

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Tereza Veselková**

**Molekulární podstata X-vázané adrenoleukodystrofie: variabilita fenotypů a  
zešikmení X inaktivace u heterozygotek**

Molecular basis of X-linked adrenoleukodystrophy: phenotypic variability and skewed  
X inactivation in heterozygous females

Bakalářská práce

**Školitelka: RNDr. Lenka Dvořáková, CSc.**

Praha, 2014



### **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 Praze, 30. 4. 2014

.....

Tereza Veselková

## **Poděkování**

Především bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Lence Dvořákové, CSc. za věnovaný čas, cenné rady a připomínky. Dále pak své rodině za ochotu a trpělivost.

## **Abstrakt**

X-vázaná adrenoleukodystrofie (X-ALD) je dědičné peroxizomální onemocnění, způsobené mutacemi v genu *ABCD1* kódujícím ATP vázající kazetový transportér. V důsledku těchto mutací dochází u pacientů k akumulaci mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem a poruchám zejména v nervovém a adrenálním systému. Muži postižení X-ALD vykazují značnou variabilitu fenotypů, přičemž projevy onemocnění jsou nezávislé na typu mutace v *ABCD1*. Na výsledný fenotyp tak pravděpodobně mají vliv i jiné geny či environmentální faktory. Přestože se jedná o chorobu původně označovanou jako gonozomálně recesivní, 88 % heterozygotek starších 60 let má neurologické symptomy. Vliv zešíkmení X inaktivace na závažnost projevů X-ALD u žen byl studován v několika pracích, které přinesly velmi rozporuplné výsledky. Penetrance a expresivita onemocnění u žen je tak zřejmě ovlivněna i jinými faktory. Podle dosavadních výsledků zřejmě není možné na základě stanovení zešíkmení X inaktivace predikovat průběh nemoci.

**Klíčová slova:** X-vázaná adrenoleukodystrofie, mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem, *ABCD1*, X inaktivace, heterozygotky

## **Abstract**

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is an inherited peroxisomal disorder caused by mutations in the *ABCD1* gene which codes for an ATP binding cassette transporter. As a consequence of these mutations very long chain fatty acids accumulate in cells and patients develop neuronal and adrenal pathologies. There is a broad phenotypic variability in men suffering from X-ALD but the severity of symptoms is independent of *ABCD1* genotype. Therefore modifier genes and influence of environmental factors were suggested. Although X-ALD was originally referred to as gonosomal recessive, 88 % of heterozygote women over 60 have neurological symptoms. The association of skewed X chromosome inactivation and severity of disease was studied in several publications with conflicting results. Therefore the penetrance and expressivity of X-ALD in women is probably also influenced by other factors. Based on current knowledge future development of the disease cannot be predicted by evaluation of X inactivation patterns.

**Key words:** X-linked adrenoleukodystrophy, very long chain fatty acids, *ABCD1*, X inactivation, heterozygotes

## Obsah

1. Úvod .....	1
2. X-ALD.....	2
2.1. MK s velmi dlouhým řetězcem a ABCD1 transportér .....	2
2.1.1. Biochemie MK s velmi dlouhým řetězcem .....	2
2.1.2. Patofyziologie MK s velmi dlouhým řetězcem .....	3
2.1.3. ABCD1 transportér.....	4
2.2. Genetika X-ALD .....	5
2.3. Variabilita fenotypů.....	7
2.3.1. Základní rozdělení fenotypů.....	7
2.3.2. Faktory ovlivňující fenotyp .....	9
2.4. Diagnostika a léčba.....	10
2.4.1. Diagnostika.....	10
2.4.2 Terapie .....	10
3. Heterozygotní ženy.....	12
3.1. Inaktivace X chromozomu .....	12
3.1.1. Podstata X inaktivace .....	12
3.1.2. Zešikmení X inaktivace.....	14
3.2. Metody stanovení inaktivace chromozomu X.....	15
3.3. Zešikmení X inaktivace u heterozygotek .....	16
3.3.1 Zešikmení X inaktivace a onemocnění.....	16
3.3.2. Zešikmení X inaktivace u žen s X-ALD .....	17
4. Závěr.....	21
5. Seznam použitých zkratk .....	23
6. Seznam použité literatury .....	24

# 1. Úvod

X-vázaná adrenoleukodystrofie (X-ALD; OMIM 300100) je peroxizomální porucha s frekvencí výskytu přibližně 1:21 000 u hemizygotů a 1:14 000 u heterozygotek (Bezman et al. 2001). Její podstatou je defekt metabolismu mastných kyselin (MK) s velmi dlouhým řetězcem, které se hromadí v buňkách a způsobují patologie zejména v nervovém a adrenálním systému (Singh et al. 1984). Příčinou akumulace těchto MK je porucha jejich transportu do peroxisomů způsobená mutacemi v genu *ABCD1* (Mosser et al. 1993). Tento gen je lokalizován na chromozomu X, v oblasti Xq28 (Migeon et al. 1981) a kóduje ATP vázající kazetový transportér na peroxizomální membráně, přes nějž jsou aktivované thioestery koenzymu A s MK s velmi dlouhým řetězcem přenášeny do peroxizomu, kde dochází k jejich beta oxidaci (van Roermund et al. 2008).

U pacientů s X-ALD můžeme pozorovat značnou fenotypovou variabilitu, přičemž jednotlivé formy onemocnění se mohou kombinovat, či jedna v druhou přecházet. Nejčastěji jsou zaznamenáni pacienti s adrenomyeloneuropatií (AMN), či podstatně fatálnější cerebrální adrenoleukodystrofií (CALD). Pozorovat můžeme také adrenální insuficienci (Addisonova choroba), a to jak v kombinaci s některou z výše uvedených forem, tak v izolované podobě. Někteří jedinci zůstávají asymptomatictí (Moser et al. 2004). Velmi zajímavým zjištěním byl fakt, že u X-ALD neexistuje žádná známá korelace mezi fenotypem a genotypem (Korenke et al. 1996).

Vzhledem k lokalizaci genu podmiňujícího X-ALD na chromozomu X, se většina prací zaměřuje na studium pacientů mužského pohlaví, u nichž se gen *ABCD1* vyskytuje pouze v jedné kopii na genom. U heterozygotních žen se nabízí předpoklad, že variabilita fenotypů bude v souvislosti se zeškmením inaktivace chromozomu X. Dostupné studie na toto téma se však ve svých výsledcích rozcházejí.

Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky o molekulární podstatě X-ALD se zaměřením na vliv zeškmení X inaktivace na fenotypovou variabilitu u heterozygotních žen s přihlédnutím k použitým metodikám. Porozumění příčinám rozmanitosti projevů nemoci u žen by mohlo umožnit predikci rozvoje onemocnění a zefektivnit péči o pacientky.

## 2. X-ALD

### 2.1. MK s velmi dlouhým řetězcem a ABCD1 transportér

#### 2.1.1. Biochemie MK s velmi dlouhým řetězcem

Jako mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem označujeme kyseliny s 22 a více uhlíky v řetězci (výjimečně mezi ně někteří autoři zařazují i MK s 20 uhlíky či naopak jen MK s 24 a více uhlíky) (Ohno et al. 2010; Uchida 2011). V buňkách je můžeme nalézt v saturevané podobě nebo s jednou či více dvojnými vazbami mezi uhlíky, přičemž u pacientů s X-ALD jsou typicky zjišťovány zvýšené hladiny saturevaných nerozvětvených MK C24:0 a C26:0 a poměry C24:0/C22:0 a C26:0/C24:0 (Moser et al. 1998). S menší spolehlivostí bylo pozorováno zvýšené množství i dalších MK s velmi dlouhým řetězcem a při analýze pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem byla zjištěna i signifikantně zvýšená koncentrace C26:1 (Valianpour et al. 2003). Velký význam pro fyziologii buňky a zřejmě i pro vznik patologií u pacientů s X-ALD mají tyto MK jako součást membránově vázaných lipidů (estery fosfolipidů, gangliosidů a cholesterolu) (Igarashi et al. 1976).

Mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem v lidském těle pocházejí přímo z přijaté potravy nebo vznikají v buňkách prodloužením kratších řetězců (Kishimoto et al. 1980). Přestože hlavní podstatou X-ALD je defekt beta oxidace, bylo prokázáno, že elongace MK s kratším řetězcem je taktéž významným faktorem, neboť u pacientů dochází k jejímu zesílení (Kemp et al. 2005). K elongaci dochází na membráně endoplasmatického retikula ve čtyřech krocích (kondenzace, redukce, dehydratace a redukce), přičemž limitující reakcí je, díky substrátové specifitě enzymu, první kondenzace zprostředkovaná ELOVL elongázou (Osei et al. 1989). U savců bylo identifikováno celkem 7 různých ELOVL elongáz, které se liší svou afinitou k délce řetězce a počtu násobných vazeb v MK. Jako hlavní enzymy zodpovědné za syntézu C24:0 a C26:0 byly identifikovány proteiny ELOVL 1 a 4. Zvýšená exprese těchto enzymů nebyla u pacientů s X-ALD prokázána, příčinou zesílení elongace je tedy zřejmě samotná přítomnost většího množství MK v buňce (Ofman et al. 2010).

Jak již bylo zmíněno výše, hlavním metabolickým pochodem, který je u pacientů s X-ALD defektní, je beta oxidace MK s velmi dlouhým řetězcem, která probíhá v peroxizomech (Lazarow 1978). Aby mohly být MK degradovány, je jako první krok nutná jejich aktivace připojením koenzymu A. Na základě původních výzkumů by se dalo usuzovat, že příčinou X-ALD je defektní enzym zprostředkující právě tuto reakci, tedy jedna s acyl-CoA syntetáz



(Hashmi et al. 1986). Až práce identifikující gen pomocí pozičního klonování poukázala na homologii aminokyselinové sekvence výsledného proteinu s membránovými transportéry (Mosser et al. 1993).

### 2.1.2. Patofyziologie MK s velmi dlouhým řetězcem

Mechanismus patologického působení MK s velmi dlouhým řetězcem doposud nebyl zcela přesně stanoven. I u kontrol z běžné populace nepostižených X-ALD se význam a zastoupení těchto MK v jednotlivých typech tkání značně liší (Lu et al. 1997). U postižených pacientů bylo navíc prokázáno, že fenotyp koreluje s koncentrací MK s velmi dlouhým řetězcem v bílé mozkové hmotě, nikoliv však například s hodnotami naměřenými v krevní plazmě (Asheuer et al. 2005; Moser et al. 1999). Lze se tedy domnívat, že jejich působení se liší podle typu tkáně a může být kombinací několika faktorů.

Mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem jsou ze své podstaty silně hydrofobní a uhlíkovým řetězcem pronikají velmi hluboko do lipidové dvojvrstvy, čímž mohou významně alterovat strukturu plazmatické membrány. Při studiu na modelových membránách bylo prokázáno, že k uvolňování hexakosanové kyseliny (C26:0) dochází výrazně pomaleji než u MK s kratším řetězcem (Ho et al. 1995). Pozorován byl i vliv obsahu MK s velmi dlouhým řetězcem na mikroviskozitu membrány. Ta u erytrocytů i adrenokortikálních buněk rostla společně s délkou zabudovaných řetězců, což u pacientů s X-ALD může mít vliv na dostupnost receptorů pro hormony, a být tak podstatou adrenální a testikulární insuficience (Knazek et al. 1983; Whitcomb 1988).

