou aminokyselinou ve struktuře proteinu je serin na pozici 106, který se stává důležitým fosforylačním místem (Marchini *et al.* 2006). Dále také arginin na pozici 147, který je vysoce konzervován napříč mnoha různými druhy a je lokalizován do oblasti homeodomény. Navíc se pravděpodobně účastní formování sekundární struktury proteinu a má podíl i na vazbě k DNA (Jorge *et al.* 2007).

3.4 Exprese

Gen *SHOX* podléhá alternativnímu sestřihu, čímž mohou vznikat dva různé transkripty: *SHOXa* (4559 bp) a *SHOXb* (1952 bp). Tyto dvě odlišné mRNA jsou následně translatovány do rozdílných proteinů o velikostech 292 aminokyselin a 225 aminokyselin (Rao *et al.* 1997). Oba proteiny se shodují v prvních 211 aminokyselinách. První exon je sice součástí mRNA, ale je nekódující, není tedy překládán do proteinu (Obr. 5). Samotná translace začíná až zhruba v polovině exonu 2. Alternativní sestřih se přitom týká pouze exonu 6 (varianty 6a a 6b), transkripty ostatních pěti exonů jsou identické. Exony 6a a 6b mají jiná fosforylační místa. Proteiny *SHOXa* a *SHOXb* se tedy shodují na 5' konci, ale liší v C-terminální doméně na 3' konci (Rao *et al.* 1997; Hintz 2002).



Obr. 5: Zobrazení exonů: nekódující exony vyznačeny pruhovaně, exony překládané do proteinu vyznačeny šedě. Homeodoména zvýrazněna červeně (převzato z Marchini *et al.* 2007).

Protein SHOX vzniklý expresí genu *SHOX* je lokalizován v jádře, specificky se váže na DNA, funguje jako transkripční regulátor (konkrétně aktivátor) a má tak schopnost ovlivňovat specifické, cílové geny (Rao *et al.* 2001). Bylo prokázáno, že delece C-terminální části proteinu SHOX vedou ke vzniku zkráceného proteinu, který již nefunguje jako transkripční aktivátor (Rao *et al.* 2001). Vzhledem ke značné fenotypové heterogenitě pacientů

s deficiencí SHOX Rao *et al.* rovněž navrhli, že by aktivitu proteinu SHOX mohly regulovat tkáňově či buněčně specifické kofaktory (Rao *et al.* 2001).

Expresí genu *SHOX* začíná již v rané fázi vývoje, detekovat ji lze již 33. den po oplodnění (Clement-Jones *et al.* 2000; Binder 2011). Studium lidské fetální tkáně v šestém týdnu gestace ukázalo expresi tohoto genu v časně se formujících končetinách (v distální části kosti pažní, kosti vřetenní, kosti loketní, v zápěstí) a v prvním a druhém faryngeálním oblouku (Clement-Jones *et al.* 2000). V malé míře byla exprese detekována i u dospělých lidí, a to především v orgánech jako jsou ledviny, játra, plíce a skeletální svalovina (Rao *et al.* 1997).

Podrobnější expresní analýzy u dětí ukázaly expresi tohoto genu ve středních částech pažních kostí, v okolí distálních konců (růstové ploténky) kosti pažní, vřetenní a loketní a také v několika kostech zápěstí. Právě exprese genu *SHOX* odhalená v lokti a kolenu by mohla vysvětlovat vyboulení a zkrácení předloktí a lýtek u pacientů s Léři-Weillovým syndromem (LWS), stejně tak jako vbočený loket charakteristický pro pacientky s Turnerovým syndromem. Madelungova deformita pozorovaná u LWS může být výsledkem nedostatečné či chybějící exprese v distální části kosti loketní a vřetenní. Zároveň nedostatečná exprese tohoto genu v prvním a druhém faryngeálním oblouku by mohla přispívat k vytvoření fenotypu charakteristického pro dívky s TS – malá až chybějící brada a vysoce klenuté patro (Clement-Jones *et al.* 2000).

Rozdíl v expresi dvou variant proteinu je závislý vývojově a rovněž i tkáňově. Obě izoformy vykazují rozdílné expresní vzorce. Obecně je SHOXa exprimován ve více typech tkání než SHOXb. Největší míra exprese byla však u obou nalezena ve fibroblastech kostní dřevě (Rao *et al.* 1997). Zatímco SHOXa je také exprimován v dalších tkáních jako např. svalovina, placenta, pankreas a srdce, exprese SHOXb je omezena na fetální ledviny a částečně také svalovinu (Marchini *et al.* 2007).

Durand *et al.* analyzovali expresní vzorce genu *SHOX* pomocí RT-PCR ve 48 různých lidských tkání (3 embryonálních, 18 fetálních, 27 adultních) a čtyřech buněčných liniích. Kromě toho, že ověřili expresi genu *SHOX* v tkáních účastnících se tělesného růstu (jako např. chondrocyty v růstové chrupavce), prokázali expresi genu *SHOX* také v řadě dalších tkání – např. v různých oblastech fetálního a adultního mozku (např. cerebellum, thalamus, bazální ganglia). To může poukazovat na další, dosud nepopsanou funkci genu *SHOX* během fetálního vývoje mozku a také na to, že gen *SHOX* může obecně podporovat vývoj mozkových funkcí (Durand *et al.* 2011). Kromě toho, nápadné malformace mozku nebo kognitivní vývojové opoždění nebyly popsány u pacientů s LWS, Turnerovým a Langerovým syndromem či u pacientů s ISS vykazujících haploinsuficienci genu *SHOX*. Durand *et al.* se domnívají, že gen *SHOX2*, vysoce příbuzný paralog genu *SHOX*, který je také exprimován v mozku, může částečně přebírat funkci genu *SHOX* ve vývoji mozkové tkáně u těchto pacientů. Podpora pro

jejich hypotézu vychází z expresních vzorců těchto dvou genů v oblastech mozku kuřat, kde jsou (podobně jako u člověka) oba geny exprimovány. Expresní vzorce lidských genů *SHOX* a *SHOX2* a kuřecích genů *Shox* a *Shox2* se překrývají jen částečně ve vývoji končetin; oblast exprese genu *Shox* je kompletně pokrytá širším expresním vzorcem *Shox2* ve vývoji kuřecího mozku (Durand *et al.* 2011). Expresní vzorce genu *SHOX2* u člověka se tedy také pravděpodobně překrývají s expresí genu *SHOX*, a to nejen časově, ale i prostorově, tkáňově (Clement-Jones *et al.* 2000).

Pro přesnější zdokumentování úlohy genu *SHOX* ve vývoji kostní hmoty byly provedeny imunohistochemické analýzy lidské fetální a pubertální růstové ploténky. Analýzy pubertální růstové ploténky detekovaly protein *SHOX* v terminálně diferencovaných hypertrofických chondrocytech, tedy v takových buňkách, kterým je předurčeno podstoupit apoptózu, zatímco ve fetální růstové ploténce byl protein *SHOX* lokalizován nejen v hypertrofických chondrocytech ale v menší míře i v nediferencovaných zásobních chondrocytech a proliferujících chondrocytech. Marchini *et al.* spekulují, že protein *SHOX* může být v proliferujících chondrocytech fetální růstové ploténky přítomen v inaktivním stavu, popřípadě že pozorovaný rozdíl ve fetální a pubertální chrupavce může být výsledkem odlišné distribuce proteinu *SHOX* v různých stádiích vývoje člověka (Marchini *et al.* 2004).

Během chondrogenese je důležité koordinovat proliferaci, hypertrofii a apoptózu chondrocytů, neboť právě přesná regulace těchto procesů vede ke správnému formování chrupavky, která je následně jakýmsi „templátem“ pro osteogenezi. Bylo zjištěno, že exprese genu *SHOX* vede k inhibici buněčného růstu a také k apoptóze: výzkumy potvrzují, že primární fibroblasty (které se mohou přeměnit mj. na chondrocyty – buňky chrupavky, či na osteoblasty – kostní buňky) exprimující protein *SHOX* jsou ve svém vývoji zastaveny v G₁ fázi buněčného cyklu. Navíc analýzy ukázaly, že buňky ve všech zkoumaných buněčných systémech fibroblastů i chondrocytů s prodlouženou expresí genu *SHOX* podléhaly apoptóze. Zajímavé je, že tyto buňky navíc zároveň vykazovaly zvýšené koncentrace proteinu p53 (Marchini *et al.* 2004). Je známo, že protein p53 hraje důležitou roli v regulaci buněčného růstu a apoptózy a jeho exprese je aktivována sérií stresových signálů, jako je např. poškození DNA, aktivace onkogenů a deregulace normálního buněčného růstu (Ryan *et al.* 2001 in Marchini *et al.* 2004). Marchini *et al.* tedy navrhuje, že gen *SHOX* či spíše jeho produkt může být zahrnut do komplexu mechanismů, které regulují diferenciaci a apoptózu chondrocytů uvnitř růstové ploténky. Naopak exprese genu *SHOX* nebyla detekována v ostatních buněčných typech růstové ploténky, jako jsou např. osteoblasty a osteoklasty. To by mohlo znamenat, že v těchto buněčných typech nehraje roli, ale spíše se podílí na diferenciaci a maturaci chondrocytů (Marchini *et al.*, 2004).

Podobné výsledky svého výzkumu publikovali ve stejném roce (2004) i Munns *et al.* Ti detekovali expresi genu *SHOX* v chondrocytech růstové ploténky od 12. týdne gestace až do

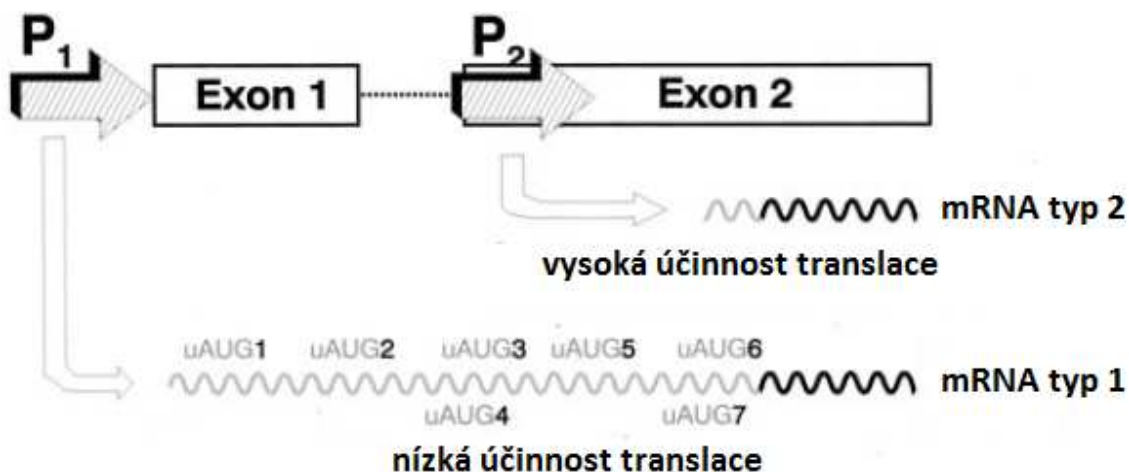
pozdního dětství. Spekuluji, že produkt genu *SHOX* může hrát roli v seskupování chondrocytů („chondrocyte stacking“) uvnitř proliferační zóny a také v jejich diferenciaci. Nepřítomnost funkčního genu *SHOX* a tím i správného proteinu může mít za následek atypickou proliferaci chondrocytů, jejich defektní diferenciaci i jejich abnormální uspořádání, čímž dochází k disorganizaci v růstové ploténce. To může vést ke zpomalení podélného růstu kosti, což by vysvětlovalo fenotyp malého vzrůstu (Munns *et al.* 2004).

Je tedy nanejvýš zřejmé, že gen *SHOX* hraje roli v regulaci buněčného cyklu a jeho exprese je spojena s apoptózou chondrocytů uvnitř růstové ploténky a s poklesem buněčné proliferace (Marchini *et al.* 2004).

3.5 Regulace exprese

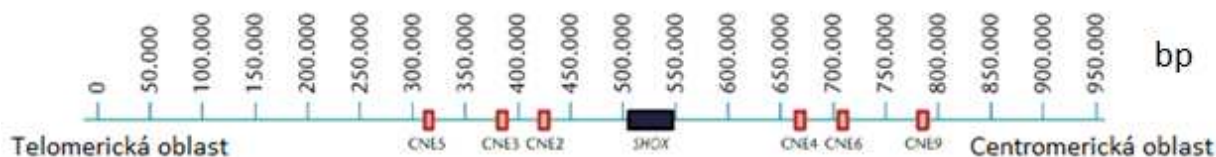
O přesné regulaci exprese genu *SHOX* toho zatím moc známo není. Přestože variabilita ve fenotypovém projevu je klinicky velmi dobře zdokumentována, mechanismy na molekulární úrovni zůstávají neznámé. Bylo identifikováno několik faktorů, avšak jejich přesný mechanismus působení zatím zůstává záhadou. Analýzy však potvrzují model existence transkripčních a translačních kontrolních mechanismů, které regulují úroveň exprese genu *SHOX* a syntézy proteinu SHOX (Blaschke *et al.* 2003).