Neobjasněno zůstává, zdali změny ve struktuře membrán mohou stát i za axonopatií u pacientů s AMN a za spuštěním zánětlivé demyelinizace axonů v centrální nervové soustavě. K té u člověka dochází při cerebrální formě X-ALD, u myšičího modelu pro X-ALD se však nerozvíjí, což výzkum CALD značně znesnadňuje (Pujol et al. 2002). Nicméně potkaní astrocyty, oligodendrocyty a neurony kultivované s MK s velmi dlouhým řetězcem několikanásobně častěji podléhají buněčné smrti než kontroly. Pozorováno bylo výrazné zvýšení koncentrace vápenatých iontů, depolarizace mitochondrií a inhibice  $F_1F_0$ -ATPázy. Možnou příčinou těchto procesů může být inkorporace MK s velmi dlouhým řetězcem do mitochondriální membrány. Na rozdíl od níže zmíněných publikací v tomto případě nebyl pozorován zesílený oxidativní stress (Hein et al. 2008). Ten by mohl být faktorem způsobujícím patologii v buňkách pacientů s X-ALD (Vargas et al. 2004). S největším úspěchem v této oblasti se setkaly studie provedené na lidských fibroblastech a vzorcích tkáně páteřní míchy z myšičího modelu pro X-ALD. V myšičích buňkách bylo pozorováno oxidativní

narušení proteinů a to již před nástupem neurologických symptomů. U lidských X-ALD fibroblastů byla prokázána zvýšená produkce volných radikálů při kultivaci s menším množstvím MK s velmi dlouhým řetězcem, než bylo potřeba u fibroblastů použitých jako kontroly (Fourcade et al. 2008). Na stejném typu buněk bylo prokázáno narušení oxidativní fosforylace v mitochondriích a produkce volných radikálů v nadbytku C26:0 (López-Erauskin et al. 2013).

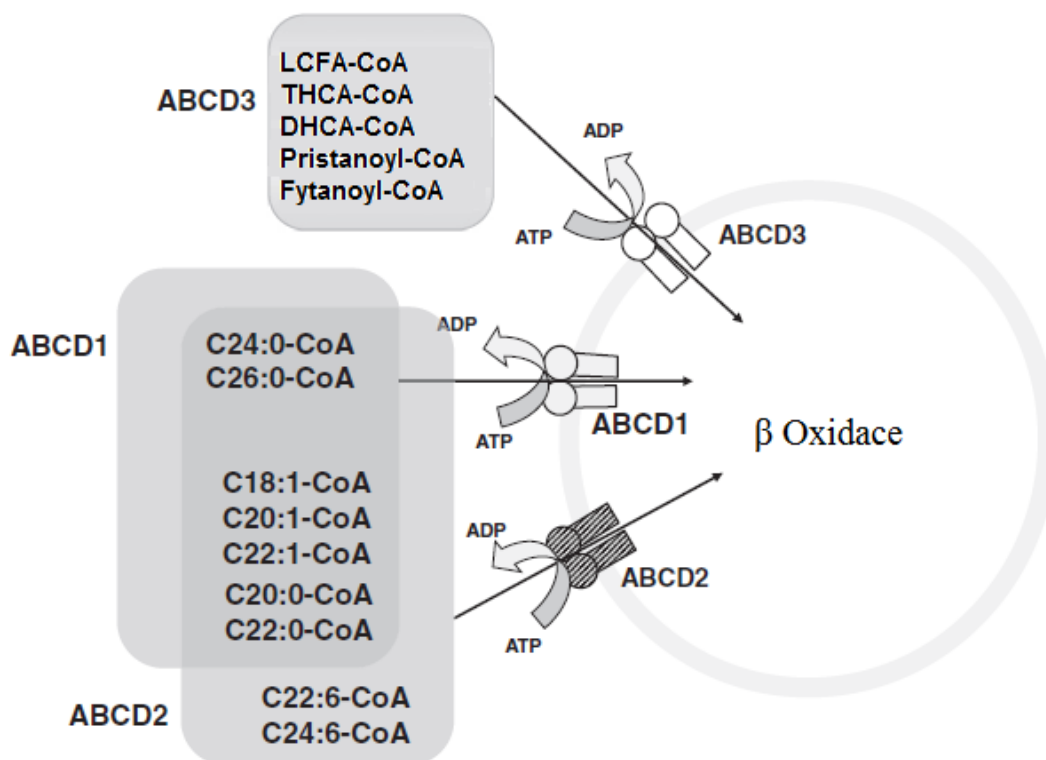
### 2.1.3. ABCD1 transportér

ABCD1 (nazývaný též ALDP) transportér patří mezi eukaryotické peroxizomální exportéry využívající pro přenos energie z rozkladu adenosintrifosfátu (ATP) (Mosser et al. 1993; Contreras et al. 1994). Do podrodiny D řadíme ještě další dva transportéry v peroxizomech a to ABCD2 (ALDRP) a ABCD3 (PMP70) a protein ABCD4 (P70R), který se nalézá na membráně endoplasmatického retikula (Kamijo et al. 1990; Kashiwayama et al. 2009; Lombard-Platet et al. 1996). Mezi sebou se tyto transportéry liší svou substrátovou specifitou. ABCD1 přenáší zejména nasycené a mononenasycené MK s dlouhým a velmi dlouhým řetězcem (s největší specifitou pro C24:0 a C26:0). ABCD2 se s ABCD1 substrátově do značné míry překrývá, má však také afinitu k polynenasyceným MK s velmi dlouhým řetězcem (van Roermund et al. 2011). ABCD3 transportuje pravděpodobně zejména více hydrofilní MK (van Roermund et al. 2013) (viz obrázek 1). Podle posledních poznatků je i ABCD3 schopen částečně nahradit funkci ABCD1 nicméně pouze s mnohonásobně nižší účinností (Wiesinger et al. 2013). Překrývající se substrátovou specifitu ABCD1 a ABCD2 potvrdil také experiment, při kterém se u fibroblastů izolovaných od pacientů s X-ALD podařilo normalizovat hladiny MK s velmi dlouhým řetězcem zvýšenou expresí ABCD2 (Netik et al. 1999). Tyto výsledky vedly k návrhu, že gen kódující ABCD2 by mohl být jedním z kandidátních genů ovlivňujících fenotyp. Při analýze tohoto genu u rodin s X-ALD se však tato myšlenka nepotvrdila (Maier et al. 2008).

Adenosintrifosfát vázající kazetové transportéry na peroxizomální membráně fungují ve formě dimerů, přičemž bylo prokázáno, že všechny tři proteiny jsou schopny tvořit jak homodimery, tak heterodimery (Liu et al. 1999). Otázkou zůstává frekvence tvorby heterodimerů *in vivo* a jejich substrátová specifita.

Monomer ABCD1 má jednu transmembránovou a jednu nukleotid-vázající doménu. Amino konec proteinu je více hydrofobní a tvoří šest transmembránových segmentů, blíže

karboxy konci je protein hydrofilní, obsahuje pro ABC transportéry typické motivy Walker A a Walker B a dochází zde k vazbě a hydrolyze ATP (Mosser et al. 1993).



**Obr. 1:** Substrátová specifita peroxizomálních ABCD transportérů

LCFA – MK s dlouhým řetězcem, THCA – kyselina trihydroxycholestanová, DHCA – kyselina dihydroxycholestanová, CoA – Koenzym A

*Upraveno podle: Morita & Imanaka (2012)*

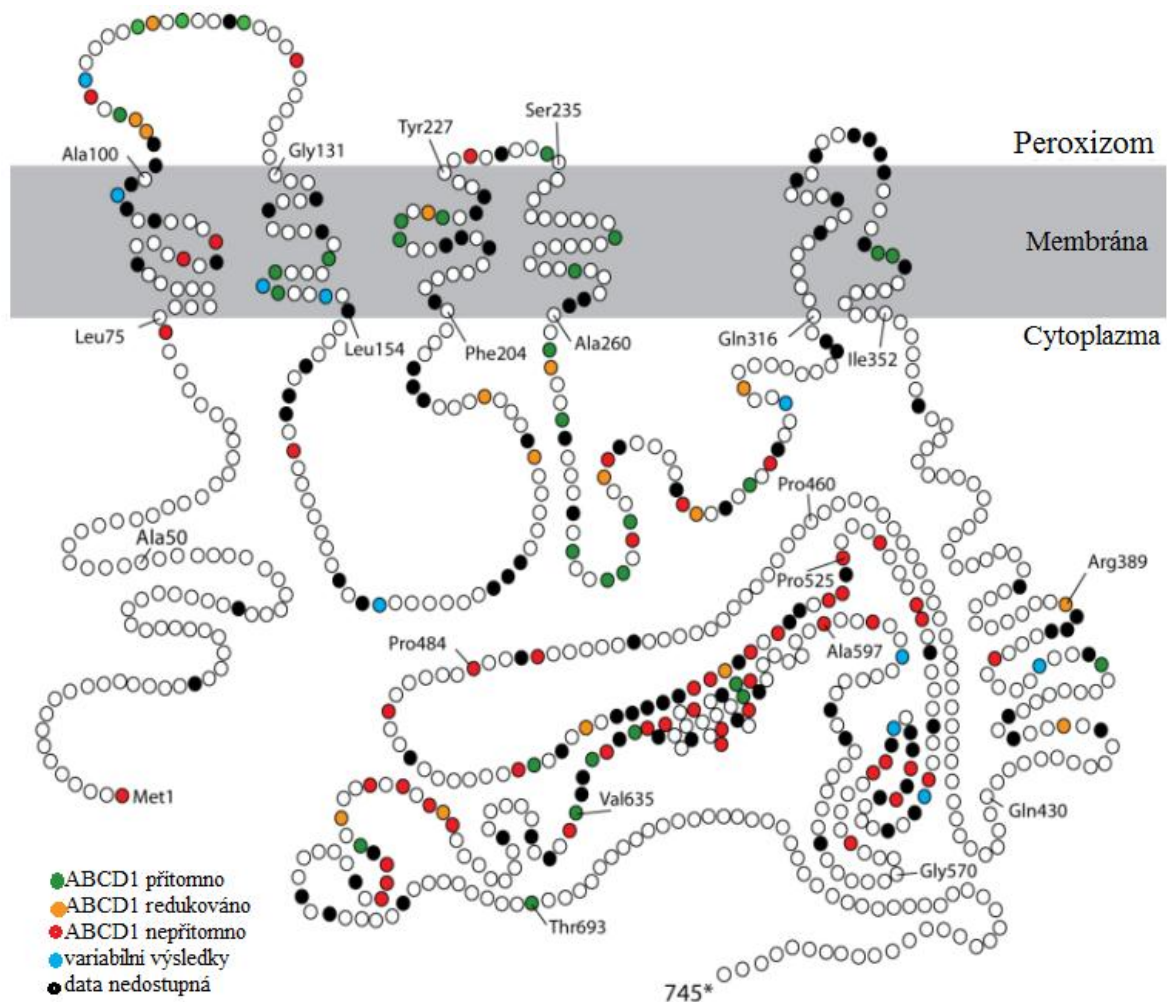
## 2.2. Genetika X-ALD

Pozice genu *ABCD1* byla zmapována do oblasti Xq28 (Migeon et al. 1981), gen obsahuje 10 exonů a má délku přibližně 19,9 kb ([www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/215](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/215)), přičemž kóduje mRNA o délce 4,3 kb a výsledný protein o 745 aminokyselinových zbytcích (Mosser et al. 1993).