Blaschke *et al.* prověřili strukturní a funkční vlastnosti 5'-UTR nepřekládané oblasti mRNA transkribované podle genu *SHOX*. 5'-UTR oblast obsahuje 694 nukleotidů a skládá se z exonu 1 a části exonu 2. Analýzy *in vitro* a buněčných kultur odhalily alternativní intragenový promotor (označovaný P₂) uvnitř exonu 2 genu *SHOX*. Tato struktura duálního promotoru vede k alternativním mRNA s odlišnými 5' počátky (Obr. 6). Alternativní užití dvou různých promotorů (jeden sídlí před exonem 1 a druhý na začátku exonu 2) tak vede ke dvěma různým mRNA lišících se v 5'-UTR nepřekládané oblasti, avšak generující identické proteiny. Navíc 5'-UTR oblast mRNA vzniklé z prvního promotoru obsahuje značné množství AUG kodonů a má stabilní sekundární strukturu, což by naznačovalo, že právě tato oblast by mohla kontrolovat expresi genu *SHOX* na úrovni translace. Oba transkripty vykazují značné rozdíly v translační aktivitě. Promotor P₂ generuje mRNA s vysokou účinností translace, a proto je tento promotor pravděpodobně využíván při okamžité potřebě vysokých koncentrací proteinu SHOX. Naopak mRNA typu 1 vzniká transkripcí z promotoru P₁, má nízkou účinnost translace a tak se pravděpodobně podílí na jemném vyladování koncentrace proteinu (Blaschke *et al.* 2003).



Obr. 6: Model regulace exprese genu *SHOX* – transkripce genu *SHOX* je regulována užitím dvou alternativních promotorů generujících dva typy transkriptů s identickou kódující kapacitou avšak rozdílnými 5'-UTR oblastmi. Tyto 5'-UTR oblasti vykazují značné rozdíly v translační aktivitě. Transkript typu 1 obsahuje sedm AUG kodonů a má nízkou účinnost translace (převzato z Blaschke et al. 2003).

Na obou stranách („5' upstream“, „3' downstream“) od regionu genu *SHOX* bylo několika nezávislými skupinami postupně identifikováno několik jeho regulačních oblastí („conserved non-coding elements“, CNEs) – „enhancerů“, neboli zesilovačů transkripce (Obr. 7) (Benito-Sanz *et al.* 2005; Sabherwal *et al.* 2007; Chen *et al.* 2009; Durand *et al.* 2010). Tyto elementy, nacházející se často ve značné vzdálenosti (až stovky kilobází) od genu samotného, jsou pravděpodobně důležité pro časovou a tkáňově specifickou modulaci exprese. Bylo prokázáno, že enhancery sídlící před i za genem *SHOX* jsou aktivní při vývoji končetinových pupenů plodu (Sabherwal *et al.* 2007; Durand *et al.* 2010). Dále několik studií nezávisle na sobě potvrdilo, že enhancer s označením CNE9 nacházející se za genem *SHOX* pravděpodobně reprezentuje nejdůležitější regulační element v proximální oblasti genu *SHOX*, neboť právě mutace v tomto elementu CNE9 byly nejčastěji nalézány u pacientů s LWD i ISS (Sabherwal *et al.* 2007). U pacientů s ISS byly rovněž detekovány delece v enhancerech CNE8 a CNE7, tyto enhancery se nachází rovněž „downstream“ od genu *SHOX* (Benito-Sanz *et al.* 2005; Chen *et al.* 2009). Není pravdou, že delece v regulačních oblastech mají pouze malý efekt na fenotyp, jak se mnozí mylně domnívají. Fenotypový projev je však velmi variabilní – mezi pacienty vykazujícími deleci v regulační oblasti najdeme jedince s normální výškou postavy i jedince s typickým fenotypem deficience genu *SHOX* (Chen *et al.* 2009).



Obr. 7: Přehled nejdůležitějších dosud identifikovaných regulačních oblastí („conserved non-coding elements“, CNEs), u kterých byla prokázána „enhancerová“ aktivita (převzato z Funari *et al.* 2012).

Delece v regulačních oblastech nacházejících se „downstream“ od genu *SHOX* byly již prokázány u pacientů s LWS a zdají se být celkem časté (Chen *et al.* 2009). Durand *et al.* ve své studii zahrnující 60 pacientů s LWS prověřili také oblast „upstream“ od genu *SHOX*, ve které se nacházejí tři jimi objevené regulační elementy – CNE2, CNE3, CNE5 („conserved non-coding elements“, CNEs). Překvapivě však nenalezli žádnou mutaci v tomto intervalu (Durand *et al.* 2010). Durand *et al.* předkládají dvě možná vysvětlení. Za prvé, oblasti „upstream“ a „downstream“ od genu *SHOX* se značně strukturně odlišují: oblast „downstream“ od genu *SHOX* má větší frekvenci repetitivních sekvencí, což může vést ke zvýšenému množství delecí v této oblasti. Navíc tato oblast obsahuje značné množství AT sekvencí, které snadno denaturují a tvoří různé sekundární struktury, protože mají nižší teplotu tání. Za druhé je také možné, fenotyp jedinců vykazujících mutaci v „upstream“ regulační oblasti se může lišit od fenotypu pacientů majících mutaci uvnitř genu či v „downstream“ regulační oblasti. Tito jedinci by tak nevykazovali běžný fenotyp pozorovaný u pacientů s LWS, proto by také nebyli jako LWS diagnostikováni, a tudíž nejsou vůbec součástí studií. Je tedy možné, že fenotyp pacientů s mutací v „upstream“ regulační oblasti se může odlišovat od fenotypu způsobeného mutací v genu samotném (Durand *et al.* 2010). Podporu pro svou hypotézu nalézají ve studii Bleyl *et al.*, kteří prezentují pacienta, jehož „upstream“ regulační oblast se translokovala na jiný chromozom a tudíž byla oddělena od *SHOX* genu. Fenotyp tohoto pacienta byl částečně shodný s fenotypem pacientů s LWS, avšak v mnohém se odlišoval (Bleyl *et al.* 2007 in Durand *et al.* 2010).

Durand *et al.* předpokládají, že také alternativní sestřih poskytuje možnost, jak regulovat genovou expresi (Durand *et al.* 2011). Nově identifikované izoformy proteinu SHOX by mohly být pravděpodobně všechny zahrnuty do jemného vyladování regulace exprese genu *SHOX*. Navíc tyto nové izoformy obsahující exony 7-2 nebo 7-3 nemají kódovací kapacitu pro OAR doménu, a proto mohou mít regulační roli při modulování SHOXa aktivity (Durand *et al.* 2011). Dále je také známo, že izoforma SHOXa obsahuje OAR doménu pravděpodobně z velké části zodpovědnou za transkripční funkci. Transkript SHOXb však tuto doménu neobsahuje, a proto by mohl fungovat jako regulační modulátor aktivity SHOXa (Rao *et al.* 2001).

Regulace aktivity však může probíhat i na úrovni proteinu, a to především fosforylací. Fosforylace proteinu může ovlivnit jeho stabilitu, lokalizaci, afinitu k DNA i transkripční potenciál. Biochemické studie ukázaly, že protein SHOX je multi-fosforylován *in vivo* na serinových zbytcích. V buňce tak vedle sebe mohou koexistovat různě fosforylované izoformy proteinu. Především pak ale serin na pozici 106 je hlavním fosforylačním místem (Marchini *et al.* 2006). Důležitou roli při fosforylaci hraje enzym kasein kináza II (CKII) – právě ta fosforyluje serin 106. Podporou pro hypotézu, že fosforylace serinu moduluje funkci proteinu SHOX, jsou mutantní proteiny SHOX, kde je serin na pozici 106 nahrazen alaninem (S106A). Takto defektní protein není fosforylován a je neschopný aktivovat transkripci, přestože si stále zachovává jadernou lokalizaci a schopnost vazby na DNA. Jaderná translokace (nasměrování proteinu z cytoplazmy do jádra) proteinu SHOX tedy není závislá na fosforylaci serinu 106, avšak pro jeho správnou funkci bude fosforylace pravděpodobně nezbytná (Marchini *et al.* 2006).

Exprese genu *SHOX* tedy může být regulována na úrovni transkripce užitím dvou různých promotorů (Blaschke *et al.* 2003), „enhancerovými“ oblastmi sídlícími na obou stranách („upstream, downstream“) od genu (Fukami *et al.* 2006; Durand *et al.* 2010), alternativním sestřihem spřaženým s degradační dráhou nesmyslných mRNA (Durand *et al.* 2011) a na úrovni translace fosforylací aminokyselin v proteinu (Marchini *et al.* 2006).

Gen *SHOX*, respektive protein SHOX, však sám působí jako regulátor a svým působením ovlivňuje expresi jiných, cílových genů. Do dnešních dní je známo několik jeho transkripčních cílů. Prvním popsáným byl gen *NPPB* („natriuretic peptide precursor B“), který kóduje peptid BNP („brain natriuretic peptide“). Imunohistochemické analýzy potvrdily společnou ko-expresi genů *SHOX* a *BNP* v růstové chrupavce, konkrétně v pozdně proliferační, prehypertrofické a hypertrofické oblasti (Marchini *et al.* 2007). Rappold *et al.* navíc prokázali, že BNP je proteinem SHOX regulován pozitivně (Rappold *et al.* 2012). Bylo prokázáno, že se protein SHOX může navázat do 5' oblasti vedle genu *NPPB* a aktivovat tak promotor *NPPB*. Analýza odhalila i domnělé vazebné místo pro protein SHOX, palindromickou sekvenci 5'-TAATGATAATTA-3'. Tato data potvrzují, že proteiny SHOX a BNP mohou působit na stejné dráze v maturaci chondrocytů a tím přímo ovlivňovat vývoj kostí (Marchini *et al.* 2007).

Dalšími identifikovanými cíly proteinu SHOX byly transkripční faktory SOX5 a SOX6 (Aza-Carmona *et al.* 2011). Bylo zjištěno, že protein SHOX interaguje pomocí své homeodomény s doménou HMG nalézající se ve struktuře proteinů SOX5 (SHOX-SOX5 interakce) i SOX6 (SHOX-SOX6 interakce). Nelze však také vyloučit, že i N- či C-konec proteinu SHOX reaguje s těmito proteiny, což by mohlo přispívat ke stabilitě těchto protein-proteinových interakcí. Mutace v genu *SHOX* nalezené u pacientů s LWS a ISS narušily interakce s proteiny SOX5 i SOX6. Transkripční faktory SOX5 a SOX6 stejně jako SHOX jsou

u člověka exprimovány v hypertrofických chondrocytech fetální růstové ploténky (Aza-Carmona *et al.* 2011). Bylo prokázáno, že SHOX kooperuje s těmito dvěma transkripčními faktory. SOX5 a SOX6 společně s transkripčním faktorem SOX9 tvoří tzv. „SOX trio“ (Ikeda *et al.* 2004 in Aza-Carmona *et al.* 2011) a v kooperaci s proteinem SHOX přímo aktivují enhancer *Agcl*, který pozitivně reguluje expresi „agrekanu“ (což je chondroitin sulfát navázaný na proteoglykany), nezbytné extracelulární složky chrupavky, čímž se podílí na chondrogenézi (Aza-Carmona *et al.* 2011).

Zatím posledním nově identifikovaným transkripčním cílem je gen *FGFR3* („fibroblast growth factor receptor gene 3“), respektive jeho promotor. Bylo prokázáno, že protein SHOX pozitivně reguluje expresi *FGFR3* v lidských fibroblastech; umí se navázat a na rozlehlý promotorový region genu *FGFR3* a tím ho aktivovat. V kuřecích embryích však protein Shox negativně reguluje expresi genu *Fgfr3*. Decker *et al.* spekulují, že protein SHOX může mít pozitivní i negativní regulační účinek na expresi genu *FGFR3*, a to v závislosti na buněčném prostředí, dostupnosti zatím neznámých kofaktorů či přítomnosti specifických vazebných sekvencí (Decker *et al.* 2011). Je přitom známo, že gen *FGFR3* hraje důležitou roli ve vývoji končetin a jeho poruchy jsou spojeny s achondroplázií, nejčastější formou nízkého vzrůstu a disproporčně krátkých končetin (Horton *et al.* 2007 in Decker *et al.* 2011). Zatímco gen *SHOX* má obecně pozitivní účinek na růst kostí, poruchy spojené s mutací genu *FGFR3* jsou důsledkem zvýšené exprese genu *FGFR3*. Deficience SHOX by tedy mohla způsobit relativní vzestup exprese genu *FGFR3* v kostech končetin, což by mohlo urychlit fúzi růstové ploténky a tím způsobit předčasné zastavení růstu těchto kostí (Decker *et al.* 2011). Decker *et al.* navíc ukázali, že blízce příbuzný gen *SHOX2* („short stature homeobox 2“) není schopný regulovat gen *FGFR3* (Decker *et al.* 2011).

Porozumět přesnému mechanismu regulace exprese genu *SHOX* tak bude pravděpodobně klíčem k vysvětlení fenotypu typického pro deficienci genu *SHOX* a s ním spojené značné fenotypové heterogenity.