V roce 1999 byla při Laboratoři peroxizomálních onemocnění v Institutu Kennedyho a Kriegera v USA a Laboratoři genetických metabolických onemocnění na Akademickém lékařském centru v Holandsku založena databáze, jejímž primárním cílem bylo shromažďovat a katalogizovat mutace v *ABCD1* genu ([www.x-ald.nl](http://www.x-ald.nl)). V současné době databáze obsahuje 693 různých popsanych mutací. Zastoupením nejčastější jsou missense mutace, ale setkáváme se i s mutacemi způsobujícími posun čtecího rámce, nonsense mutacemi, insercemi a delecemi aminokyselin či celých exonů. Doposud popsane mutace se vyskytují napříč celým

genem, nejsou ovšem rozloženy zcela rovnoměrně. Oproti ostatním úsekům je více mutací pozorováno v částech kódujících transmembránovou a ATP-vázající doménu (Kemp et al. 2001). V exonech 1 a 2, které obsahují úsek s transmembránovou doménou je nashromážděno více než 40 % všech popsanych mutací, v exonech 6, 7, 8 a 9 obsahujících ATP-vázající doménu bylo zaznamenáno více než 30 % všech mutací ([www.x-ald.nl/mutations-gene/mutation-statistics](http://www.x-ald.nl/mutations-gene/mutation-statistics)).

Vliv jednotlivých mutací na stabilitu proteinu se liší. Na obrázku 2 je znázorněn vliv více než dvou set missense mutací na ABCD1 ve fibroblastech, přičemž přítomnost proteinu byla sledována pomocí imunofluorescence (Berger et al. 2011, [www.x-ald.nl/mutations-gene/mutations-stability](http://www.x-ald.nl/mutations-gene/mutations-stability)). Nicméně v některých případech může být citlivější metodou imunoblot, s jehož použitím lze detekovat i velmi malé množství proteinu, který se i přes přítomnost mutace dokázal sbalit do správné konformace (Xuebin et al. 2011).



**Obr. 2:** Vliv missense mutací na stabilitu proteinu ABCD1

*Upraveno podle: Berger, Theodoulou & Kemp (2011)[online]*

Vzhledem k lokalizaci genu na X chromozomu mají synové matky nesoucí mutaci 50% pravděpodobnost, že tuto mutaci zdědí. Zaznamenány byly ale i případy de novo vzniklých mutací a pacientů, kteří byli genetickými mozaikami. Nicméně tyto případy jsou poměrně vzácné, Wang a kolegové při své studii na 489 rodinách s X-ALD stanovili, že u 4,1 % se vyskytovala de novo mutace a v méně než 1 % byl zaznamenán mozaicismus (Wang et al. 2011).

V lidském genomu existuje též několik paralogů *ABCD1*. Sekvence homologické s exony 7 – 10 byly nalezeny na autozomech v oblastech 2p11, 10p11, 16p11 a 22q11. Ty jsou zřejmě výsledkem transpozice původního genu z chromozomu X před 5 – 10 miliony let, což naznačuje velmi vysoká (92 – 96%) identita sekvence nukleotidů. Tyto paralogy však zřejmě nemají na výsledný fenotyp X-ALD žádný vliv, protože se jedná o pseudogeny neposkytující funkční produkty (Eichler et al. 1997). Významné jsou ale z hlediska molekulárně genetické diagnostiky X-ALD, neboť vzhledem ke značné homologii mohou poskytovat falešné výsledky při použití nedostatečně specifických primerů. Problematické může být i využití moderních sekvenačních technik, které gen sekvenují po velmi krátkých úsecích.

## 2.3. Variabilita fenotypů

### 2.3.1. Základní rozdělení fenotypů

Jak již bylo zmíněno výše, pacienti s X-ALD vykazují několik rozdílných fenotypů, přičemž doposud nebyl nalezen faktor rozhodující o tom, jaká forma nemoci se u konkrétní osoby rozvine. Nejzávažnější a nejprogresivnější cerebrální forma X-ALD je charakteristická demyelinizujícími lézemi s probíhajícím zánětem. Typicky se tato forma rozvíjí již v předškolním a prepubertálním období (dětská CALD), ale s nižší frekvencí ji zaznamenáváme i u starších dětí a dospělých (adolescentní a adultní CALD). Vzhledem k rychle se rozšiřujícímu poškození mozku tato forma vede obvykle v rámci několika měsíců k vegetativnímu stavu a následné smrti pacienta (Moser et al. 2004).

Podstatně mírnější a pomalejší průběh má adrenomyeloneuropatie typicky zasahující páteřní míchu a periferní nervstvo, přičemž minimálně u 20 % pacientů dochází s postupem věku k zasažení mozkové tkáně. Demyelinizace v mozku může být doprovázena zánětem, čímž dochází k rozvoji CALD, nebo může probíhat bez známek zánětlivé reakce jako takzvaná chronická cerebrální X-ALD (van Geel et al. 2001). AMN je ve většině případů doprovázena adrenální nebo testikulární insuficiencí. Ty se mohou zejména v mladším věku

vyskytovat izolovaně, a být tak velmi významnou indikací vedoucí k diagnóze X-ALD (Assies et al. 1997; Miyoshi et al 2009).

Heterozygotky obvykle vykazují fenotyp napodobující AMN u mužů, přičemž závažnost a rozsah myelopatie a neuropatie jsou značně variabilní. (Engelen et al. 2014). Klinicky stanovitelná adrenální insuficience a postižení mozkové tkáně jsou velmi vzácné (El-Deiry et al. 1997; Fatemi et al. 2003). Nicméně byly již popsány případy výskytu CALD u žen a to jak v dospělosti, tak v dětském věku (dos Santos Pereira et al. 2012; Finsterer et al. 2013).

V České republice byl podle publikace z roku 2006 nejčastějším zaznamenaným fenotypem u 21 sledovaných mužů s X-ALD z 15 rodin CALD (10 pacientů), následovaná AMN (6 pacientů) a adrenální insuficiencí (2 pacienti) (Dvořáková et al. 2006). V současné době je na Ústavu dědičných metabolických poruch 1. LF UK a VFN v Praze registrováno 18 českých a slovenských rodin, v nichž byla X-ALD potvrzena alespoň u jednoho muže (L. Dvořáková, osobní komunikace, 29. 4. 2014).

**Tab. 1:** Fenotypy mužů a žen s X-ALD

Fenotyp	Věk nástupu	Frekvence	Myelopatie a neuropatie	Změny v bílé hmotě mozkové na MR
Dětská CALD	2,5 - 10	31 - 35 %	není	rozsáhlé, progresivní kognitivní a behaviorální deficit
Adolescentní CALD	10 - 21	4 - 7 %	vzácné	
Adultní CALD	> 21	2 - 5 %	možné	
AMN	> 18	40 - 46 %	přítomny	Wallerova degenerace v mozkovém kmeni, 20 % po 10 letech léze v parieto-okcipitální nebo frontální oblasti
Izolovaná Addisonova choroba	> 2	snižuje se s věkem	není	není
Asymptomatictí	-	snižuje se s věkem	není	není
Symptomatické ženy s X-ALD	velmi variabilní	stoupá s věkem, více než 50 % po 40. roce	přítomny	velmi vzácné

*Podle Kemp et al. (2001) a Engelen et al. (2012)*

### 2.3.2. Faktory ovlivňující fenotyp

Z výše uvedených poznatků vyplývá, že přestože značná většina mutací v genu *ABCD1* vede k nepřítomnosti, nebo alespoň znatelnému snížení množství proteinu v buňce, variabilita fenotypu je překvapivě velká a také fluidní. Četné studie prokázaly, že u X-ALD nejspíše neexistuje žádná korelace mezi fenotypem a typem mutace v transportérovém genu. I při výskytu stejné mutace u různých členů jedné rodiny tak můžeme zaznamenat naprosto rozdílné fenotypy (Soardi et al. 2010). Z toho vyplývá, že na výsledném fenotypu se musejí podílet i jiné geny nebo environmentální faktory. Navrženo bylo již několik kandidátních genů, mezi něž patří například nejbližší homolog *ABCD1* gen *ABCD2*, ovšem jak bylo zmíněno výše, jeho modifikující vlastnosti byly již zpochybněny (Maier et al. 2008). Podobné výsledky přinesla i studie zkoumající asociace mezi fenotypy a jednonukleotidovými polymorfismy v sekvencích genů *ABCD2*, *ABCD3* a *ABCD4* (Matsukawa et al. 2011). Ve studii sledující expresi všech čtyř ABCD transportérů a dvou genů pro syntetázy MK s velmi dlouhým řetězcem se jako částečně korelující s výskytem CALD fenotypu ukázaly transkripty genů pro ABCD4 transportér a BG1 acyl-CoA syntetázu (Asheuer et al. 2005). Nadějně výsledky přinesly studie zkoumající vliv polymorfismu v genu pro transkobaltamin 2, který by mohl mít vliv na myelinizaci v centrální nervové soustavě, a také studie genu pro antioxidační enzym superoxid dismutázu 2 (Semmler et al. 2009; Brose et al. 2012). Zejména podobnost projevů onemocnění s roztroušenou sklerózou, u které byl prokázán vliv haplotypu lidských leukocytárních antigenů (Olerup et al. 1991), vedla ke zkoumání této korelace i u X-ALD. Nicméně tyto studie přinesly rozporuplné výsledky (Berger et al. 1995; McGuinness et al. 1997). Obecným problémem při hledání genů modifikujících fenotyp u X-ALD pacientů jsou velmi malé skupiny, na kterých jsou pokusy prováděny, tudíž může snadno docházet k přecenění, nebo naopak zanedbání vlivu zkoumaných genů. Dalším faktorem ovlivňujícím tyto výzkumy je fakt, že rozdílné fenotypy byly pozorovány i u monozygotních dvojčat s X-ALD (Korenke et al. 1996; Di Rocco et al. 2001). Toto zjištění podporuje význam vlivu environmentálních faktorů na variabilitu fenotypů. Nicméně v této oblasti zatím máme jen velmi málo poznatků. Jako jediný konkrétní environmentální faktor zodpovědný za rozvoj zánětlivé cerebrální formy onemocnění bylo zatím navrženo trauma hlavy (Raymond et al. 2010).

## 2.4. Diagnostika a léčba

### 2.4.1. Diagnostika

Variabilita fenotypů X-ALD komplikuje i diagnostiku nemoci. Kvůli podobnosti symptomů navíc může často dojít k záměně nemoci například za roztroušenou sklerózu či hereditární spastickou paraparézu u pacientů s AMN nebo za hyperkinetickou poruchu u počínající CALD (Moser et al. 2004). Na základě laboratorních a klinických vyšetření od sebe ale lze onemocnění rozpoznat, podstatným krokem tak zůstává navržení těchto testů u vhodných pacientů.

Vzhledem k podstatě onemocnění je jednou z možných diagnostik vyšetření hladiny MK s velmi dlouhým řetězcem. U hemizygotů lze spolehlivě zjistit zvýšené hodnoty poměru C24:0/C22:0 a C26:0/C22:0 v krevní plazmě u pacientů s X-ALD, a to stabilně po celou délku života i před nástupem prvních symptomů. S pomocí tohoto vyšetření však nelze vyloučit přítomnost jiného peroxizomálního onemocnění a také jej nelze považovat za signifikantní pro heterozygotky, neboť u nich byl zaznamenán významný překryv s hodnotami naměřenými u kontrol (Moser et al. 1999). V neposlední řadě je nutné zmínit také možnost ovlivnění hladiny MK s velmi dlouhým řetězcem v plazmě dietou (Theda et al. 1993). Z těchto důvodů je vhodné biochemické testy kombinovat s mutační analýzou. Zde je potřeba vzít v potaz přítomnost výše zmíněných paralogů *ABCDI* (Eichler et al. 1997). Pozornost je též nutno věnovat odlišení mutací od polymorfismů, popsány byly i změny v sekvencích *ABCDI* vedoucí k záměně aminokyselin, které neovlivňují funkčnost proteinu (Dvořáková et al. 2001). Pro posuzování a predikci progresu onemocnění v centrální nervové soustavě je velmi významné pravidelné vyšetřování pacientů pomocí magnetické resonance (Melhem et al. 2000). Vyvinuta, a doposud i s velmi příznivými výsledky testována, byla i metodika pro novorozenecký screening X-ALD (Theda et al. 2014). Nicméně vzhledem k vzácnosti a variabilitě projevů onemocnění je přínos takového testování sporný.

### 2.4.2 Terapie

Do současné doby bylo vyzkoušeno několik možných terapií X-ALD. Vzhledem k variabilitě závažnosti projevů onemocnění a náročnosti některých léčebných metod je vyvažování rizik nemoci a terapie poměrně složité, ovšem v každém případě nezbytné.

Jednou z prvních a stále velmi diskutovaných terapií je dietetická léčba takzvaným Lorenzovým olejem, což je směs glycerol trioleátu a glycerol trierukátu. Ta zpočátku vyvolávala velké naděje, neboť u pacientů, kterým byl Lorenzův olej podáván, došlo během 4



týdnů ke snížení hladiny C26:0 v krevní plasmě na normální hodnotu (Rizzo et al. 1989). Nicméně v pozdějších studiích tato léčba nedokázala zastavit či pozměnit průběh nemoci, a to zejména v případech, kdy již došlo k zasažení mozkové tkáně. Zároveň došlo u pacientů k výskytu nepříznivých vedlejších účinků (Uziel et al. 1991; Van Geel et al. 1999). V další studii však byl navržen pozitivní efekt léčby na průběh nemoci u asymptomatických či mírně postižených pacientů (Moser et al. 2005). Účinnost Lorenzova oleje tak zůstává nadále rozporuplná.

Zejména včasná diagnostika a pravidelné sledování rozvoje onemocnění se ukázaly jako zásadní při léčbě X-ALD transplantací hematopoetických kmenových buněk. V roce 1990 byl publikován první případ, kdy po transplantaci kostní dřeně došlo k zástavě progresse onemocnění u pacienta v brzké fázi nástupu neurologických příznaků (Aubourg et al. 1990), přičemž podstata tohoto procesu není doposud zcela objasněna. Pravděpodobně by svou úlohu mohly hrát mozkové mikroglie, které u osob s X-ALD ve velké míře podléhají apoptóze (Eichler et al. 2008). Nevýhodou této terapie je poměrně velká rizikovost samotného zákroku, tudíž není vhodné používat ji u pacientů bez příznaků CALD. Její efektivita se rapidně snižuje se zvětšujícím se zasažením mozkové tkáně, neboť zde rychlost zánětlivé demyelinizace zřejmě předstihne nástup terapeutických účinků transplantace (Miller et al. 2011).

Pro pacienty bez vhodného donora kostní dřeně se nabízí možnost genové terapie, která již byla úspěšně provedena u dvou chlapců s CALD. Cartier a kolegové použili autologní CD34<sup>+</sup> buňky s funkčním *ABCD1* genem transdukovaným ex vivo lentivirovým faktorem. Demyelinizace mozkových neuronů se zastavila 14, respektive 16 měsíců po terapii, a to přestože pouze přibližně 15 % buněk pocházejících z hematopoetických kmenových buněk exprimovalo funkční *ABCD1* (Cartier et al. 2009).

Odpovídající hormonální léčba glukokortikoidy je nezbytná u pacientů trpících adrenální insuficiencí, u nichž nejen omezuje běžné příznaky Addisonovy choroby, ale je tak možné i předcházet život ohrožující adrenální krizi (Moser et al. 2004). Pozitivní vliv hormonální terapie na neurologický statut pacienta s X-ALD byl popsán pouze v jednom případě (Zhang et al. 2003). Mužům se sníženou koncentrací testosteronu by měly být podávány androgeny (Moser et al. 2004).

Do budoucna by se mohly možnosti léčby X-ALD rozšířit například o podávání antioxidantů, které měly příznivé účinky při testování na myším X-ALD modelu (López-Erauskin et al. 2011), nebo náhradu funkce *ABCD1* zvýšenou expresí *ABCD2* (Singh et al. 2013).

### 3. Heterozygotní ženy

#### 3.1. Inaktivace X chromozomu

Člověk patří mezi organismy, u nichž je pohlaví určeno skladbou chromozomů. Ženské pohlaví se vytváří při karyotypu s gonozomy XX, mužské s gonozomy XY. U žen se tak X-vázané geny nacházejí v dvojnásobné dávce oproti mužům. Tato nerovnováha je vyvažována procesem, kdy je u žen jeden z X chromozomů v buňce náhodně inaktivován, někdy také nazývaným lyonizace podle Mary F. Lyon, která na základě dřívějších prací a pozorování zbarvení myši srsti formulovala tuto hypotézu (Lyon 1961). Překvapivě, přestože se tedy jedná o děj poměrně dlouho známý, významný a intenzivně studovaný, značná část jeho molekulární podstaty je stále nejasná. Aktuálně se jako jeden z faktorů znesnadňujících výzkum X inaktivace ukázal být odlišný průběh procesu u různých druhů savců, což komplikuje aplikovatelnost a využití studií, které jsou z velké části prováděny na myších (Okamoto et al. 2011).

##### 3.1.1. Podstata X inaktivace

Při lyonizaci je u člověka jeden (nebo v případě aneuploidii i více) z X chromozomů v každé buňce náhodně transkripčně umlčen (inaktivní X chromozom, Xi) a jeden zůstává aktivní (aktivní X chromozom, Xa). Inaktivní X chromozomy jsou tvořeny heterochromatinem, obvykle se vyskytují na okraji jádra a do replikace vstupují až na konci S fáze (Grumbach et al. 1963). Načasování X inaktivace u člověka není přesně známo. Akumulace Xist RNA, ústřední molekuly X inaktivace, byla zjištěna u lidského embrya již ve stádiu moruly a blastocysty (Van den Berg et al. 2009), nicméně je možné, že toto pozorování bylo ovlivněno *in vitro* kultivačními podmínkami, jak popsal Lengner a kolegové (Lengner et al. 2010), což podporují i výsledky jiných prací (Okamoto et al. 2011). Jak bylo zjištěno, inaktivace X chromozomu není úplná a ne všechny geny na Xi jsou umlčeny. U člověka přibližně 15 % genů na Xi inaktivaci alespoň částečně uniká, přičemž se jedná zejména o geny v takzvaném pseudoautozomálním regionu krátkého raménka (Carrel a Willard 2005), tedy oblasti která je homologická a může se párovat s částí chromozomu Y (Cooke et al. 1985). Dalších 10 % genů pak vykazuje expresi z významného počtu Xi. Vzhledem k problematice X-ALD je velmi pozoruhodným faktem zmapování jedné z oblastí unikající inaktivaci do regionu Xq28 (Carrel a Willard 2005). Přímo gen *ABCD1* byl v této studii exprimován z Xi v jedné třetině hybridních buněk a méně než 20 kb vzdálený gen pro Plexin

B3 unikál inaktivace ve všech buňkách (Carrel a Willard 2005). Další studie na toto téma bohužel nejsou dostupné.

Iniciace inaktivace X chromozomu je pravděpodobně z velké většiny řízena *cis* interakcemi z lokusu XIC (X inaktivační centrum) lokalizovaného v oblasti Xq13 (Brown et al. 1991). Nejvíce prozkoumanou částí XIC je gen *XIST* exprimovaný z Xi, který kóduje 17 kb dlouhou nekódující RNA, která zůstává v jádře a velmi úzce asociuje s X chromozomem, jenž je inaktivován (Brown et al. 1992; Clemson et al. 1996). Tento gen je v procesu lyonizace naprosto zásadní a při jeho deleci inaktivace v *cis* neprobíhá (Penny et al. 1996). V embryonálních buňkách je přepisován transkript *TSIX*, který je k sekvenci *XIST* částečně komplementární (Migeon et al. 2001). U myši je *Tsix* na počátku inaktivace transkribován z Xa, prokazatelně funguje jako represor exprese *Xist* ze stejného chromozomu a brání tak jeho inaktivaci, nicméně u lidského *TSIX* nebyla tato funkce pozorována (Lee et al. 1999; Migeon et al. 2002). Při studiu X inaktivace v myších buňkách byla popsána celá řada dalších genů, které leží v oblasti XIC a jsou přepisovány do nekódujících RNA, nezbytných pro správný průběh lyonizace. Gen *Jpx* transkribovaný z Xa funguje jako aktivátor *Xist* na Xi (Tian et al. 2010), funkci *Tsix* pak jako enhancery ovlivňují transkripty genů *Xite*, *Linx* a repetice *DXPas34*, jejíž RNA má na expresi *Tsix* jak pozitivní, tak negativní efekt. (Ogawa a Lee 2003; Nora et al. 2012; Cohen et al. 2007). Tyto a možná i některé další nekódující RNA exprimované z XIC jsou tak nezastupitelnými činiteli při výběru a iniciaci inaktivace X chromozomu v myších buňkách, nakolik jsou však tyto poznatky zobecnitelné a aplikovatelné na průběh lyonizace u člověka je otázkou.