4. Homology genu *SHOX*

Homology genu *SHOX* můžeme najít jak v lidském genomu, tak napříč různými druhy obratlovců. Gen *SHOX* je například vysoce konzervován u ryb a slepic, ale nebyl nalezen u žab, králíků a hlodavců (Clement-Jones *et al.* 2000). Z tohoto důvodu také jako modelový organismus problematiky spojené s genem *SHOX* slouží kuřecí embrya, jelikož kuřecí protein Shox sdílí 94 % homologie s lidským proteinem SHOX (Obr. 8) a navíc všechny důležité funkční domény jsou na 100 % identické (Decker *et al.* 2011)

```

SHOX 1 MEELTAFVSKSFDQKSKDGNNGGGGGGGGKKSITYREVLESGLARSRELGTSDSSSLQDIT
Shox 1 MEELTAFVSKSFDQKSKE-SGGGGGGGNKKETITYREVLESGLARSRELGNSDSALPDMT
***** ** ***** ** * * *

SHOX 61 EGGGHCPVHLFKDHDVNDKEKLKEFGTARVAEGIEYECKEKREDVKSEDEDGQTKLKQRRS
Shox 60 EGSNHCPVHLFKDHDVESDKDKLKEFAAGRTAEGIEYECKEKREDVKSEDEDGQTKLKQRRS
*** ***** ** ***** * *****

SHOX 121 RTNFTLEQLNELERLFDETHYPDAFMREELSQRLLGLSEARVQVWFQNRRAKCRKQENQMH
Shox 120 RTNFTLEQLNELERLFDETHYPDAFMREELSQRLLGLSEARVQVWFQNRRAKCRKQENQMH
*****

SHOX 181 KGVILGTANHLDACRVAPYVNMGALRMPFQQVQAQLQLEGVAHAHPHLHPHLAAHAPYLM
Shox 180 KGVILGTASHLDACRVAPYVNMGALRMPFQQVQAQLQLEGVAHAHPHLHPHLAAHAPYLM
*****

SHOX 241 FPPPPFGLPIASLAESASAAA VAAA AKSNSKNSS IADLRLKARKHAEALGL
Shox 240 FPPPPFGLPIASLAESASAAA VAAA AKSNSKNSS IADLRLKARKHAEALGL
*****

```

Obr. 8: Porovnání sekvence lidského proteinu SHOX (SHOXa) a kuřecího proteinu Shox. Hvězdičky značí homologii aminokyselin. Homeobox vyznačen červeně, předpokládaná SH3 vazebná doména zeleně, OAR doména modře (převzato z Tiecke *et al.* 2006).

Úzce příbuzný lidský homolog genu *SHOX* nese název *SHOX2* (neboli *SHOT* či také *OG12X*) a nalézá se v oblasti 3q25-26. Analýzy ukazují, že oba tyto geny i jejich další homology se objevily poprvé u obratlovců (Blaschke *et al.* 1998; Semina *et al.* 1998). Sekvence homeodomény u genu *SHOX* je ze 100 % identická se homeodoménou genu *SHOX2*. Geny homologní se *SHOX2* byly nalezeny u většiny obratlovců. Geny *SHOX* a *SHOX2* jsou shodně exprimovány v končetinách a faryngeálních obloucích. Díky své vzájemné strukturní i expresní podobnosti mohou tyto geny mezi sebou soutěžit o vazbu na DNA a také částečně kompenzovat relativní či absolutní deficit toho druhého (Blaschke *et al.* 1998; Hintz 2002). Je známo, že jedinci s mutací v genu *SHOX* nejsou postiženi mentální retardací. Má se za to, že právě gen *SHOX2* kompenzuje nedostatečnou expresi genu *SHOX* v mozkové tkáni (Durand *et al.* 2011). Navíc kódují geny *SHOX* i *SHOX2* identickou homeodoménu a tudíž by měla být teoreticky shodná i afinita kódovaných proteinů k DNA (Clement-Jones *et al.* 2000).

Semina *et al.* zastávají názor, že myší gen *Og12x* je pravděpodobně homologem lidského genu *OG12X* (*SHOX2*), který je také členem rodiny homeobox genů. Jejich výzkumy totiž ukazují, že lidský protein *OG12X* je ze 100 % identický s izoformou b myššího proteinu *Og12x*, zatímco protein *SHOX* sdílí pouze 86 % identity s tímto proteinem *Og12x* (Obr. 9). Navíc byl lidský *OG12X* zamapován na chromozom 3q22-26 a myší *Og12x* na chromozom 3p (Semina *et al.* 1998). Zajímavé je, že míra homologie aminokyselin mezi *OG12X* (*SHOX2*) a *Og12x* je 99%, což je výrazně více nežli homologie mezi proteiny *SHOX* a *SHOX2*, která činí

„pouze“ 83% (Hintz 2002). Konzervace lidského a myšního OG12X/Og12x je znamením vysoké míry evoluční důležitosti tohoto proteinu. Navíc silná konzervace mezi geny *OG12X* a *SHOX* by mohla ukazovat na jejich společný původ nedávným procesem duplikace a následně na krátký čas jejich divergence (Semina *et al.* 1998).

	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90	
OG12X-b	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
Og12x-b	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
Og12x-a	MEELTAFVSKSFDQK	VKEKKEAITYREVLE		SGPLRGAKEPGCVPEP		GRDDRSSPAVRAAGG		GGGAGGGGGGGGGGG		GGAGGGGAGGGAGGG			90
SHOX-a	MEELTAFVSKSFDQK	-----	-----	SKDGNNG	-----	GGGGGKKDSITYRE		VLESGLARSRELGTS		DSSLQDITEGGGHCP			67
SHOX-b	MEELTAFVSKSFDQK	-----	-----	SKDGNNG	-----	GGGGGKKDSITYRE		VLESGLARSRELGTS		DSSLQDITEGGGHCP			67
	91	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166	180	
OG12X-b	-----	-----	-----	-----	-----	MEDEGO	TRIKQRRSRTNPTLE	QLNELERLFDETHYP		DAFMREELSQRLGLS			51
Og12x-b	-----	-----	-----	-----	-----	MEDEGO	TRIKQRRSRTNPTLE	QLNELERLFDETHYP		DAFMREELSQRLGLS			51
Og12x-a	RSPVRELDMGAARERS	REPFSRRLTEVSPEL		KDRKDDAKGMEDEGO		TRIKQRRSRTNPTLE		QLNELERLFDETHYP		DAFMREELSQRLGLS			180
SHOX-a	VHLFKDHDNDKEKL	KEFGTARVAEGIYEC		KEKREDVKSSEDEDGQ		TRIKQRRSRTNPTLE		QLNELERLFDETHYP		DAFMREELSQRLGLS			157
SHOX-b	VHLFKDHDNDKEKL	KEFGTARVAEGIYEC		KEKREDVKSSEDEDGQ		TRIKQRRSRTNPTLE		QLNELERLFDETHYP		DAFMREELSQRLGLS			157
	181	195	196	210	211	225	226	240	241	255	256	270	
OG12X-b	EARVQVWFQNRRAKC	RKQENQLHKGVLIGA		ASQFEACRVAPYVNV		GALRMPPQ	-----	QVQAQLQDLS		AVAAHHHLHPHLAA			129
Og12x-b	EARVQVWFQNRRAKC	RKQENQLHKGVLIGA		ASQFEACRVAPYVNV		GALRMPPQ	-----	QVQAQLQDLS		AVAAHHHLHPHLAA			129
Og12x-a	EARVQVWFQNRRAKC	RKOENQLHKGVLIGA		ASQFEACRVAPYVNV		GALRMPPQ	QDSCNV	TPLSPQVQAQLQDLS		AVAAHHHLHPHLAA			270
SHOX-a	EARVQVWFQNRRAKC	RKOENQMHKGVILGT		ANHLDACRVAPYVNM		GALRMPPQ	-----	QVQAQLQLEG		-VAEAHPLHPHLAA			235
SHOX-b	EARVQVWFQNRRAKC	RKOENQMHKGVILGT		ANHLDACRVAPYVNM		GALRMPPQ	-----	QMEFCSCRPG		WSIMA			225
	271	285	286	300	301	315	316	330	331				
OG12X-b	HAPYMMFPAPPPGLP	LATLAADSASAASVV		AAAAAAKTTSKNSSI		ADLRLKAKKHAAALG	I						190
Og12x-b	HAPYMMFPAPPPGLP	LATLAADSASAASVV		AAAAAAKTTSKNSSI		ADLRLKAKKHAAALG	I						190
Og12x-a	HAPYMMFPAPPPGLP	LATLAADSASAASVV		AAAAAAKTTSKNSSI		ADLRLKAKKHAAALG	I						331
SHOX-a	HAPYLMFPAPPPGLP	TASLAP-SASAAAVV		AAAAKSN--SKNSSI		ADLRLKAKKHAAALG	I						292
SHOX-b	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	225

Obr. 9: Uspořádání aminokyselin v lidském proteinu OG12X ve srovnání s ostatními proteiny ze stejné rodiny homeobox genů – myším Og12x izoformy a, b a lidským SHOX izoformy a, b. Aminokyseliny sdílené pouze OG12X a Og12x jsou vyznačeny modře, odlišná sekvence proteinu SHOX žlutě, oblasti identity OG12X, Og12x a SHOX zeleně (převzato z Semina *et al.* 1998).

5. Patologie genu *SHOX*

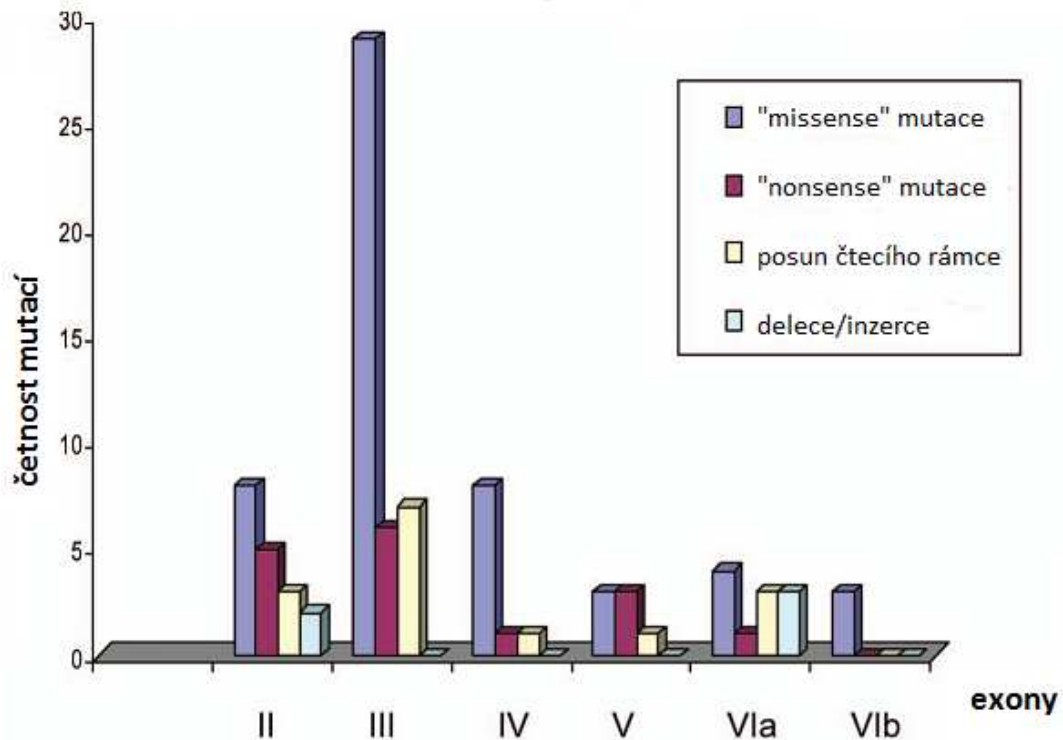
5.1 Typy mutací

Byla nalezena celá škála mutací, které mohou postihovat nejen samotný gen, ale i jeho regulační oblasti. Zajímavé je, že většina nalezených bodových mutací je soustředěna do oblasti homeodomény, která je vysoce konzervovaná (Obr. 10) (Marchini *et al.* 2007).

Nejčastěji nalézány mutacemi postihujícími gen *SHOX* jsou delece, ať už menšího či rozsáhlejšího charakteru (Schiller *et al.* 2000; Rappold *et al.* 2002). Predispozice k delecím plyne především z jeho lokalizace – gen se totiž rozkládá v regionu s velkým výskytem repetitivních sekvencí a je náchylný k rekombinaci (Rappold 1993). Delece jsou přitom

nalézány zhruba u dvou třetin všech případů deficiencie produktu genu *SHOX* (Rappold *et al.* 2007). Velikost delecí přitom nekoreluje se závažností fenotypu (Schiller *et al.* 2000). Většina „*de novo*“ delecí genu *SHOX* vzniká v průběhu meiózy, nikoli mitózy, proto není příliš častá mozaika somatických buněk (Evers *et al.* 2011).

Gen však mohou postihnout i bodové mutace, z nichž nejčasnějším typem jsou „*missense*“ mutace (Obr. 10), tedy takové mutace, kde dojde k záměně jednoho nukleotidu za jiný.



Obr. 10: Četnost a typy bodových mutací detekovaných v kódujících exonech genu *SHOX* (převzato z Marchini *et al.* 2007).