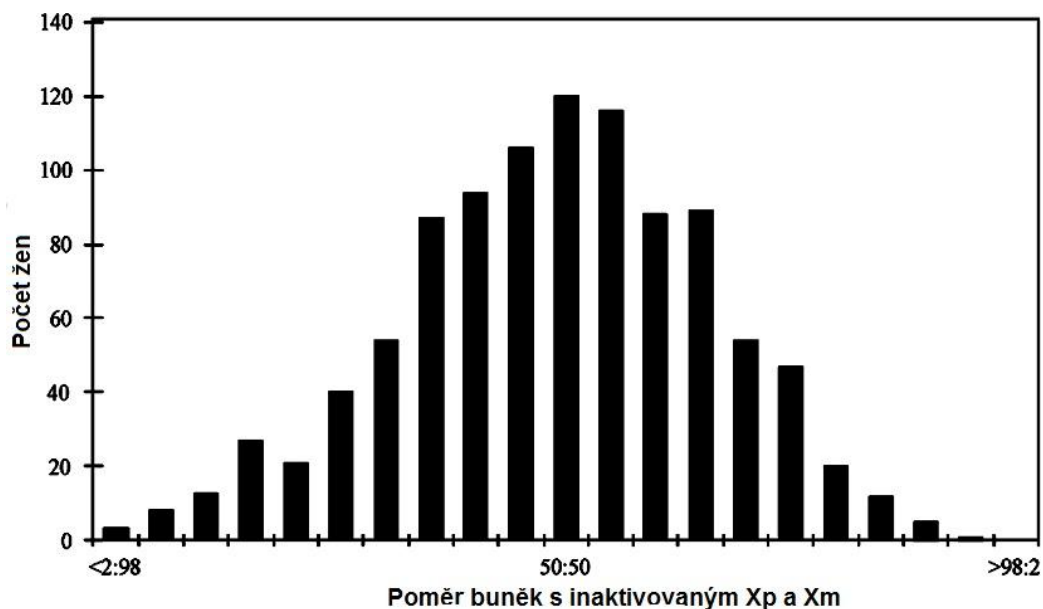
Ještě před zahájením vlastní inaktivace v buňkách dochází k procesu počítání přítomných X chromozomů, aby bylo zaručeno, že právě jeden zůstane aktivní. To je zřejmě zajišťováno stanovováním poměru počtu X chromozomů k počtu autozomů (Monkhorst et al. 2009). Aktivátorem X inaktivace, který je zároveň dependentní na počtu kopií svého genu na X chromozomech, je E3 ubiquitin ligáza RNF12 (Jonkers et al. 2009), ta by tak mohla být jednou z molekul podílejících se na tomto procesu.

Podstatou umlčení transkripce genů z Xi jsou epigenetické změny chromatinu. Přímo na úrovni DNA lze pozorovat rozdíly v methylaci Xa a Xi, a to jak v oblasti CpG ostrovů, tak mimo ně (Kelkar a Deobagkar 2012). Svou roli hrají i modifikace histonů a histonové varianty. *Xist* RNA zřejmě indukuje methylaci lysinu 9 a 27 na histonu H3 a ubiquitinilaci lysinu 119 na histonu H2A na Xi (Fang et al. 2004; Mermoud et al. 2002; Zhao et al. 2008). Naopak acetylace histonů typická pro transkripčně aktivní chromatin je u histonů H3 a H4 na Xi potlačena (Belyaev et al. 1996; Jeppesen a Turner 1993). Inaktivní X chromozom je taktéž

obohacen o histony typu macroH2A1 a macroH2A2, jejich význam pro X inaktivaci však zatím nebyl objasněn (Costanzi a Pehrson 1998; Chadwick a Willard 2001).

### 3.1.2. Zešíkmení X inaktivace

Vzhledem k náhodnosti výběru inaktivovaného chromozomu by měla většina žen vykazovat poměr buněk s inaktivovaným paternálním ( $X_p$ ) a maternálním ( $X_m$ ) X chromozomem přibližně 50:50. Ve studii provedené Amos-Landgrafem a kolegy na více než 1000 ženách s běžným fenotypem odpovídala distribuce poměrů náhodnému rozložení (viz obrázek 3) s průměrem 49:51 a mediánem 50:50. Méně než 10 % žen vykazovalo zešíkmení ve prospěch jednoho z chromozomů s poměrem vyšším než 80:20 (Amos-Landgraf et al. 2006).



**Obr. 3:** Distribuce poměru inaktivace  $X_p$  a  $X_m$  u 1005 žen

*Upraveno podle: Amos-Landgraf et al. (2006)*

Výrazné zešíkmení X inaktivace u zdravé ženy může být důsledkem náhody, nebo k němu může docházet pod vlivem genetických faktorů. Plenge a kolegové popsali mutaci v promotoru *XIST* genu, která vedla k přednostní inaktivaci mutovaného chromozomu a zešíkmení inaktivace u žen ve dvou nepříbuzných rodinách (Plenge et al. 1997). Nicméně dědičné zešíkmení bylo pozorováno i nezávisle na typu alely *XIST* genu, což nasvědčuje přítomnosti dalších genů ovlivňujících pravděpodobnost inaktivace daného X chromozomu (Ørstavít et al. 1999). K posunu může také docházet nejen při iniciaci inaktivace, ale i sekundárně, pokud buňky nesou X-vázanou mutaci ovlivňující jejich proliferaci či schopnost přežití (Pegoraro et al. 1997).

Různá schopnost proliferace u buněk s inaktivovaným Xp či Xm by taktéž mohla být zodpovědná za zvýšený výskyt zešíkmení v krevních buňkách u starších žen (Abkowitz et al. 1998). Četnost výrazného zešíkmení ve prospěch jednoho z chromozomů je několikanásobně vyšší u dospělých žen oproti novorozencům (Amos-Landgraf et al. 2006). Nicméně v longitudinální studii zjišťující poměr inaktivovaných Xp a Xm u vzorku žen s odstupem v rozmezí 13 až 21 let nebyly zaznamenány významné rozdíly v rámci celé skupiny, pouze u žen starších 60 let v době prvního testování (Sandovici et al. 2004).

Stáří ženy má taktéž vliv na konkordanci poměru inaktivace Xp/Xm v různých tkáních. Ve studii publikované Bittlem a kolegy většina hodnot odebraných z různých tkání pocházejících ze všech 3 zárodečných vrstev korelovala, významná variabilita se však vyskytla právě u žen nad 60 let (Bittel et al. 2008). Podobné výsledky popisují i Sharp a kolegové, současně ovšem upozorňují na individuální případy s velmi variabilními hodnotami (Sharp et al. 2000). Tento fenomén je velmi významný, neboť bez ohledu na důvod testování inaktivace X chromozomu jsou v naprosté většině případů výsledky stanovovány ze snadno dostupných krevních buněk.

### 3.2. Metody stanovení inaktivace chromozomu X

Pro stanovení zešíkmení X inaktivace jsou v současnosti využívány dva základní metodické přístupy. Jedním je analýza methylace, neboť se předpokládá, že geny na inaktivovaném X chromozomu jsou umlčeny též díky methylaci na jejich 5' koncích (Pfeifer et al. 1990). Druhou možností je stanovení alelově specifické exprese, tedy poměru transkriptů konkrétního genu z X chromozomu přítomných v buňkách.

Při výběru genu pro methylační studie je potřeba, aby methylace v lokusu spolehlivě korelovala s inaktivací daného chromozomu a zároveň, aby bylo možné od sebe rozlišit alely z Xm a Xp. Za velmi robustní a v současnosti i zřejmě nejpoužívanější je považováno stanovení methylace v prvním exonu lidského androgenního receptoru (HUMARA) lokalizovaného v oblasti Xq11-12 (Brown et al. 1989). Chromozom pocházející od matky a od otce lze odlišit díky krátké tandemové repetici (CAG)<sub>n</sub> ležící méně než 100 párů bází od restrikčních míst methylačně specifických restriktáz *HpaII* a *HhaI*. Tato repetice je v populaci vysoce polymorfní s 20 alelami a 90% heterozygotitou, poměr inaktivace Xm a Xp pak lze stanovit pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), při které je amplifikována pouze nenaštěpená, a tudíž methylovaná, alela, zastoupení Xp a Xm je pak možno vyhodnotit elektroforézou (Allen et al. 1992). Na obdobném principu je založeny i níže zmíněné metody

analýzy methylace v lokusu DXS6673E (Beever et al. 2003) a lokusu DXS225 (Boyd & Fraser 1990).

Spolehlivost analýzy methylace androgenního receptoru byla zpochybněna, když ve skupině 29 žen v některých případech výsledky získané touto metodou neodpovídaly hodnotám zjištěným pomocí pyrosekvenování a analýzy transkripční klonality, přičemž tyto dvě metody spolu dobře korelovaly. Příčinou této diskordance může být fakt, že methylace v oblasti promotoru zabraňující transkripci genu se nemusí rozšířit až do oblasti prvního exonu. Taková alela je pak při využití metody HUMARA naštěpena restriktázami, neposkytuje PCR produkt a je falešně vyhodnocena jako aktivní, tudíž je u ženy zjištěno zešíkmení vyšší, než je jeho reálná hodnota (Swierczek et al. 2012). V podobné studii Mossnera a kolegů však data získaná pomocí metody HUMARA a pyrosekvenování korelovala (Mossner et al. 2013). Dalším faktorem, který může ovlivňovat výsledky nepřímých analýz využívajících restriktčních enzymů, je možnost nedokonalého štěpení vzorků (Van Dijk et al. 2002). Při studiu korelace onemocnění a zešíkmení X inaktivace je značnou nevýhodou studií založených na analýze methylace konkrétního lokusu složitost asociace výsledků s konkrétní mutovanou či nemutovanou alelou jiného genu, než na kterém byla methylace zjišťována.

Pro výzkum vztahu genetických chorob a inaktivace je tak velkou výhodou studií založených na kvantifikaci RNA v buňkách možnost využít přímo transkripty genu, ve kterém se nachází mutace způsobující onemocnění, čímž je také zaručeno, že i v případě, kdy by daný gen unikl inaktivaci, nebude jeho exprese zanedbána. RNA izolovaná z buněk je přepsána do komplementární DNA, následně amplifikována a kvantifikována často sekvenačními technikami jako je pyrosekvenování (Engelen et al. 2014; Salsano et al. 2012), které využívá sekvenace pomocí syntézy ([www.qiagen.com/products/catalog/automated-solutions/pyrosequencing/pyromark-q96-id#productdetails](http://www.qiagen.com/products/catalog/automated-solutions/pyrosequencing/pyromark-q96-id#productdetails)), využít lze ale i například alelově specifickou PCR (Swierczek et al. 2012).

### 3.3. Zešíkmení X inaktivace u heterozygotek

#### 3.3.1 Zešíkmení X inaktivace a onemocnění

X-vázaná onemocnění byla dříve stejně jako choroby autozomální rozdělována na recesivní a dominantní. Ženy nesoucí mutaci označovanou jako recesivní na jednom z chromozomů tak byly považovány za pouhé přenašečky bez projevů onemocnění. Nicméně penetrance X-vázaných onemocnění u žen představuje kontinuální škálu a označení recesivní

a dominantní se tedy ukazuje být nepřesným a nehodícím se. Zároveň i v rámci jednoho onemocnění je penetrance u žen obvykle značně variabilní (Dobyns et al. 2004). Příčinou, proč se X-vázané onemocnění projeví u jedné heterozygotní ženy a u jiné ne, může být zešíkmení X inaktivace ve prospěch mutované či nemutované alely. U některých onemocnění, jako jsou například některé X-vázané mentální retardace, dochází k proliferativnímu zvýhodnění buněk exprimujících nemutovanou alelu, a tudíž zešíkmení X inaktivace u heterozygotek (Plenge et al. 2002). U řady chorob je však vztah zešíkmení X inaktivace a projevů nemoci doposud nejasný, příkladem může být Fabryho choroba (Dobrovolný et al. 2005; Maier et al. 2006) nebo třeba právě X-ALD. Zřejmá asociace zešíkmení X inaktivace a projevů nemoci byla popsána například u mukopolysacharidózy typu II (Tuschl et al. 2005), což podněcuje další výzkumy v oblasti příčin variability fenotypů X-vázaných onemocnění u heterozygotních žen.