Záměna jednoho nukleotidu za druhý může, ale nemusí, znamenat změnu aminokyseliny. Taková substituce nukleotidů (tedy záměna jednoho nukleotidu za jiný), která vede k změně aminokyseliny, mění sekundární strukturu proteinu a tím může narušovat vazbu na DNA (Ross *et al.* 2001), snižovat dimerizační schopnost proteinu *SHOX* či zhoršovat jeho transport do jádra (Schneider *et al.* 2005). „*Nonsense*“ mutace a mutace posunující čtecí rámec („*frameshift*“ mutace) způsobují předčasnou terminaci translace a tím vznik zkráceného, nefunkčního proteinu. Nebyl nalezen žádný rozdíl ve fenotypu pacientů v závislosti na tom, jaký typ mutace vykazují (Rappold *et al.* 2007).

Nejen mutace uvnitř genu *SHOX*, ale i mutace v jeho regulačních oblastech⁴ nacházejících se v okolí, mohou vést k fenotypu nízkého vzrůstu. Regulační elementy (především „enhancery“) mohou být funkční pouze v některých buněčných typech. Delece v regulačních oblastech byly odhaleny častěji u pacientů s LWS v porovnání s pacienty s ISS. Je tedy možné, že delece v enhancerových regulačních oblastech mohou vést ke zřetelnějšímu fenotypu. Příkladem může být právě závažnější fenotyp u LWS (Chen *et al.* 2009).

Byla založena i databáze lidského genu *SHOX*, aby poskytla lékařům a vědcům rychlý přístup k hlavním informacím o všech jeho známých mutacích⁵ asociovaných s malým vzrůstem (Niesler *et al.* 2002). Tato databáze je pro všechny zájemce on-line přístupná na www.shox.uni-hd.de a lze v ní najít nejen sumární tabulky všech detekovaných mutací, ale i alelické varianty tohoto genu včetně jednonukleotidových polymorfismů bez efektu na fenotyp a dále i charakteristiky poruch spojených s deficiencí genu *SHOX*.

5.2 Fenotyp asociovaný s deficiencí genu *SHOX*

Klinické projevy deficience proteinového produktu genu *SHOX* vykazují značnou fenotypovou variabilitu. U různých jedinců se fenotyp projevuje různými způsoby a v různé míře, a to dokonce i mezi postiženými členy jedné rodiny, kteří sdílejí identický molekulární defekt (Jorge *et al.* 2007). Vysvětlení tohoto fenoménu můžeme hledat v modifikaci genů, v alternativních sekvenčních variantách genu, v regulaci na dlouhé vzdálenosti („long-range effect“), v epistázi, v epigenetických interakcích, v regulačním efektu pohlavních hormonů a stochastickém efektu (Schiller *et al.* 2000). Je zajímavé, že na rozdíl od ostatních poruch vzrůstu (jako je např. nedostatek růstového hormonu) postihuje deficience genu *SHOX* ve větší míře ženy než muže. Navíc jsou skeletální defekty u žen mnohem závažnější a ještě mají tendenci se zhoršovat s nástupem puberty (Ogata *et al.* 2001). Otázkou zůstává, proč tomu tak je. Existuje několik hypotéz, avšak uspokojivé vysvětlení zatím nebylo předloženo.

První hypotéza vysvětluje tento fakt větší koncentrací estrogenu u žen. Zdá se, že u zdravých žen produkty genu *SHOX* fungují jako antagonisté estrogenu (Ogata *et al.* 2001). Navíc bylo prokázáno, že estrogen urychluje programované stárnutí růstové ploténky, což má za následek její předčasnou fúzi a tím ukončení růstu (Weise *et al.* 2001 in Ross *et al.* 2001).

Druhá hypotéza pro častější postižení žen zohledňuje genetické hledisko. Delece *SHOX* (X) jsou popisovány mnohem častěji než delece *SHOX* (Y), což může znamenat, že gen

⁴ Regulační oblasti spolu s navázanými transkripčními faktory hrají roli v dosažení odpovídajícího stupně genové exprese.

⁵ V této databázi nejsou do přehledu mutací zahrnuty rozsáhlé delece, které však tvoří většinu všech dosud detekovaných mutací.

SHOX na chromozomu X je více náchylný k delecím než gen *SHOX* na chromozomu Y (Binder 2011).

Třetí hypotéza říká, že počet postižených jedinců ženského pohlaví není vyšší než počet postižených jedinců pohlaví mužského. Četnost mutací u žen i u mužů je stejná. Závažnější fenotypový projev u žen má však za následek častější diagnostikování mutace genu *SHOX*. Muži s méně zřetelným fenotypem zkrátka nejsou diagnostikováni, přestože poruchu v genu *SHOX* mají (Ross *et al.* 2001).

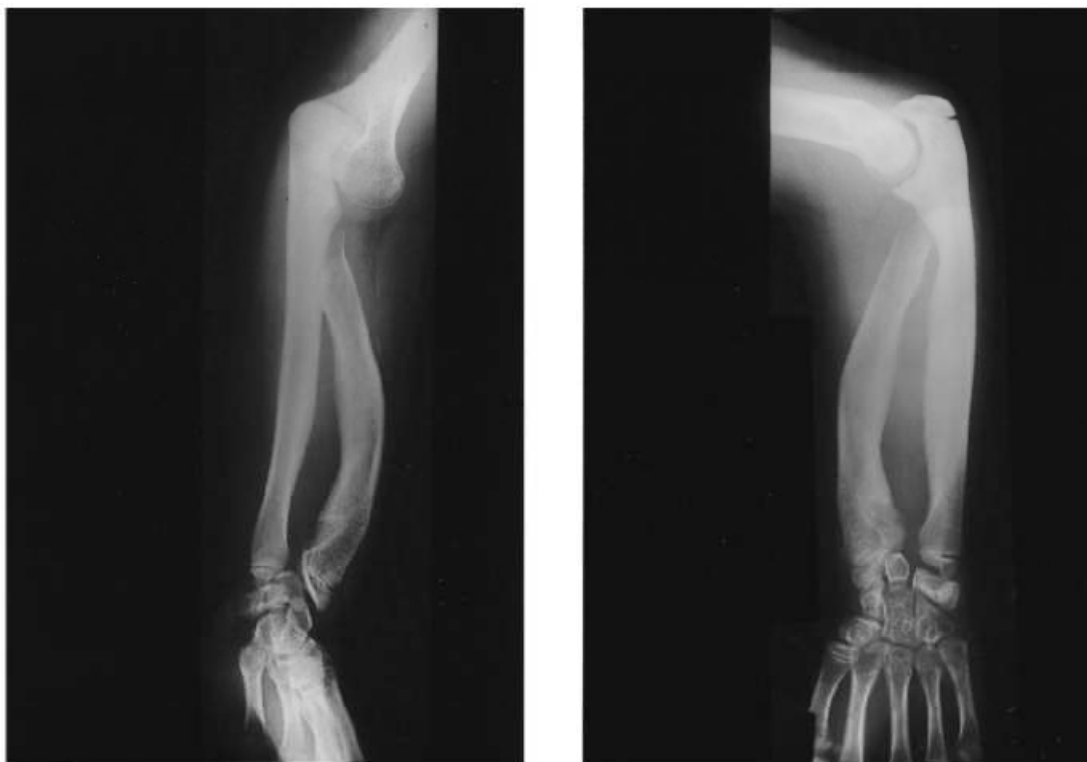
Deficience genu *SHOX* je často familiární záležitostí. Děti s mutací v genu *SHOX* mají daleko častěji příbuzného prvního stupně, který rovněž vykazuje mutaci v tomto genu. A naopak pouze malé procento dětí s poruchou v genu *SHOX* takového příbuzného nemá (Rappold *et al.* 2007).

K typickému fenotypovému projevu patří malý vzrůst. Kromě toho však pacienti s deficiencí produktu genu *SHOX* vykazují buď všechny, nebo alespoň některé z těchto dalších abnormalit, které jsou viditelné pouhým okem (Hintz 2002):

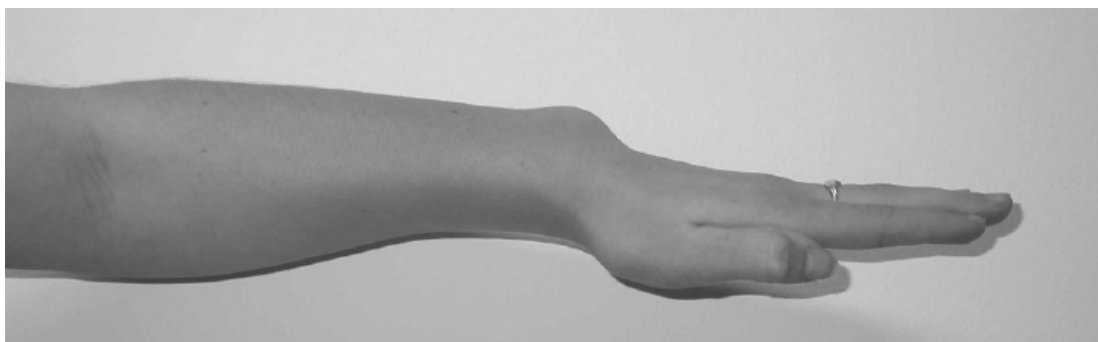
- mezomélie
- Madelungova deformita
- cubitus valgus (vbočený loket)
- svalová hypertrofie

Velmi častým jevem u mnoha pacientů s deficiencí genu *SHOX* je právě mezomélie. Jedná se o zkrácení středních segmentů kostí předloktí a výrazné zkrácení nohou, především lýtek. Délka trupu však bývá normální, a proto má postižený jedinec zcela změněné tělesné proporce. U malých pacientů však disproporce nemusí být tak zřetelná.

Nápadným rysem postižených jedinců bývá i Madelungova deformita. Tuto deformaci zápěstí spojovanou s deficiencí genu *SHOX* popsal jako první německý lékař Otto Wilhelm Madelung v roce 1878. Je charakteristická zkrácením a vybočením kosti vřetení (radius), dorzální dislokací kosti loketní (ulna) a deformací zápěstí způsobenou abnormálním uspořádáním zápěstních kůstek (Obr. 11; Obr. 12). Příčinou je porucha ve vývoji distální epifýzy kosti vřetení (Hintz 2002): část epifýzy radia vykazuje neorganizovaný růst, což vede k vyboulení radia a následné předčasné fúzi této epifýzy (Langer 1965 in Ross *et al.* 2001). Madelungova deformita se začíná rozvíjet v rané fázi puberty, do této doby nebývá pozorována, avšak některé znaky ukazující na její možný vznik mohou být pozorovány radiograficky už od tří let věku (Ogata *et al.* 2001; Flanagan *et al.* 2002). Studie nezávisle na sobě potvrdily, že Madelungova deformita je závažnější u žen (Ross *et al.* 2001). Někteří pacienti s Madelungovou deformitou mají dokonce deficit v rotaci předloktí a sníženou schopnost supinace a pronace (Binder 2011).



Obr. 11: Frontální a laterální RTG snímek dospělého pacienta s Madelungovou deformitou (převzato z Schiller *et al.* 2000).



Obr. 12: Fotografie levého předloktí ženy s rozvinutou Madelungovou deformitou (převzato z Kant *et al.* 2011).

U pacientů, především u mužů, se můžeme setkat také se svalovou hypertrofií. Jedná se o nárůst svalové hmoty z důvodu zvětšení jednotlivých svalových vláken. Počet svalových vláken však zůstává konstantní. Z tohoto důvodu mají také pacienti s mutací genu *SHOX* prokazatelně vyšší body mass index (BMI) než pacienti bez defektu v genu *SHOX* (Rappold *et al.* 2007). S pozorovanou muskulární hypertrofií vyvstává otázka, zda není protein SHOX zapojen (ať už přímo či nepřímo) do nějaké hierarchické kaskády transkripčních faktorů regulujících skeletální myogenezi, neboť obě izoformy SHOXa i SHOXb jsou exprimovány ve

skeletální svalovině. Produkt genu *SHOX* by tedy mohl ovlivňovat i vývoj svaloviny (Schiller *et al.* 2000).

K dalším abnormalitám, které lze (většinou) odhalit pouhým okem patří zkrácené zápěstí a zánártí, skolióza, vysoce klenuté patro, malá až chybějící brada a v neposlední řadě i krátká chodidla a dlaně (Rappold *et al.* 2007).

Důležitým znakem jsou i antropometrické míry. Pacienti s deficiencí produktu genu *SHOX* mají větší výšku vsedě adjustovanou na celkovou výšku (výška v sedě/výška celková) i větší obvod paží, stehen a lýtek (což je odrazem svalové hypertrofie). Naopak mají nižší výšku adjustovanou na rozpětí paží (rozpětí paží/výška celková) a samozřejmě zkrácené předloktí i dolní končetiny (Rappold *et al.* 2007).

Další patologie, které nejsou patrné na první pohled, mohou být u pacientů odhaleny radiograficky (Langer 1965 in Binder 2011; Hintz 2002). Patří mezi ně:

- vybočení nebo vyboulení kosti holenní (tibia)
- triangularizace hlavice (distální epifýzy) kosti vřetenní – tato trojúhelníkovitost distální radiální epifýzy (Obr. 13) je přítomna u většiny žen s Turnerovým syndromem, není však tak běžná u pacientů s Léri-Weillovým syndromem
- abnormální krček kosti stehenní
- výrůstky připomínající formování nové, malé kosti na proximální straně kosti holenní či lýtkové
- pozměněné uspořádání kostí v zápěstí – poloměsíčitá kost (os lunatum) se stává jakýmsi „klínem“ a vmezeřuje se mezi kost vřetenní a loketní. Takovéto uspořádání zápěstních kůstek připomíná tvar obrácené pyramidy, přičemž právě poloměsíčitá kost se stává vrcholem této pyramidy, a proto se tento jev nazývá pyramidalizace karpální krajiny (Obr. 13)
- zkrácení zápěstních a zánártních kůstek a rozšíření vnější strany metafýzy
- radiografické projasnění – distální konec radia absorbuje méně radioaktivní energie, a proto se na rentgenovém snímku jeví tmavěji než okolí (Obr. 13); tento jev je způsoben nižší hustotou kostní hmoty v této oblasti (naopak oblasti s větší hustotou absorbují více radioaktivní energie a jeví se světleji); projasnění radia se zdá být předstupněm vzniku Madelungovy deformity a lze ho pozorovat už od tří let věku (Ogata *et al.* 2001; Ross *et al.* 2001; Ross *et al.* 2005)



Obr. 13: Hlavní radiologické znaky deficience genu *SHOX* v porovnání s normálním vzhledem zápěstí (převzato z Binder 2011).

5.3 Klinické následky poruch genu *SHOX*

5.3.1 Léři-Weillův syndrom (LWS, LWD)

Léři-Weillův syndrom (LWS) neboli Léři-Weillova dyschondrosteóza (LWD) je důsledek heterozygotní formy deficience genu *SHOX* (haploinsuficience – ztráty funkce jedné alely genu *SHOX*), která byla poprvé popsána v roce 1929 Lérim a Weillem. Jedná se o dominantně děděnou formu skeletální dysplazie s charakteristickou disproporčně malou postavou a mezomélií. Zcela typickým fenotypovým projevem je pak Madelungova deformita, která je přítomna téměř u všech dospělých pacientů. První známky rozvoje Madelungovy deformity u dětí mohou však být odhaleny pouze radiograficky. Prvotní radiologické změny jsou přítomné mezi druhým až pátým rokem (Schiller *et al.* 2000).

U některých pacientů se také setkáváme s fenotypem, který je typický spíše pro Turnerův syndrom. Jedná se zejména o vysoce klenuté patro a skoliózu. Zajímavé je, že pokud jedinec tento fenotyp vykazuje, pochází jeho mutovaná alela genu *SHOX* většinou od matky (lokalizován na maternálně zděděném chromozomu). Hovořit o tom, jaký vliv na fenotyp má mutace genu *SHOX* v závislosti na parentálním původu chromozomu, je však

značně kontroverzní (Ross *et al.* 2001). Žádné jiné studie neodhalily fenotypové rozdíly v závislosti na původu mutovaného genu, a proto bude tato myšlenka nejspíše scestná.

U 50 - 100 % (v závislosti na studii; Schiller *et al.* 2000; Ross *et al.* 2001; Rappold *et al.* 2007; Chen *et al.* 2009) pacientů s LWS je detekována delece či jiná mutace v genu *SHOX* nebo v jeho regulačních oblastech. Odlišnosti v četnosti mutací genu *SHOX* u jednotlivých studií mohou být způsobeny etnickými rozdíly mezi populacemi (Jorge *et al.* 2007) či použitím rozdílných metod k identifikaci mutací u těchto jednotlivých studií (Rappold *et al.* 2007). Ve studii Schiller *et al.* byla závažnost fenotypu s LWS nezávislá na přítomnosti či absenci mutace genu *SHOX*. Také nebyl rozdíl v průměrném výškovém SDS u jedinců s LWS s mutací v genu *SHOX* a jedinců s LWS bez mutace v genu *SHOX*. Celkový fenotyp však byl závažnější u žen (Schiller *et al.* 2000). Stejně výsledky přinesla i další studie – LWS byl mnohem častější u žen (3:1) a také jejich fenotyp byl závažnější, naopak výškové z-skóre bylo u žen i u mužů stejné. Navíc výsledný fenotyp nezávisel na tom, zda byl mutovaný gen *SHOX* na potomka přenesen od matky či od otce (Ross *et al.* 2001). Schiller *et al.* zastávají názor, že LWS je geneticky heterogenní onemocnění, které může být způsobeno mutací v různých genech (Schiller *et al.* 2000).

5.3.2 Langerův syndrom

Langerův syndrom je relativně vzácný v poměru k odhadované četnosti mutací genu *SHOX*. Ve skutečnosti se vlastně jedná o homozygotní formu Léři-Weillova syndromu (Espiritu *et al.* 1975 in Shears *et al.* 2002) čili o důsledek homozygotní deficiencie genu *SHOX* (Belin *et al.* 1998 in Niesler *et al.* 2002; Shears *et al.* 1998 in Hintz 2002). Důvodem je mutace v obou kopiích genu *SHOX*. Byl však již prokázán i případ homozygotní mutace (konkrétně rozsáhlé delece) v regulačních oblastech obou alel genu *SHOX*, které rovněž vedly ke vzniku Langerova syndromu. Tato homozygotní delece zasahující regulační oblasti obou alel genu *SHOX* byla prokázána u potraceného plodu, jehož oba rodiče s diagnostikovaným LWS měli rozsáhlé heterozygotní delece regulačních oblastí, které byly identické s delecemi nalezenými u jejich plodu (Bertorelli *et al.* 2007).

Pacienti s Langerovým syndromem vykazují extrémně malý vzrůst a závažné dysmorfie kostí končetin. Často dochází k hypoplázii nebo aplázii kosti loketní a lýtkové. Tyto těžké skeletální malformace jsou u těchto jedinců patrné již při narození (Langer 1967 in Hintz 2002; Shears *et al.* 2002).

Do dnešních dní byla prokázána a publikována jen hrstka případů jedinců s Langerovým syndromem, což poukazuje na již zmíněnou raritu jeho výskytu (Shears *et al.* 2002). Zatím největším zkoumaným vzorkem byla skupina pěti jedinců, všichni vykazovali abnormality v genu *SHOX*, u třech z nich se jednalo o mutace v obou alelách. Přestože každý

jedinec měl jiné typy mutací, všichni vykazovali stejný fenotyp – výrazně malá postava, extrémně zkrácené a deformované kosti končetin, Madelungova deformita (Obr. 14). Všichni proto byli diagnostikováni jako jedinci s Langerovým syndromem (Zinn *et al.* 2002).



Obr. 14: Fotografie pěti jedinců s Langerovým syndromem (převzato ze Zinn *et al.* 2002).

5.3.3 Idiopatický malý vzrůst

Idiopatický malý vzrůst („idiopathic short stature“, ISS) je charakteristický výrazně malou postavou (< -2 SDS), trvale nízkým tempem růstu a neustále se snižující růstovou křivkou, přičemž neexistuje žádný očividný důkaz systémové choroby, který by tento malý vzrůst vysvětloval (malnutrice, hypotyreóza či nedostatek růstového hormonu) (Hintz 2002). Fenotypový projev jedinců s ISS se příliš neliší od fenotypu pacientů s LWS. Přesto jsou však znaky, které mnohem častěji nalézáme u pacientů s LWS – jedná se především o Madelungovu deformitu a zkrácení předloktí (Rappold *et al.* 2007).

Rao *et al.* zkoumali 91 pacientů postižených idiopatickým, tedy zdánlivě „bezpříčinným“, malým vzrůstem, aby zjistili, zda je u některého z nich přítomna mutace genu *SHOX*. Z oněch 91 pacientů měl pouze jeden pacient „nonsense“ mutaci v tomto genu a tato mutace měla za následek vznik zkráceného a nefunkčního proteinu (Rao *et al.* 1997).

Rappold *et al.* provedli studii na 900 pacientech s ISS. Mutaci v genu *SHOX* však vykazovalo pouze 2,4 % z nich (Rappold *et al.* 2002). Další studii provedli Rappold *et al.* na 1534 pacientech s ISS. Ze všech těchto pacientů však pouze 2,2 % vykazovalo delecii v genu *SHOX* či jinou mutaci (Rappold *et al.* 2007).

Také Jorge *et al.* provedli studii s 63 pacienty s ISS. Pouze 3,2 % z nich však vykazovalo nějakou mutaci v genu *SHOX* (Jorge *et al.* 2007).

V roce 2009 provedli Chen *et al.* studii zaměřenou na detekci mutací nejen uvnitř genu *SHOX*, ale i v jeho regulačních oblastech. Z celkového počtu 735 pacientů různých etnických příslušností jich 4,9% vykazovalo mutaci v genu *SHOX* či v jeho regulačních oblastech (Chen *et al.* 2009).

Dřívější studie ISS se zaměřovaly na detekci mutací pouze uvnitř genu *SHOX* (např. Rao *et al.* 1997; Rappold *et al.* 2007). Nové analýzy však potvrzují, že je důležité prověřit i regulační oblasti nacházející se v okolí. Je tedy pravděpodobné, že procento defektů genu *SHOX* by u výše uvedených starších studií bylo vyšší, pokud by v těchto studiích byly zahrnuty i případné odhalené mutace v regulačních oblastech. Avšak i přesto by toto číslo bylo nejspíše nízké. Porucha genu *SHOX* (včetně jeho regulačních oblastí) tak pravděpodobně bude původcem jen malé části jedinců postižených idiopatickým malým vzrůstem (Rappold *et al.* 2002) a jejich stejný fenotyp bude tedy nejspíše způsoben mutacemi v různých genech (Rappold *et al.* 2007).

Pacienti s ISS vykazují spíše nižší až průměrné hodnoty body mass indexu (BMI) a jak již bylo řečeno, není u většiny z nich detekována mutace v genu *SHOX*. Naopak u jedinců s LWS a detekovanou poruchou genu *SHOX* je často zřetelná svalová hypertrofie. Tento fakt je tak další podporou pro hypotézu, že gen *SHOX* pravděpodobně hraje roli ve vývoji svaloviny (Schiller *et al.* 2000; Rappold *et al.* 2007).

5.3.4 Fenotyp Turnerova syndromu

Významnou roli pravděpodobně hraje heterozygotní deficiencie genu *SHOX* i u pacientek s Turnerovým syndromem⁶ (TS). Více než 90 % žen s Turnerovým syndromem vykazuje abnormálně malý vzrůst a právě ztráta funkčnosti jedné alely genu *SHOX* by mohla být zodpovědná za tuto složku jejich fenotypu (Clement-Jones *et al.* 2000). Přestože téměř všechny pacientky s Turnerovým syndromem trpí *de facto* deficiencí genu *SHOX*, a proto by se u nich očekávala přítomnost stejných fenotypových projevů jako u pacientů s LWS, ne vždy tomu tak je. Ženy s Turnerovým syndromem vykazují širokou škálu skeletálních abnormalit. Některé z abnormalit jsou však u nich mnohem častější, než u jedinců s LWS – jedná se např. o vbočený loket, malou až chybějící bradu, hluboce klenuté patro, krátké záprstní kůstky. Pozoruhodné také je, že pouze u zlomku žen s TS (cca 8 %) dojde k rozvoji Madelungovy deformity a mezomélie, které jsou naopak zcela typické pro Léři-Weillův syndrom (Ross *et al.* 2005; Rappold *et al.* 2007). Tento paradox dosud nebyl uspokojivě objasněn. Má se však za to, že tento fakt může být zapříčiněn sníženou funkcí gonád u dívek s Turnerovým syndromem (Rappold *et al.* 2007). To, že mají dívky s TS deficit steroidních pohlavních hormonů, by je tak paradoxně mohlo chránit před vznikem Madelungovy deformity. Naopak pacienti s LWS mají většinou normální ovariální funkci a jsou tak

⁶ Turnerův syndrom je způsoben ztrátou či rozsáhlejší strukturální přestavbou jednoho chromozomu X (Zinn *et al.* 1993 in Binder *et al.* 2001). K nejčastější strukturální přestavbě patří izochromozom i(Xq), který se skládá ze dvou dlouhých ramének oddělených centromerou. Zcela tedy postrádá krátké raménko (Xp) a tudíž i gen *SHOX* (Hook and Warburton 1983 in Binder *et al.* 2001).

vystavení vlivu estrogenů, což by mohlo podněcovat rozvoj Madelungovy deformity. Proti této hypotéze však hovoří fakt, že Madelungova deformita se objevuje již u prepubertálních jedinců obou pohlaví (Ross *et al.* 2001; Ross *et al.* 2005). Další hypotéza, která by vysvětlila malou incidenci Madelungovy deformity u dívek s TS (a karyotypem 45,X), přináší jiné vysvětlení: ztráta některých genů, které mohou souviset s růstem a které se nachází mimo pseudoautozomální oblast, může mít modifikační efekt a může zmírnit abnormální vývoj a růst radia (Shears *et al.* 1998 in Ross *et al.* 2001).

Ženy s Turnerovým syndromem však vykazují ještě další abnormality, jako jsou například poruchy renální či cévní soustavy, především srdce. Při organogenezi ledvin a srdce však v těchto orgánech nebyla detekována žádná, či jen velmi nízká exprese genu *SHOX*, gen *SHOX* tedy pravděpodobně není zodpovědný za tyto typy patologií (Clement-Jones *et al.* 2000).