### 3.3.2. Zešíkmení X inaktivace u žen s X-ALD

V minulosti bylo publikováno několik studií zkoumajících X inaktivaci u žen nesoucích mutaci v genu *ABCDI* na jednom z chromozomů. Heterozygotky mohou být identifikovány jednak na základě příbuznosti s mužským pacientem trpícím X-ALD, nebo se může jednat o symptomatické ženy diagnostikované s X-ALD kvůli jejich vlastním potížím. Vzácnost onemocnění v kombinaci s možností záměny X-ALD za jinou chorobu, u žen často například roztroušená skleróza (Dooley & Wright 1985), má za následek poměrně malé skupiny, na kterých jsou některé ze studií prováděny, což zvětšuje vliv náhody na výsledky a ztěžuje jejich reprodukovatelnost.

Při zkoumání X-ALD v souvislosti s X inaktivací se naskytou zejména dvě otázky. A to zdali mutace v genu *ABCDI* může způsobovat zešíkmení X inaktivace ve prospěch jednoho z chromozomů a jestli se zešíkmení projeví na fenotypu ženy. Korelace zešíkmení a závažnosti onemocnění by byla velmi cennou informací pro klinickou praxi, neboť by tak bylo možné předvídat vývoj nemoci. Existující studie na toto téma však poskytují velmi rozporupné výsledky.

V prvním výzkumu, který byl na toto téma proveden, byla pozorována proliferativní výhoda *in vitro* pěstovaných kožních fibroblastů vykazujících X-ALD fenotyp, a to u 3 nepříbuzných rodin, což by mohlo svědčit o vlivu *ABCDI* na zešíkmení X inaktivace. Důvod, proč by měly buňky akumulující MK s velmi dlouhým řetězcem účinněji proliferovat, však nebyl objasněn. Současně se též shodný efekt nepotvrdil *in vivo* na krevních buňkách stejných žen. U některých heterozygotek nebyly pozorovány asymetrie v rozložení normálních buněk a

buněk s mutantním fenotypem, přestože jejich X-ALD fibroblasty vykazovaly proliferativní výhodu. U jedné ženy byly dokonce zvýhodněny leukocyty a erytrocyty s nemutovanou alelou. Jako vysvětlení byla navržena přítomnost dalšího X-vázaného genu ovlivňujícího proliferační schopnost v krevních buňkách. Nicméně výsledky této práce vedly její autory k návrhu možnosti vlivu zešíkmení X inaktivace na manifestaci onemocnění (Migeon et al. 1981).

Následné práce však přinesly k tomuto tématu velmi rozporuplné výsledky. V pracích autorů Maier a kol. a Salsano a kol., obou provedených na krevních buňkách, byl pozorován signifikantně častější výskyt zešíkmení X inaktivace u X-ALD heterozygotek oproti věkově odpovídajícím zdravým kontrolám (Maier et al. 2002; Salsano et al. 2012). V obou případech byl poměr inaktivovaného  $X_m$  a  $X_p$  stanoven pomocí analýzy methylace lidského androgenního receptoru, v novější z prací byla navíc taktéž provedena analýza alelově specifické exprese. Salsano a kolegové uvádějí, že obě metody přinesly srovnatelné výsledky, přesto u několika žen se hodnoty zjištěné pomocí kvantitativní analýzy transkriptů od hodnot získaných metodou HUMARA lišily. Tyto rozdíly na celkové výsledky práce pravděpodobně nemají vliv, nicméně dozajista stojí za povšimnutí v kontextu nejisté spolehlivosti metody HUMARA. Maier a kolegové popsali zešíkmení X inaktivace u všech žen označených jako symptomatické na základě neurologického vyšetření a signifikantní korelaci mezi zešíkmením a závažností projevů onemocnění. V této studii však nebylo zjišťováno, ve prospěch které alely je inaktivace zešíkmena. Analýza transkriptů byla provedena ve fibroblastech tří heterozygotních žen s výrazným zešíkmením. Pouze jedna z nich exprimovala přednostně mutantní alelu, ostatní dvě transkribovaly funkční verzi genu (Maier et al. 2002). Zešíkmení u X-ALD heterozygotek tedy může probíhat ve prospěch obou z alel, což značně komplikuje interpretaci výsledků práce. Naproti tomu Salsano a kolegové asociaci mezi zešíkmením X inaktivace a fenotypem u žen nepozorovali. Kupříkladu 63letá žena nevykazovala symptomy X-ALD, přestože z 93 % exprimovala mutantní alelu *ABCD1*, naproti tomu 73letá pacientka byla symptomatická, ačkoli přednostně (z 63 %) exprimovala alelu nemutovanou (Salsano et al. 2012).

Výrazné zešíkmení X inaktivace bylo též pozorováno u žen z jedné čínské rodiny s X-ALD. Zde se však zešíkmení vyskytovalo i u členky rodiny, která mutaci v genu *ABCD1* nenesla, a dědičné zešíkmení tak zřejmě nemělo s X-ALD spojitost. V promotoru XIST genu nebyly nalezeny žádné abnormality, příčina dědičného zešíkmení v rodině tedy není známa. Častější výskyt zešíkmení u žen s X-ALD mutací nebyl prokázán ani v kontrolní studii s 20 asymptomatickými heterozygotkami a celkem 51 příbuznými i nepříbuznými kontrolami.



V rámci výše zmíněné rodiny zešikmení ve prospěch mutované, potažmo nemutované, alely *ABCD1* asociovalo se symptomatickým statutem ženy. Vzhledem k extrémně malé velikosti skupiny (pouze 5 heterozygotek, z toho 2 symptomatické) nelze říci, zdali se jedná o nenáhodný jev (Wang et al. 2013).

Výsledky nejvíce recentních publikací však svědčí spíše o náhodném rozložení X inaktivace a nezávislosti fenotypu na zešikmení u X-ALD heterozygotek. V doposud nejrozsáhlejší studii provedené Engelenem a kolegy byl medián poměru exprese mutantní a nemutantní alely ve skupině 38 heterozygotních žen 49:51, což odpovídá rozložení u zdravých žen. I zde se však vyskytly ženy s výrazným zešikmením exprimující téměř výhradně jen jednu z alel. Taktéž v této práci nebyla pozorována korelace mezi symptomatickým statutem ženy a mírou zešikmení, a to ani po rozdělení žen do věkových skupin (vliv věku na penetranci X-ALD u žen viz níže). X inaktivace v této práci byla stanovena na základě alelově specifické exprese *ABCD1* ve fibroblastech (Engelen et al. 2014), přičemž v ostatních studiích byl poměr inaktivace  $X_m$  a  $X_p$  obvykle zjišťován v krevních buňkách. Nicméně podobné výsledky přinesla i práce autorů Habekost a kol., která byla provedena na leukocytech metodou HUMARA. Ani v této studii zešikmení X inaktivace nekorelovalo se symptomatickým statutem žen a závažností projevů (Habekost et al. 2014). Tyto dvě práce se tak přiklánějí k výsledkům původní publikace autorů Watkiss a kol., v níž bylo pozorováno náhodné rozložení X inaktivace ve skupině dvanácti heterozygotních žen. Signifikantní asociace zešikmení a fenotypu taktéž nebyla popsána, nicméně v této studii byly pouze tři ženy označeny jako symptomatické na základě projevů spastické paraplegie, přičemž detailnější neurologické vyšetření by bývalo mohlo odhalit příznaky onemocnění i u žen popsaných jako asymptomatické. X inaktivace byla stanovena na základě methylace lokusu DXS255 (Watkiss et al. 1993).

Často nalézanou asociací ve výše zmíněných publikacích byla korelace zešikmení X inaktivace a koncentrace MK s velmi dlouhým řetězcem v krevní plazmě heterozygotek (Salsano et al. 2012; Engelen et al. 2014; Habekost et al. 2014). Podobně jako u mužů (Moser et al. 1999) však množství MK s velmi dlouhým řetězcem v plazmě nemělo vliv na fenotyp žen. Signifikantní korelace mezi X inaktivací a koncentrací MK v plazmě nebyla nalezena ve studii autorů Watkiss a kol., v této práci však nebylo rozlišováno mezi zešikmením ve prospěch mutované a nemutované alely (Watkiss et al. 2002).

Velmi významným faktorem ovlivňujícím fenotyp heterozygotek by mohl být věk. Engelen a kolegové popsali, že frekvence výskytu neurologických symptomů se zvedla z 18 % u žen mladších 40 let na 88 % u žen starších 60 let (Engelen et al. 2014). Také

v dalších studiích byly pozorovány významné rozdíly v průměrném věku symptomatických a asymptomatických žen (Maier et al. 2002; Salsano et al. 2012; Habekost et al. 2014). Tento trend je nutné vzít v úvahu při hodnocení asociace zešikmení X inaktivace s fenotypem, neboť u starších žen se taktéž častěji nachází zešikmení X inaktivace v krevních buňkách (Abkowitz et al. 1998).

Jak již bylo zmíněno výše fenotyp připomínající CALD je u žen velmi vzácný. V jihoamerické studii, zaměřující se zejména na projevy X-ALD u mužů, byla popsána 15letá dívka se zasažením mozkové tkáně a zcela zešikmenou X inaktivací (dos Santos Pereira et al. 2012). Podobně 8letá dívka s terminální delecí zahrnující oblast Xq28 na Xp a mutací v genu *ABCD1* na Xm vykazovala abnormality při vyšetření magnetickou rezonancí (Hershkovitz et al. 2002). Žádné další podobné případy propojení zešikmení X inaktivace a symptomatického fenotypu v takto nízkém věku však nebyly publikovány. Možnou asociaci mezi zešikmením X inaktivace a manifestace v nízkém věku, jak popisuje Jangouk a kolegové (Jangouk et al. 2012), tedy nelze potvrdit.

**Tab. 2:** Výsledky a metodiky prací věnujících se zešikmení X inaktivace u heterozygotek s X-ALD

	X inaktivace u X-ALD heterozygotek	korelace zešikmení s fenotypem	korelace zešikmení s koncentrací MK v plasmě	korelace fenotypu s věkem	testované buňky	metoda stanovení X inaktivace
Watkiss et al. (1993)	náhodná	ne	-	-	krevní buňky	methylace DXS225
Maier et al. (2002)	zešikmená	ano	ne	ano	krevní buňky	HUMARA
Salsano et al. (2012)	zešikmená	ne	ano	ano	krevní buňky	methylace DXS6673E, HUMARA, ASE
Wang et al. (2013)	náhodná	ano	-	-	krevní buňky	HUMARA, ASE
Engelen et al. (2014)	náhodná	ne	ano	ano	fibroblasty	ASE
Habekost et al. (2014)	-	ne	ano	ano	krevní buňky	HUMARA

ASE – alelově specifická exprese, HUMARA – analýza methylace v lidském androgenním receptoru

## 4. Závěr

Příčinou rozvoje X-ALD jsou mutace v genu *ABCD1* (Mosser et al. 1993). V současné době je známo téměř 700 mutací asociovaných s onemocněním, přesto však fenotypovou variabilitu u pacientů nelze na jejich základě vysvětlit, což svědčí o pravděpodobném vlivu dalších genů či environmentálních faktorů (Soardi et al. 2010). Velkou otázkou je zejména příčina rozvoje fatální cerebrální formy. Studie kandidátních genů, které by mohly ovlivňovat výsledný fenotyp, prozatím nepřinesly zcela uspokojivé výsledky. Interpretaci dosavadních prací značně komplikují malé skupiny pacientů, ze kterých většina publikací vychází. Výskyt rozdílných fenotypů u monozygotních dvojčat navíc svědčí o významném vlivu prostředí (Korenke et al. 1996; Di Rocco et al. 2001). Fenotyp pacientů s X-ALD je tak pravděpodobně velmi komplexní záležitostí, jejíž studium je potřeba nadále prohloubit. Možným benefičním přístupem v této oblasti by do budoucna mohlo být celogenomové sekvenování.

Podobně jako u mužů i u žen nesoucích mutaci v *ABCD1* genu pozorujeme variabilitu v penetranci a expresivitě onemocnění. V souvislosti s touto problematikou byl zkoumán vliv zešíkmení X inaktivace na projevy choroby. Tato asociace byla popsána například u žen s mukopolysacharidózou typu II (Tuschl et al. 2005). V případě X-ALD se však jednotlivé práce ve svých výsledcích rozcházejí. Nicméně nejvíce recentní a nejrozsáhlejší práce se i přes použití rozdílných metodik přiklání k nezávislosti projevů X-ALD na zešíkmení X inaktivace (Engelen et al. 2014; Habekost et al. 2014). Podobně v další studii byly zjištěny obdobné výsledky jak nepřímou metodou HUMARA, tak přímou analýzou transkriptu (Salsano et al. 2012).

Všechny dosavadní práce byly provedeny na snadno dostupných krevních buňkách, či fibroblastech. X inaktivace v těchto buňkách však nutně nemusí odpovídat inaktivaci v jiných tkáních, v případě X-ALD například nervové tkáni, která je u žen nejčastěji zasažena. Bittel a kolegové sice stanovili, že u většiny žen je poměr inaktivace  $X_p$  a  $X_m$  podobný v různých typech tkáně (Bittel et al. 2008), ale kupříkladu u žen s deficitem ornitin transkarbamylázy, který je též X-vázaným onemocněním, poměr aktivního  $X_p$  a  $X_m$  v leukocytech odpovídal náhodné inaktivaci, zatímco v játrech byl výrazně zešíkmen a koreloval s aktivitou enzymu (Yorifuji et al. 1998). Nutno ovšem podotknout, že v této práci se míra zešíkmení lišila i ve vzorcích odebraných z různých částí jater.

Další výzkumy na větších skupinách pacientů by byly velmi přínosné pro vysvětlení variability fenotypů jak u mužů, tak u žen. V problematice vztahu X inaktivace a onemocnění by byla velmi zajímavá studie porovnávající inaktivaci  $X_m$  a  $X_p$  v nervové tkáni s inaktivací

ve snadněji dostupných krevních buňkách, či fibroblastech a korelace těchto hodnot s fenotypem heterozygotek.

Pozornost by též měla být věnována metodickým přístupům ke stanovení X inaktivace. Ve většině prací použitá analýza methylace androgenního receptoru nemusí vždy spolehlivě odrážet inaktivaci (Swierczek et al. 2012). Analýza transkriptu nutně nereflektuje přímo poměr inaktivace  $X_m$  a  $X_p$ , ale pro asociaci s onemocněním se zdá být vhodnější. Přesnější výsledky než nepřímá analýza by též přinesla i v případě, kdy by gen *ABCD1* částečně unikl inaktivaci.

Při vyhodnocování výsledků prací zabývajících se asociací zešíkmení X inaktivace a fenotypu heterozygotek je nutné přihlédnout k věku žen, neboť pravděpodobnost výskytu symptomů X-ALD výrazně stoupá se zvyšujícím se věkem (Engelen et al. 2014).

Na základě dosavadních výsledků tak X inaktivace zřejmě není dostačujícím faktorem pro vysvětlení variability projevů X-ALD u žen a stejně jako u mužů je pro vysvětlení této variability potřeba hlubšího porozumění molekulární podstatě nemoci. V současné době tedy nelze stanovení zešíkmení X inaktivace u heterozygotek v klinické praxi použít pro predikci rozvoje onemocnění.

## 5. Seznam použitých zkratek

AMN	adrenomyeloneuropatie
ASE	alelově specifická exprese
ATP	adenosintrifosfát
CALD	cerebrální adrenoleukodystrofie
CoA	koenzym A
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DHCA	kyselina dihydroxycholestanová
HUMARA	analýza methylace v lidském androgenním receptoru
LCFA	mastné kyseliny s dlouhým řetězcem
MK	mastné kyseliny
PCR	polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
THCA	kyselina trihydroxycholestanová
X-ALD	X-vázaná adrenoleukodystrofie
Xa	aktivní X chromozom
Xi	inaktivní X chromozom
XIC	X inaktivační centrum
Xm	X chromozom pocházející od matky
Xp	X chromozom pocházející od otce

## 6. Seznam použité literatury

ABKOWITZ, J. L., et al. An X chromosome gene regulates hematopoietic stem cell kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95.7: 3862-3866.

ALLEN, R. C., et al. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *American journal of human genetics*, 1992, 51.6: 1229.

AMOS-LANDGRAF, J. M., et al. X Chromosome–Inactivation Patterns of 1,005 Phenotypically Unaffected Females. *The American Journal of Human Genetics*, 2006, 79.3: 493-499.

ASHEUER, M., et al. Decreased expression of ABCD4 and BG1 genes early in the pathogenesis of X-linked adrenoleukodystrophy. *Human molecular genetics*, 2005, 14.10: 1293-1303.

ASSIES, J., et al. Signs of testicular insufficiency in adrenomyeloneuropathy and neurologically asymptomatic X-linked adrenoleukodystrophy: a retrospective study. *International journal of andrology*, 1997, 20.5: 315-321.

AUBOURG, P., et al. Reversal of early neurologic and neuroradiologic manifestations of X-linked adrenoleukodystrophy by bone marrow transplantation. *New England Journal of Medicine*, 1990, 322.26: 1860-1866.

BEEVER, C., et al. Methylation of ZNF261 as an assay for determining X chromosome inactivation patterns. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 2003, 120.3: 439-441.

BELYAEV, N. D.; KEOHANE, A. M.; TURNER, B. M. Differential underacetylation of histones H2A, H3 and H4 on the inactive X chromosome in human female cells. *Human genetics*, 1996, 97.5: 573-578.

BERGER, J., et al. Association of X-linked adrenoleukodystrophy with HLA DRB1 alleles. *Biochemical and biophysical research communications*, 1995, 216.2: 447-451.

BEZMAN, L., et al. Adrenoleukodystrophy: incidence, new mutation rate, and results of extended family screening. *Annals of neurology*, 2001, 49.4: 512-517.

BITTEL, D. C., et al. Comparison of X-chromosome inactivation patterns in multiple tissues from human females. *Journal of medical genetics*, 2008, 45.5: 309-313.

BOYD, Y.; FRASER, N. J. Methylation patterns at the hypervariable X-chromosome locus DXS255 (M27 $\beta$ ): correlation with X-inactivation status. *Genomics*, 1990, 7.2: 182-187.

BROSE, Rebecca Deering; AVRAMOPOULOS, Dimitri; SMITH, Kirby D. SOD2 as a potential modifier of X-linked adrenoleukodystrophy clinical phenotypes. *Journal of neurology*, 2012, 259.7: 1440-1447.

BROWN, C. J., et al. Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *American journal of human genetics*, 1989, 44.2: 264.

BROWN, C. J., et al. Localization of the X inactivation centre on the human X chromosome in Xq 13. *Nature*, 1991, 349.6304: 82-84.

BROWN, C. J., et al. The human *XIST* gene: Analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell*, 1992, 71.3: 527-542.

CARREL, L.; WILLARD, H. F. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*, 2005, 434.7031: 400-404.

CARTIER, N., et al. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *science*, 2009, 326.5954: 818-823.

CLEMSON, C. M., et al. *XIST* RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *The Journal of cell biology*, 1996, 132.3: 259-275.

COHEN, D. E., et al. The *DXPas34* Repeat Regulates Random and Imprinted X Inactivation. *Developmental cell*, 2007, 12.1: 57-71.

CONTRERAS, M., et al. The protein coded by the X-adrenoleukodystrophy gene is a peroxisomal integral membrane protein. *FEBS letters*, 1994, 344.2: 211-215.

COOKE, H. J.; BROWN, W. RA; RAPPOLD, G. A. Hypervariable telomeric sequences from the human sex chromosomes are pseudoautosomal. 1985.

COSTANZI, C.; PEHRSON, J. R. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature*, 1998, 393.6685: 599-601.

DI ROCCO, M.; DORIA-LAMBA, L.; CARUSO, U.. Monozygotic twins with X-linked adrenoleukodystrophy and different phenotypes. *Annals of neurology*, 2001, 50.3: 424-424.

DOBROVOLNY, R., et al. Relationship between X-inactivation and clinical involvement in Fabry heterozygotes. Eleven novel mutations in the  $\alpha$ -galactosidase A gene in the Czech and Slovak population. *Journal of molecular medicine*, 2005, 83.8: 647-654.

DOBYNS, W. B., et al. Inheritance of most X-linked traits is not dominant or recessive, just X-linked. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 2004, 129.2: 136-143.

DOOLEY, J. M.; WRIGHT, B. A. Adrenoleukodystrophy mimicking multiple sclerosis. *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques*, 1985, 12.1: 73-74.

DOS SANTOS PEREIRA, F., et al. Mutations, clinical findings and survival estimates in South American patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *PloS one*, 2012, 7.3: e34195.

DVORAKOVA, L., et al. Eight novel ABCD1 gene mutations and three polymorphisms in patients with X-linked adrenoleukodystrophy: The first polymorphism causing an amino acid exchange. *Human mutation*, 2001, 18.1: 52-60.

DVOŘÁKOVÁ, L., et al. X-vázaná adrenoleukodystrofie u jednadvaceti českých pacientů. *Česko-slovenská pediatrie*, 2006, 61 (3): 129-136.

EICHLER, E. E., et al. Interchromosomal duplications of the adrenoleukodystrophy locus: a phenomenon of pericentromeric plasticity. *Human molecular genetics*, 1997, 6.7: 991-1002.

EICHLER, F. S., et al. Is microglial apoptosis an early pathogenic change in cerebral X-linked adrenoleukodystrophy?. *Annals of neurology*, 2008, 63.6: 729-742.

EL-DEIRY, S. S., et al. Assessment of Adrenal Function in Women Heterozygous for Adrenoleukodystrophy 1. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1997, 82.3: 856-860.

ENGELEN, M., et al. X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): clinical presentation and guidelines for diagnosis, follow-up and management. *Orphanet journal of rare diseases*, 2012, 7.1: 51.

ENGELEN, M., et al. X-linked adrenoleukodystrophy in women: a cross-sectional cohort study. *Brain*, 2014, 361.