Dle studie Ross *et al.* je průměrný výškový deficit u dívek s TS převedený do z-skóre -3,2 SD. Oproti tomu průměrný výškový deficit u pacientů s LWS je -2,2 SD. Ross *et al.* se domnívají, že haploinsuficience genu *SHOX* je odpovědná za zhruba dvě třetiny výškového deficitu u pacientek s TS, za zbytek výškového deficitu mohou jiné geny (Ross *et al.* 2001).

5.3.5 Nadbytek kopií *SHOX* genu

Nadbytek kopií genu *SHOX* může být asociován s vyšším vzrůstem (Binder *et al.* 2001). Jedinci s Klinefelterovým syndromem (47,XXY) mají ve své genomické DNA tři kopie genu *SHOX*, stejně tak jako ženy s karyotypem 47,XXX (trisomie X chromozomu; „triple X syndrom“). Jedinci s Klinefelterovým syndromem mají dlouhé končetiny, velká chodidla i dlaně a vykazují sníženou funkci gonád. Jejich růstová křivka je zpočátku standardní, avšak v období puberty se začne odchylovat. Ogata *et al.* zastávají názor, že za jejich vysokou postavu jsou odpovědné dva faktory. Prvním je právě přítomnost tří kopií genu *SHOX*. Druhým je snížená funkce gonád u těchto jedinců, neboť nedostatek estrogenu prodlužuje růstovou periodu z důvodu zpožděného uzavírání růstové ploténky. Podávání estrogenů může být efektivním řešením jak zabránit rozvoji nadměrně vysoké postavy a indukovat pubertální vývoj (Ogata *et al.* 2001).

V roce 2001 publikovali Binder *et al.* svou studii, ve které popisují pacientku vysoké postavy s fenotypem Turnerova syndromu a gonadální dysgenezí. Genetická analýza u této dívky potvrdila duplikaci raménka Xp a částečnou delecí raménka Xq. Z tohoto důvodu měla tato dívka tři kopie *SHOX* genu. Binder *et al.* navrhli, že kombinace tří kopií *SHOX* genu se současným nedostatkem estrogenů způsobuje rozvoj vyšší postavy (Binder *et al.* 2001).

Na základě své studie však v roce 2010 formulovali del Rey *et al.* jinou hypotézu. Publikovali studii dvou pacientek s rozdílným fenotypem, ale stejnou strukturální abnormalitou chromozomu X. FISH analýza odhalila u obou dívek přítomnost dvou kopií genu *SHOX* na jednom chromozomu X. Prvním pacientem byla dívka s vysokou postavou, poruchami chování a normálním pubertálním vývojem. Abnormální chromozom byl přítomný ve všech studovaných buňkách. Karyotyp jejích rodičů byl zcela normální. Druhým pacientem byla rovněž dívka. Ta však měla nízký vzrůst, mírný fenotyp Turnerova syndromu a gonadální dysgenezi. Její karyotyp byl mozaikový 45,X/46,X,r(X). Karyotyp jejích rodičů byl normální. U obou dvou pacientek způsobila duplikace úseku Xp translokovaná na deletovaný Xq triplikaci pseudoautozomální oblasti 1 (PAR1), ve které se nachází i gen *SHOX* (Xp22.3). Rey *et al.* zastávají názor, že více kopií genu *SHOX* bez deficitu estrogenu (tedy u pacientek s normální ovariální funkcí) může v některých případech indukovat excesivní výšku. Avšak kombinace nadbytku kopií genu *SHOX* s deficiencí estrogenu (tedy u pacientek s gonadální dysgenezí) nemusí být nutně následována vysokou postavou (del Rey *et al.* 2010).

Vliv více kopií genu *SHOX* na výšku postavy však stále není uspokojivě objasněn (del Rey *et al.* 2010). Někteří se domnívají, že gen *SHOX* (nebo spíše jeho produkt) by mohl potlačovat fúzi růstové ploténky, avšak proti němu působí opačná síla estrogenů. Za normálních okolností jsou obě síly v rovnováze. Pokud však chybí jedna alela genu *SHOX* či je tato poškozena, síla účinku estrogenů převládne, dochází k předčasnému uzavírání růstové štěrbin (ploténky) a tím k nenaplnění růstového potenciálu (Ogata *et al.* 2002 in del Rey *et al.* 2010).

6. Diagnostika

Včasně určená diagnóza pomocí molekulárně-genetických metod je nezbytná pro brzké zahájení hormonální léčby. Porodní délka dětí s deficiencí genu *SHOX* je většinou průměrná, nebo jen lehce podprůměrná, proto je velmi těžké diagnostikovat poruchu genu *SHOX* u takto malých pacientů. Výškový deficit se začíná projevovat během prvního roku života, avšak více patrný je až v předškolním věku dítěte (Ross *et al.* 2005; Binder 2011). Navíc v dětském věku většinou chybí typické skeletální abnormality, jako je například Madelungova deformita. Ta se začíná plně rozvíjet až s nástupem puberty, což potvrzuje hypotézu, že při jejím vzniku hrají roli estrogeny (Rappold *et al.* 2002). Existují však typické radiografické znaky na kostře zápěstí, které mohou předpovídat vznik Madelungovy deformity. Výjimku tvoří pouze novorozenci s Langerovým syndromem, u kterých jsou ihned po narození vidět těžké malformace končetin (Shears *et al.* 2002).

Při diagnostikování deficiencie genu *SHOX* v klinické praxi by měla být provedena auxologická analýza tělesných proporcí, zmapovány viditelné abnormality a malformace

a dále by také měly být zdokumentovány radiografické znaky, především na kostře horních končetin (Binder 2011). Dále by se měla brát v potaz i rodinná anamnéza a historie, protože velká část pozorovaných abnormalit v genu *SHOX* jsou familiárního charakteru (Ross *et al.* 2001). Diagnóza deficiencie genu *SHOX* by pak nakonec měla být potvrzena genetickou analýzou.

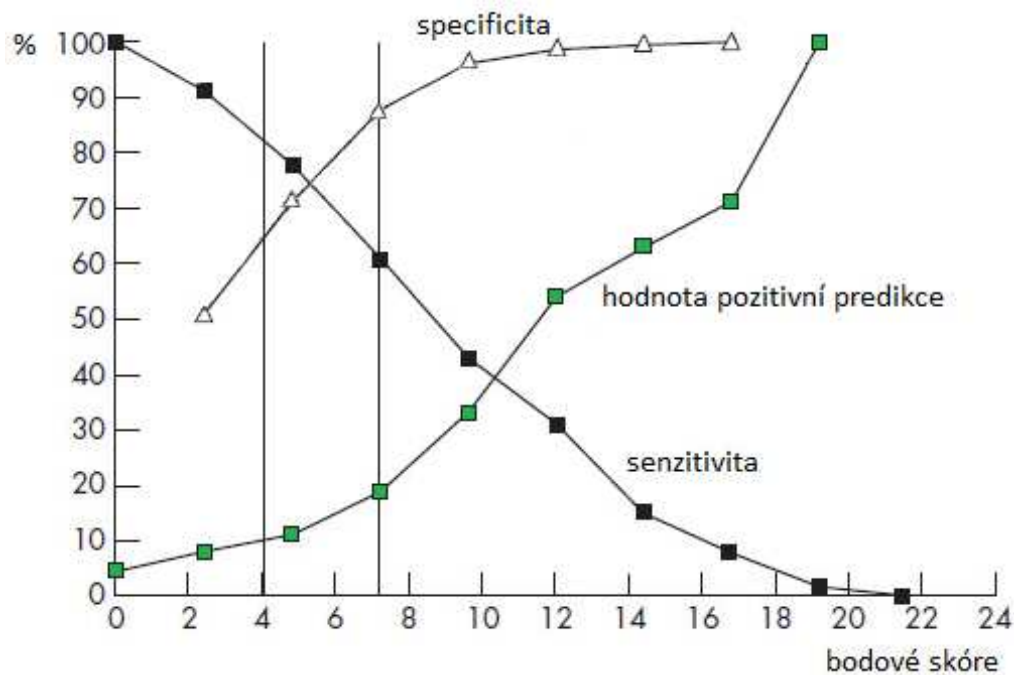
Právě k vybrání nejvhodnějších kandidátů pro cílené genetické testování (a tím i k časně detekci mutací genu *SHOX*) vyvinuli Rappold *et al.* tzv. skórovací systém (Tab. 1). Ten definuje diagnostická kritéria a má tak pomoci lékařům identifikovat pacienty s pravděpodobnou patologickou abnormalitou v genu *SHOX*. Lékaři pak mohou tyto pacienty dále testovat, zda mutaci v genu *SHOX* opravdu vykazují. Tato skórovací tabulka zahrnuje tři antropometrické proměnné a pět dimorfických znaků; zohledňuje ty nejtypičtější a nejčastější fenotypové projevy deficiencie genu *SHOX*. Každému fenotypovému projevu je přidělen určitý počet bodů, body za jednotlivé položky se sčítají podle toho, které z daných fenotypových znaků pacient vykazuje; pokud pacient dosáhne určitého bodového skóre, je vhodným kandidátem pro testování mutace genu *SHOX*.

posuzovaný znak	kritérium	počet bodů
poměr rozpětí paží/výška celková	< 96,5%	2
poměr výška v sedě/výška celková	> 55,5%	2
BMI [kg/m ²]	> 50. percentil	4
cubitus valgus (vbočený loket)	ano	2
zkrácené předloktí	ano	3
ohnutí, vybočení předloktí	ano	3
přítomnost svalové hypertrofie	ano	3
dislokace ulny (v lokti)	ano	5
celkem		24

Tab. 1: Skórovací systém (převzato a upraveno z Rappold *et al.* 2007).

Pokud pacient vykazuje všechny znaky obsažené v tabulce, dosáhne maximálního skóre 24 bodů. Hranice bodů, od které by se měl pacient podrobit testu na mutaci v genu *SHOX*, však není pevně daná. Pokud byla jako hranice zvolena hodnota > 4 body, senzitivita byla 71 % a hodnota pozitivní predikce byla 11 %. Pokud však byla jako hranice zvolena hodnota > 7 bodů, senzitivita klesla na 61 %, zatímco hodnota pozitivní predikce vzrostla na 19 % (Rappold *et al.* 2007). Je obtížné rozhodnout, která hranice počtu bodů má být používána. Různému počtu bodů odpovídá i různá senzitivita a hodnota pozitivní predikce. Pokud budeme brát jako hranici hodnotu čtyř bodů, budeme zbytečně testovat příliš mnoho jedinců, avšak zase máme šanci zachytit (téměř) všechny s mutací v genu *SHOX*. Naopak

pokud budeme brát jako hranici hodnotu sedmi bodů, tak pokles senzitivity bude znamenat, že ne všichni pacienti s mutací v genu *SHOX* budou identifikováni (Graf 1).



Graf 1: Závislost senzitivity, specifity a hodnoty pozitivní predikce na získaném počtu bodů. Specifita udává pravděpodobnost, s jakou test ukáže negativní výsledek u člověka bez mutace. Senzitivita vyjadřuje citlivost testu, tedy pravděpodobnost pozitivního výsledku u člověka s mutací. Hodnota pozitivní predikce znamená pravděpodobnost přítomnosti mutace u člověka s pozitivním výsledkem testu. Vertikální linie reprezentují hranici > 4 body, respektive > 7 bodů (převzato a upraveno z Rappold *et al.* 2007).

K přesné diagnostice mutací v genu *SHOX* se pro vědecké účely i pro účely klinické praxe používá celé spektrum molekulárně genetických metod (MLPA, mikrosatelitní analýza) i metod molekulární cytogenetiky (FISH, komparativní genová hybridizace CGH). Po mnoho let byla k detekci mutací v genu *SHOX* využívána metoda FISH („fluorescence *in situ* hybridization“). Tato metoda však byla značně nákladná. Mikrosatelitní analýza je sice efektivní, ale její hlavní nevýhodou je, že pracuje pouze s parentální DNA (D'Haene *et al.* 2010). Jako nejlepší se z hlediska klinické praxe jeví metoda MLPA („multiplex ligation-dependent probe amplification“). V porovnání s mikrosatelitní analýzou či metodou FISH má MLPA větší citlivost, umí odhalit i malé delece aniž by potřebovala přesné zacílení. Navíc je méně finančně nákladná a méně časově náročná. V případě, že metoda MLPA neodhalí deleci (protože právě delece tvoří zhruba tři čtvrtiny všech mutací genu *SHOX*), je vhodné přistoupit k přímému sekvenování exonů genu *SHOX*, které odhalí bodové mutace (Funari *et al.* 2010). Jako vhodná alternativa pro detekci přestaveb v genu *SHOX* i pro detekci mutací v regulačních oblastech pro vědecké účely i pro účely klinické praxe se jeví nová metoda molekulárně-genetického testu založeného na kvantitativní PCR (qPCR; „quantitative

polymerase chain reaction“). Tato nová metoda je stejně citlivá jako MLPA, časově nenáročná a vcelku levná, není však vhodná pro dokumentování rozsáhlých oblastí genomu (D'Haene *et al.* 2010).

7. Terapie

Je logické, že léčba deficiencie genu *SHOX* může být pouze symptomatická, tedy zaměřená na důsledky, nikoliv příčiny. Stejně jako u jiných poruch, jejichž důsledkem je malá postava, se i u deficiencie genu *SHOX* úspěšně používá léčba pomocí lidského rekombinantního růstového hormonu (rhGH). Léčba růstovým hormonem je však velmi nákladná a časově náročná – může trvat i několik let. Důležité je správné načasování léčby; čím později začneme růstový hormon podávat, tím se snižuje šance na úspěch a tedy dosažení optimální výšky (D'Haene *et al.* 2010). Bylo prokázáno, že pokud se léčba u pacientů zahájí až po začátku jejich pubertálního růstového spurtu, dochází k rapidní progresi maturace kostí, předčasné fúzi růstových plotének a tím k předčasné zástavě růstu a ztrátě výškového růstového potenciálu. Je tedy nanejvýš vhodné nasadit léčbu již u prepubertálních dětí (Scalco *et al.* 2010). Z tohoto důvodu je nezbytná včasná diagnostika pomocí screeningových metod. Je však nutné včas detekovat změny nejen v oblasti genu *SHOX*, ale i v oblastech okolních, regulačních (D'Haene *et al.* 2010).

V roce 2009 vyzkoušeli Scalco *et al.* kombinovanou léčbu pěti *SHOX*-deficientních pacientů pomocí lidského rekombinantního růstového hormonu (rhGH) podávaného společně s analogem gonadotropiny uvolňujícího hormonu (GnRHa). Dalších pět pacientů se stejnou diagnózou léčbu nepodstoupilo. U všech pěti neléčených pacientů docházelo během puberty postupně ke snižování jejich výškového SD skóre, zatímco čtyřem z pěti léčených pacientů se jejich SD skóre postupně zvyšovalo. Tělesné disproporce pozorované u všech pacientů před začátkem terapie se během léčby nezlepšily. U třech pacientů však nedošlo ke vzniku Madelungovy deformity. Scalco *et al.* zastávají názor, že nová kombinovaná terapie rhGH společně s GnRHa může předcházet rozvoji Madelungovy deformity. Zároveň tak poukazují na to, že tato léčba se zdá být účinnější než léčba samotným růstovým hormonem (Scalco *et al.* 2010).

Pozoruhodné je, že pacienti s defekty v genu *SHOX* reagují na léčbu růstovým hormonem stejně jako pacienti s ISS bez defektů v genu *SHOX* (Binder *et al.* 2000 in Hintz 2002). Jiné studie pak prokázaly, že děti s izolovanými defekty genu *SHOX* léčené pomocí rhGH reagovali na růstový hormon stejně, jako pacienti s Turnerovým syndromem. Pozitivní vliv podávání růstového hormonu pro dosažení optimální výšky je nezpochybnitelný a tato terapie je účinná i přesto, že pacienti s deficiencí genu *SHOX* či pacientky s Turnerovým

syndromem mají normální hladiny „svého“ růstového hormonu, tzn. nevykazují jeho deficienci (Blum *et al.* 2007 in Scalco *et al.* 2010).

8. Závěr

Malá postava postihuje průměrně 2 % dětí. Přestože nízký vzrůst může mít mnoho příčin, je u takto postižených jedinců často nalezena mutace v genu *SHOX*. Gen *SHOX* vykazuje pozitivní účinek na prodlužování kostí končetin a jeho poruchy vedou k charakteristickému fenotypu nízkého vzrůstu.

Deficience produktu genu *SHOX* je relativně mladý pojem, neboť samotný gen *SHOX* byl objeven v roce 1997. Fenotyp jedinců s poruchou genu *SHOX* je značně variabilní, a to dokonce i mezi členy jedné rodiny – od idiopatického malého vzrůstu až po vážně skeletální dysmorfie. Zdá se, že deficience genu *SHOX* je příčinou malého vzrůstu u bezmála 100 % pacientek s Turnerovým syndromem, 50 – 100 % pacientů s Léři-Weillovým, 100 % pacientů s Langerovým syndromem a okolo 2 % pacientů s idiopatickým (tedy zdánlivě „bezpříčinným“) malým vzrůstem.

Přestože fenotypový projev deficience genu *SHOX* je poměrně dobře zdokumentován, stále ještě neznáme přesnou roli tohoto genu v růstu a vývoji kostí. Pro studium deficience produktu genu *SHOX* neexistuje žádný myší model. Přestože je pro názornější představu o fungování tohoto genu využíván model kuřecích embryí, stále nejlepším modelem pro pochopení role genu *SHOX* v normálním i abnormálním růstu a vývoji kostí zůstává člověk sám. Odhalit molekulární mechanismy působení genu *SHOX* a především jím kódovaných proteinů bude v následujících letech stěžejním úkolem pro vědce zabývající se touto problematikou.

9. Seznam použitých zkratek

BMI ... body mass index

BNP ... brain natriuretic peptide

bp ... base pairs

CGH ... comparative genome hybridization

CNEs ... conserved non-coding elements

FGFR3 ... fibroblast growth factor receptor gene 3

FISH ... fluorescence *in situ* hybridization

GnRHa ... gonadotropin releasing hormone analogue

ISS ... idiopathic short stature

kbp ... kilobase pairs

LWD ... Léri-Weill dyschondrosteosis

LWS ... Léri-Weill syndrom

MLPA ... multiplex ligation-dependent probe amplification

NLS ... nuclear localisation signal

NPPB ... natriuretic peptide precursor B

OAR ... otp, aristaless, rax

PAB ... pseudoautosomal boundary

PAR ... pseudoautosomal region

PHOG ... pseudoautosomal homeobox-containing gene

qPCR ... quantitative polymerase chain reaction

rhGH ... recombinant human growth hormone

RT-PCR ... reverse transcription polymerase chain reaction

SDS ... standard deviation score

SH3 ... Src homology 3

SHOX ... short stature homeobox-containing gene

SHOX2 ... short stature homeobox 2

TS ... Turner syndrom

UTR ... untranslated region

10. Seznam použité literatury

* literatura citovaná sekundárně

- Aza-Carmona, M., D. J. Shears, P. Yuste-Checa, V. Barca-Tierno, A. Hisado-Oliva, A. Belinchon, S. Benito-Sanz, J. I. Rodriguez, J. Argente, A. Campos-Barros, P. J. Scambler, and K. E. Heath, 2011, SHOX interacts with the chondrogenic transcription factors SOX5 and SOX6 to activate the aggrecan enhancer, *Hum Mol Genet*, v. 20: England, p. 1547-59.
- *Bartel, D. P., 2004, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, v. 116: United States, p. 281-97.
- *Belin, V., V. Cusin, G. Viot, D. Girlich, A. Toutain, A. Moncla, M. Vekemans, M. Le Merrer, A. Munnich, and V. Cormier-Daire, 1998, SHOX mutations in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome): *Nat Genet*, v. 19, p. 67-9.
- Benito-Sanz, S., N. S. Thomas, C. Huber, D. Gorbenko del Blanco, M. Aza-Carmona, J. A. Crolla, V. Maloney, G. Rappold, J. Argente, A. Campos-Barros, V. Cormier-Daire, and K. E. Heath, 2005, A novel class of Pseudoautosomal region 1 deletions downstream of SHOX is associated with Leri-Weill dyschondrosteosis, *Am J Hum Genet*, v. 77: United States, p. 533-44.
- Bertorelli, R., L. Capone, F. Ambrosetti, L. Garavelli, L. Varriale, V. Mazza, I. Stanghellini, A. Percesepe, and A. Forabosco, 2007, The homozygous deletion of the 3' enhancer of the SHOX gene causes Langer mesomelic dysplasia: *Clinical Genetics*, v. 72, p. 490-491.
- Binder, G., 2011, Short Stature due to SHOX Deficiency: Genotype, Phenotype, and Therapy: *Hormone Research in Paediatrics*, v. 75, p. 81-89.
- Binder, G., T. Eggermann, H. Enders, M. B. Ranke, and A. Dufke, 2001, Tall stature, gonadal dysgenesis, and stigmata of Turner's syndrome caused by a structurally altered X chromosome: *Journal of Pediatrics*, v. 138, p. 285-287.
- *Binder, G., C. P. Schwarze, and M. B. Ranke, 2000, Identification of short stature caused by SHOX defects and therapeutic effect of recombinant human growth hormone: *J Clin Endocrinol Metab*, v. 85, p. 245-9.
- Blaschke, R. J., A. P. Monaghan, S. Schiller, B. Schechinger, E. Rao, H. Padilla-Nash, T. Ried, and G. A. Rappold, 1998, SHOT, a SHOX-related homeobox gene, is implicated in craniofacial, brain, heart, and limb development: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, p. 2406-11.
- Blaschke, R. J., and G. Rappold, 2006, The pseudoautosomal regions, SHOX and disease, *Curr Opin Genet Dev*, v. 16: England, p. 233-9.
- Blaschke, R. J., and G. A. Rappold, 2000, SHOX: Growth, Leri-Weill and Turner syndromes: *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 11, p. 227-230.
- Blaschke, R. J., C. Topfer, A. Marchini, H. Steinbeisser, J. W. Janssen, and G. A. Rappold, 2003, Transcriptional and translational regulation of the Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX, *J Biol Chem*, v. 278: United States, p. 47820-6.
- *Bleyl, S. B., J. L. Byrne, S. T. South, D. C. Dries, D. A. Stevenson, A. F. Rope, A. M. Vianna-Morgante, G. C. Schoenwolf, J. D. Kivlin, A. Brothman, and J. C. Carey, 2007, Brachymesomelic dysplasia with Peters anomaly of the eye results from disruptions of the X chromosome near the SHOX and SOX3 genes: *Am J Med Genet A*, v. 143A, p. 2785-95.
- *Blum, W. F., B. J. Crowe, C. A. Quigley, H. Jung, D. Cao, J. L. Ross, L. Braun, and G. Rappold, 2007, Growth hormone is effective in treatment of short stature associated with short stature homeobox-containing gene deficiency: Two-year results of a randomized, controlled, multicenter trial, *J Clin Endocrinol Metab*, v. 92: United States, p. 219-28.
- *Charchar, F. J., M. Svartman, N. El-Mogharbel, M. Ventura, P. Kirby, M. R. Matarazzo, A. Ciccodicola, M. Rocchi, M. D'Esposito, and J. A. M. Graves, 2003, Complex events in the evolution of the human pseudoautosomal region 2 (PAR2): *Genome Research*, v. 13, p. 281-286.
- Chen, J., G. Wildhardt, Z. Zhong, R. Roth, B. Weiss, D. Steinberger, J. Decker, W. F. Blum, and G. Rappold, 2009, Enhancer deletions of the SHOX gene as a frequent cause of short stature: the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain: *Journal of Medical Genetics*, v. 46, p. 834-839.
- Clement-Jones, M., S. Schiller, E. Rao, R. J. Blaschke, A. Zuniga, R. Zeller, S. C. Robson, G. Binder, I. Glass, T. Strachan, S. Lindsay, and G. A. Rappold, 2000, The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome, *Hum Mol Genet*, v. 9: England, p. 695-702.
- D'Haene, B., J. Hellems, M. Craen, J. De Schepper, K. Devriendt, J. P. Fryns, K. Keymolen, E. Debals, A. de Klein, E. M. de Jong, K. Segers, A. De Paepe, G. Mortier, J. Vandesompele, and E. De Baere, 2010, Improved molecular diagnostics of idiopathic short stature and allied disorders: quantitative polymerase chain reaction-based copy number profiling of SHOX and pseudoautosomal region 1, *J Clin Endocrinol Metab*, v. 95: United States, p. 3010-8.
- Decker, E., C. Durand, S. Bender, C. Rodelsperger, A. Glaser, J. Hecht, K. U. Schneider, and G. Rappold, 2011, FGFR3 is a target of the homeobox transcription factor SHOX in limb development, *Hum Mol Genet*, v. 20: England, p. 1524-35.
- del Rey, G., H. Jasper, S. V. Bengolea, A. Boywitt, R. De Bellis, and J. J. Heinrich, 2010, Trisomy of the short stature homeobox-containing gene (SHOX) due to duplication/deletion of the X chromosome: clinical implications on the stature, *Horm Res Paediatr*, v. 74: Switzerland, Basel., p. 297-304.
- Durand, C., F. Bangs, J. Signolet, E. Decker, C. Tickle, and G. Rappold, 2010, Enhancer elements upstream of the SHOX gene are active in the developing limb, *Eur J Hum Genet*, v. 18: England, p. 527-32.

- Durand, C., R. Roeth, H. Dweep, I. Vlatkovic, E. Decker, K. U. Schneider, and G. Rappold, 2011, Alternative splicing and nonsense-mediated RNA decay contribute to the regulation of SHOX expression: *PLoS One*, v. 6, p. e18115.
- Ellison, J. W., Z. Wardak, M. F. Young, P. Gehron Robey, M. Laig-Webster, and W. Chiong, 1997, PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome, *Hum Mol Genet*, v. 6: England, p. 1341-7.
- *Espiritu, C., H. Chen, and P. V. Woolley, Jr., 1975, Mesomelic dwarfism as the homozygous expression of dyschondrosteosis: *Am J Dis Child*, v. 129, p. 375-7.
- Evers, C., P. H. Heidemann, D. Dunstheimer, E. Schulze, C. Haag, J. W. G. Janssen, C. Fischer, A. Jauch, and U. Moog, 2011, Pseudoautosomal inheritance of Leri-Weill syndrome: what does it mean?: *Clinical Genetics*, v. 79, p. 489-494.
- Flanagan, S. F., C. F. Munns, M. Hayes, B. Williams, M. Berry, D. Vickers, E. Rao, G. A. Rappold, J. A. Batch, V. J. Hyland, and I. A. Glass, 2002, Prevalence of mutations in the short stature homeobox containing gene (SHOX) in Madelung deformity of childhood: *J Med Genet*, v. 39, p. 758-63.
- Fukami, M., F. Kato, T. Tajima, S. Yokoya, and T. Ogata, 2006, Transactivation function of an similar to 800-bp evolutionarily conserved sequence at the SHOX 3' region: Implication for the downstream enhancer: *American Journal of Human Genetics*, v. 78, p. 167-170.
- Funari, M. F., A. A. Jorge, S. C. Souza, A. E. Billerbeck, I. J. Arnhold, B. B. Mendonca, and M. Y. Nishi, 2010, Usefulness of MLPA in the detection of SHOX deletions, *Eur J Med Genet*, v. 53: Netherlands, 2010 Elsevier Masson SAS, p. 234-8.
- Funari, M. F., M. Y. Nishi, R. C. Scalco, A. A. Jorge (2012) *Genetics of SHOX deficiency*. eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. <http://www.els.net>; DOI: 10.1002/9780470015902.a0023852.
- *Gehring, W. J., M. Affolter, and T. Burglin, 1994, Homeodomain proteins: *Annu Rev Biochem*, v. 63, p. 487-526.
- Helena Mangs, A., and B. J. Morris, 2007, The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future: *Curr Genomics*, v. 8, p. 129-36.
- Hintz, R. L., 2002, SHOX mutations: *Rev Endocr Metab Disord*, v. 3, p. 363-7.
- *Hook, E. B. and D. Warburton (1983) The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner's syndrome: livebirth prevalence rates and evidence for diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities or mosaicism. *Hum Genet*, v. 64, 24-7.
- *Horton, W. A., J. G. Hall, and J. T. Hecht, 2007, Achondroplasia, *Lancet*, v. 370: England, p. 162-72.
- *Ikeda, T., S. Kamekura, A. Mabuchi, I. Kou, S. Seki, T. Takato, K. Nakamura, H. Kawaguchi, S. Ikegawa, and U. I. Chung, 2004, The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage: *Arthritis Rheum*, v. 50, p. 3561-73.
- Jorge, A. A., S. C. Souza, M. Y. Nishi, A. E. Billerbeck, D. C. Liborio, C. A. Kim, I. J. Arnhold, and B. B. Mendonca, 2007, SHOX mutations in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis: frequency and phenotypic variability, *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 66: England, p. 130-5.
- Kant, S. G., H. J. van der Kamp, M. Kriek, E. Bakker, B. Bakker, M. J. Hoffer, P. van Bunderen, M. Losekoot, S. M. Maas, J. M. Wit, G. Rappold, and M. H. Breuning, 2011, The jumping SHOX gene--crossover in the pseudoautosomal region resulting in unusual inheritance of Leri-Weill dyschondrosteosis, *J Clin Endocrinol Metab*, v. 96: United States, p. E356-9.
- *Koch, C. A., D. Anderson, M. F. Moran, C. Ellis, and T. Pawson, 1991, SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins: *Science*, v. 252, p. 668-74.
- *Langer, L. O., 1965, Dyschondrosteosis a Hereditary Bone Dysplasia with Characteristic Roentgenographic Features: *American Journal of Roentgenology Radium Therapy and Nuclear Medicine*, v. 95, p. 178-&.
- *Langer, L. O., Jr., 1967, Mesomelic dwarfism of the hypoplastic ulna, fibula, mandible type: *Radiology*, v. 89, p. 654-60.
- *Lien, S., J. Szyda, B. Schechinger, G. Rappold, and N. Arnheim, 2000, Evidence for heterogeneity in recombination in the human pseudoautosomal region: High resolution analysis by sperm typing and radiation-hybrid mapping: *American Journal of Human Genetics*, v. 66, p. 557-566.
- Marchini, A., L. Daeffler, T. Marttila, K. U. Schneider, R. J. Blaschke, M. Schnolzer, J. Rommelaere, and G. Rappold, 2006, Phosphorylation on Ser106 modulates the cellular functions of the SHOX homeodomain protein, *J Mol Biol*, v. 355: England, p. 590-603.
- Marchini, A., T. Marttila, A. Winter, S. Caldeira, I. Malanchi, R. J. Blaschke, B. Hacker, E. Rao, M. Karperien, J. M. Wit, W. Richter, M. Tommasino, and G. A. Rappold, 2004, The short stature homeodomain protein SHOX induces cellular growth arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes, *J Biol Chem*, v. 279: United States, p. 37103-14.
- Marchini, A., G. Rappold, and K. U. Schneider, 2007, SHOX at a glance: from gene to protein, *Arch Physiol Biochem*, v. 113: England, p. 116-23.
- Munns, C. J., H. R. Haase, L. M. Crowther, M. T. Hayes, R. Blaschke, G. Rappold, I. A. Glass, and J. A. Batch, 2004, Expression of SHOX in human fetal and childhood growth plate, *J Clin Endocrinol Metab*, v. 89: United States, p. 4130-5.
- Niesler, B., C. Fischer, and G. A. Rappold, 2002, The human SHOX mutation database: *Hum Mutat*, v. 20, p. 338-41.
- *Ogata, T., M. Inokuchi, and M. Ogawa, 2002, Growth pattern and body proportion in a female with short stature homeobox-containing gene overdosage and gonadal estrogen deficiency, *Eur J Endocrinol*, v. 147: England, p. 249-54.
- Ogata, T., N. Matsuo, and G. Nishimura, 2001, SHOX haploinsufficiency and overdosage: impact of gonadal function status: *Journal of Medical Genetics*, v. 38, p. 1-6.

- *Ranke, MB. (1994) The KIGS aetiology classification system. In Ranke R., Gunnarson MB, editors. Progress in growth hormone therapy – 5 years of KIGS. Mannheim: J&J Verlag, pp 51 – 61.
- Rao, E., R. J. Blaschke, A. Marchini, B. Niesler, M. Burnett, and G. A. Rappold, 2001, The Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX encodes a cell-type specific transcriptional activator: *Hum Mol Genet*, v. 10, p. 3083-91.
- Rao, E., B. Weiss, M. Fukami, A. Rump, B. Niesler, A. Mertz, K. Muroya, G. Binder, S. Kirsch, M. Winkelmann, G. Nordsiek, U. Heinrich, M. H. Breuning, M. B. Ranke, A. Rosenthal, T. Ogata, and G. A. Rappold, 1997, Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome: *Nat Genet*, v. 16, p. 54-63.
- Rappold, G., W. F. Blum, E. P. Shavrikova, B. J. Crowe, R. Roeth, C. A. Quigley, J. L. Ross, and B. Niesler, 2007, Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency, *J Med Genet*, v. 44: England, p. 306-13.
- Rappold, G. A., 1993, The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes: *Hum Genet*, v. 92, p. 315-24.
- Rappold, G. A., C. Durand, E. Decker, A. Marchini, and K. U. Schneider, 2012, New roles of SHOX as regulator of target genes: *Pediatr Endocrinol Rev*, v. 9 Suppl 2, p. 733-8.
- Rappold, G. A., M. Fukami, B. Niesler, S. Schiller, W. Zumkeller, M. Bettendorf, U. Heinrich, E. Vlachopapadopoulou, T. Reinehr, K. Onigata, and T. Ogata, 2002, Deletions of the homeobox gene SHOX (short stature homeobox) are an important cause of growth failure in children with short stature: *J Clin Endocrinol Metab*, v. 87, p. 1402-6.
- Ross, J. L., K. Kowal, C. A. Quigley, W. F. Blum, G. B. Cutler, Jr., B. Crowe, K. Hovanes, F. F. Elder, and A. R. Zinn, 2005, The phenotype of short stature homeobox gene (SHOX) deficiency in childhood: contrasting children with Leri-Weill dyschondrosteosis and Turner syndrome, *J Pediatr*, v. 147: United States, p. 499-507.
- Ross, J. L., C. Scott, Jr., P. Marttila, K. Kowal, A. Nass, P. Papenhausen, J. Abboudi, L. Osterman, H. Kushner, P. Carter, M. Ezaki, F. Elder, F. Wei, H. Chen, and A. R. Zinn, 2001, Phenotypes Associated with SHOX Deficiency: *J Clin Endocrinol Metab*, v. 86, p. 5674-80.
- *Ryan, K. M., A. C. Phillips, and K. H. Vousden, 2001, Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein, *Curr Opin Cell Biol*, v. 13: United States, p. 332-7.
- Sabherwal, N., F. Bangs, R. Roth, B. Weiss, K. Jantz, E. Tiecke, G. K. Hinkel, C. Spaich, B. P. Hauffa, H. van der Kamp, J. Kapeller, C. Tickle, and G. Rappold, 2007, Long-range conserved non-coding SHOX sequences regulate expression in developing chicken limb and are associated with short stature phenotypes in human patients, *Hum Mol Genet*, v. 16: England, p. 210-22.
- Sabherwal, N., K. U. Schneider, R. J. Blaschke, A. Marchini, and G. Rappold, 2004, Impairment of SHOX nuclear localization as a cause for Leri-Weill syndrome, *J Cell Sci*, v. 117: England, p. 3041-8.
- Scalco, R. C., S. S. Melo, P. N. Pugliese-Pires, M. F. Funari, M. Y. Nishi, I. J. Arnhold, B. B. Mendonca, and A. A. Jorge, 2010, Effectiveness of the combined recombinant human growth hormone and gonadotropin-releasing hormone analog therapy in pubertal patients with short stature due to SHOX deficiency, *J Clin Endocrinol Metab*, v. 95: United States, p. 328-32.
- Schiller, S., S. Spranger, B. Schechinger, M. Fukami, S. Merker, S. L. Drop, J. Troger, H. Knoblauch, J. Kunze, J. Seidel, and G. A. Rappold, 2000, Phenotypic variation and genetic heterogeneity in Leri-Weill syndrome: *Eur J Hum Genet*, v. 8, p. 54-62.
- *Schmitt, K., L. C. Lazzeroni, S. Foote, D. Vollrath, E. M. C. Fisher, T. M. Goradia, K. Lange, D. C. Page, and N. Arnheim, 1994, Multipoint Linkage Map of the Human Pseudoautosomal Region, Based on Single-Sperm Typing - Do Double Crossovers Occur During Male Meiosis: *American Journal of Human Genetics*, v. 55, p. 423-430.
- Schneider, K. U., A. Marchini, N. Sabherwal, R. Roth, B. Niesler, T. Marttila, R. J. Blaschke, M. Lawson, M. Domic, and G. Rappold, 2005, Alteration of DNA binding, dimerization, and nuclear translocation of SHOX homeodomain mutations identified in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis: *Hum Mutat*, v. 26, p. 44-52.
- Semina, E. V., R. S. Reiter, and J. C. Murray, 1998, A new human homeobox gene OGI2X is a member of the most conserved homeobox gene family and is expressed during heart development in mouse, *Hum Mol Genet*, v. 7: England, p. 415-22.
- Shears, D. J., E. Guillen-Navarro, M. Sempere-Miralles, R. Domingo-Jimenez, P. J. Scambler, and R. M. Winter, 2002, Pseudodominant inheritance of Langer mesomelic dysplasia caused by a SHOX homeobox missense mutation: *American Journal of Medical Genetics*, v. 110, p. 153-157.
- *Shears, D. J., H. J. Vassal, F. R. Goodman, R. W. Palmer, W. Reardon, A. Superti-Furga, P. J. Scambler, and R. M. Winter, 1998, Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene SHOX cause Leri-Weill dyschondrosteosis: *Nat Genet*, v. 19, p. 70-3.
- Tiecke, E., F. Bangs, R. Blaschke, E. R. Farrell, G. Rappold, and C. Tickle, 2006, Expression of the short stature homeobox gene Shox is restricted by proximal and distal signals in chick limb buds and affects the length of skeletal elements, *Dev Biol*, v. 298: United States, p. 585-96.
- *Weise, M., S. De-Levi, K. M. Barnes, R. I. Gafni, V. Abad, and J. Baron, 2001, Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion, *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98: United States, p. 6871-6.
- Wolberger, C., 1996, Homeodomain interactions, *Curr Opin Struct Biol*, v. 6: England, p. 62-8.
- *Zinn, A. R., D. C. Page and E. M. Fisher (1993) Turner syndrome: the case of the missing sex chromosome. *Trends Genet*, v. 9, 90-3.
- Zinn, A. R., F. Wei, L. Zhang, F. F. Elder, C. I. Scott, Jr., P. Marttila, and J. L. Ross, 2002, Complete SHOX deficiency causes Langer mesomelic dysplasia: *Am J Med Genet*, v. 110, p. 158-63.