FANG, J., et al. Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279.51: 52812-52815.

FATEMI, A., et al. MRI and proton MRSI in women heterozygous for X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurology*, 2003, 60.8: 1301-1307.

FINSTERER, J.; LÄSSER, S.; STÖPHASIUS, E.. Dementia from the ABCD1 mutation c. 1415-1416delAG in a female carrier. *Gene*, 2013, 530.1: 155-157.

FOURCADE, S., et al. Early oxidative damage underlying neurodegeneration in X-adrenoleukodystrophy. *Human molecular genetics*, 2008, 17.12: 1762-1773.



GRUMBACH, M. M.; MORISHIMA, A.; TAYLOR, J. H. Human sex chromosome abnormalities in relation to DNA replication and heterochromatinization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1963, 49.5: 581.

HABEKOST, C. T., et al. Neurological impairment among heterozygote women for X-linked Adrenoleukodystrophy: a case control study on a clinical, neurophysiological and biochemical characteristics. *Orphanet journal of rare diseases*, 2014, 9.1: 6.

HASHMI, M.; STANLEY, W.; SINGH, I. Lignoceroyl-CoASH ligase: enzyme defect in fatty acid  $\beta$ -oxidation system in X-linked childhood adrenoleukodystrophy. *FEBS letters*, 1986, 196.2: 247-250.

HEIN, S., et al. Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy-associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture. *Human molecular genetics*, 2008, 17.12: 1750-1761.

HERSHKOVITZ, E., et al. Cerebral X-linked adrenoleukodystrophy in a girl with Xq27-Ter deletion. *Annals of neurology*, 2002, 52.2: 234-237.

HO, J. K., et al. Interactions of a very long chain fatty acid with model membranes and serum albumin. Implications for the pathogenesis of adrenoleukodystrophy. *Journal of Clinical Investigation*, 1995, 96.3: 1455.

CHADWICK, B. P.; WILLARD, H. F. Histone H2A variants and the inactive X chromosome: identification of a second macroH2A variant. *Human molecular genetics*, 2001, 10.10: 1101-1113.

IGARASHI, M., et al. Fatty acid abnormality in adrenoleukodystrophy. *Journal of neurochemistry*, 1976, 26.4: 851-860.

JANGOUK, P., et al. Adrenoleukodystrophy in female heterozygotes: underrecognized and undertreated. *Molecular genetics and metabolism*, 2012, 105.2: 180-185.

JEPPESEN, P.; TURNER, B. M. The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell*, 1993, 74.2: 281-289.

JONKERS, I., et al. RNF12 is an X-Encoded dose-dependent activator of X chromosome inactivation. *Cell*, 2009, 139.5: 999-1011.

KAMIJO, K., et al. The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265.8: 4534-4540.

KASHIWAYAMA, Y., et al. 70-kDa peroxisomal membrane protein related protein (P70R/ABCD4) localizes to endoplasmic reticulum not peroxisomes, and NH<sub>2</sub> terminal

hydrophobic property determines the subcellular localization of ABC subfamily D proteins. *Experimental cell research*, 2009, 315.2: 190-205.

KELKAR, A.; DEOBAGKAR, D. Methylation profile of genes on the human X chromosome. *Epigenetics*, 2010, 5.7: 612-618.

KEMP, S., et al. ABCD1 mutations and the X-linked adrenoleukodystrophy mutation database: Role in diagnosis and clinical correlations. *Human mutation*, 2001, 18.6: 499-515.

KEMP, S., et al. Elongation of very long-chain fatty acids is enhanced in X-linked adrenoleukodystrophy. *Molecular genetics and metabolism*, 2005, 84.2: 144-151.

KISHIMOTO, Y., et al. Adrenoleukodystrophy: evidence that abnormal very long chain fatty acids of brain cholesterol esters are of exogenous origin. *Biochemical and biophysical research communications*, 1980, 96.1: 69-76.

KNAZEK, R. A., et al. Membrane microviscosity is increased in the erythrocytes of patients with adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. *Journal of Clinical Investigation*, 1983, 72.1: 245.

KORENKE, G. C., et al. Cerebral adrenoleukodystrophy (ALD) in only one of monozygotic twins with an identical ALD genotype. *Annals of neurology*, 1996, 40.2: 254-257.

LAZAROW, P. B. Rat liver peroxisomes catalyze the beta oxidation of fatty acids. *Journal of Biological Chemistry*, 1978, 253.5: 1522-1528.

LEE, J.; DAVIDOW, L. S.; WARSHAWSKY, D. Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nature genetics*, 1999, 21.4: 400-404.

LENGNER, C. J., et al. Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations. *Cell*, 2010, 141.5: 872-883.

LIU, L. X., et al. Homo- and heterodimerization of peroxisomal ATP-binding cassette half-transporters. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274.46: 32738-32743.

LOMBARD-PLATET, G., et al. A close relative of the adrenoleukodystrophy (ALD) gene codes for a peroxisomal protein with a specific expression pattern. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93.3: 1265-1269.

LÓPEZ-ERAUSKIN, J., et al. Antioxidants halt axonal degeneration in a mouse model of X-adrenoleukodystrophy. *Annals of neurology*, 2011, 70.1: 84-92.

LÓPEZ-ERAUSKIN, J., et al. Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in the peroxisomal disease X-linked adrenoleukodystrophy. *Human molecular genetics*, 2013, 22.16: 3296-3305.

LU, J., et al. A mouse model for X-linked adrenoleukodystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94.17: 9366-9371.

LYON, M. F. Gene action in the x-chromosome of the mouse. *Nature (London)*, 1961, 190: 372.

MAIER, E. M., et al. Symptoms in carriers of adrenoleukodystrophy relate to skewed X inactivation. *Annals of neurology*, 2002, 52.5: 683-688.

MAIER, E. M., et al. Disease manifestations and X inactivation in heterozygous females with Fabry disease. *Acta Paediatrica*, 2006, 95.S451: 30-38.

MAIER, E. M., et al. X-linked adrenoleukodystrophy phenotype is independent of ABCD2 genotype. *Biochemical and biophysical research communications*, 2008, 377.1: 176-180.

MATSUKAWA, T., et al. Identification of novel SNPs of ABCD1, ABCD2, ABCD3, and ABCD4 genes in patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) based on comprehensive resequencing and association studies with ALD phenotypes. *Neurogenetics*, 2011, 12.1: 41-50.

MCGUINNESS, M. C., et al. Human leukocyte antigens and cytokine expression in cerebral inflammatory demyelinating lesions of X-linked adrenoleukodystrophy and multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 1997, 75.1: 174-182.

MELHEM, E. R., et al. X-linked adrenoleukodystrophy: the role of contrast-enhanced MR imaging in predicting disease progression. *American journal of neuroradiology*, 2000, 21.5: 839-844.

MERMOUD, J. E., et al. Histone H3 lysine 9 methylation occurs rapidly at the onset of random X chromosome inactivation. *Current biology*, 2002, 12.3: 247-251.

MIGEON, B. R., et al. Adrenoleukodystrophy: evidence for X linkage, inactivation, and selection favoring the mutant allele in heterozygous cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1981, 78.8: 5066-5070.

MIGEON, B. R., et al. Identification of *TSIX* Encoding an RNA Antisense to Human *XIST*, Reveals Differences from its Murine Counterpart: Implications for X Inactivation. *The American Journal of Human Genetics*, 2001, 69.5: 951-960.

MIGEON, B. R., et al. Species Differences in *TSIX/Tsix* Reveal the Roles of These Genes in X-Chromosome Inactivation. *The American Journal of Human Genetics*, 2002, 71.2: 286-293.

MILLER, W. P., et al. Outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for childhood cerebral adrenoleukodystrophy: the largest single-institution cohort report. *Blood*, 2011, 118.7: 1971-1978.

MIYOSHI, Y., et al. Clinical aspects and adrenal functions in eleven Japanese children with X-linked adrenoleukodystrophy. *Endocrine journal*, 2009, 57.11: 965-972.

MONKHORST, K., et al. The probability to initiate X chromosome inactivation is determined by the X to autosomal ratio and X chromosome specific allelic properties. *PLoS One*, 2009, 4.5: e5616.

MORITA, M.; IMANAKA, T. Peroxisomal ABC transporters: Structure, function and role in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2012, 1822.9: 1387-1396.

MOSER, A. B., et al. Plasma very long chain fatty acids in 3,000 peroxisome disease patients and 29,000 controls. *Annals of neurology*, 1999, 45.1: 100-110.

MOSER, H. W., et al. Adrenoleukodystrophy Increased plasma content of saturated very long chain fatty acids. *Neurology*, 1998, 51.2: 334-334-a.

MOSER, H. W., et al. X-linked Adrenoleukodystrophy. In Scriver, C. *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York, McGraw Hill, Inc., 2004, Chap. 131

MOSER, H. W., et al. Follow-up of 89 asymptomatic patients with adrenoleukodystrophy treated with Lorenzo's oil. *Archives of neurology*, 2005, 62.7: 1073-1080.

MOSSER, J., et al. Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature*, 1993, 361.6414: 726-730.

MOSSNER, M., et al. Skewed X-inactivation patterns in ageing healthy and myelodysplastic haematopoiesis determined by a pyrosequencing based transcriptional clonality assay. *Journal of medical genetics*, 2013, 50.2: 108-117.

NETIK, A., et al. Adrenoleukodystrophy-related protein can compensate functionally for adrenoleukodystrophy protein deficiency (X-ALD): implications for therapy. *Human molecular genetics*, 1999, 8.5: 907-913.

NORA, E. P., et al. Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *Nature*, 2012, 485.7398: 381-385.

OFMAN, R., et al. The role of ELOVL1 in very long-chain fatty acid homeostasis and X-linked adrenoleukodystrophy. *EMBO molecular medicine*, 2010, 2.3: 90-97.

OGAWA, Y.; LEE, Jeannie T. *Xite*, X-Inactivation Intergenic Transcription Elements that Regulate the Probability of Choice. *Molecular cell*, 2003, 11.3: 731-743.

OHNO, Y., et al. ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107.43: 18439-18444.

OKAMOTO, I., et al. Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. *Nature*, 2011, 472.7343: 370-374.

OLERUP, O.; HILLERT, J.. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue antigens*, 1991, 38.2: 1-15.

OSEI, P., et al. Topography of rat hepatic microsomal enzymatic components of the fatty acid chain elongation system. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264.12: 6844-6849.

ØRSTAVIK, K. H.; ØRSTAVIK, R. E.; SCHWARTZ, M. Skewed X chromosome inactivation in a female with haemophilia B and in her non-carrier daughter: a genetic influence on X chromosome inactivation?. *Journal of medical genetics*, 1999, 36.11: 865-866.

PEGORARO, El., et al. Familial skewed X inactivation: a molecular trait associated with high spontaneous-abortion rate maps to Xq28. *The American Journal of Human Genetics*, 1997, 61.1: 160-170.

PENNY, G. D., et al. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature*, 1996, 379.6561: 131-137.

PFEIFER, G. P., et al. In vivo footprint and methylation analysis by PCR-aided genomic sequencing: comparison of active and inactive X chromosomal DNA at the CpG island and promoter of human PGK-1. *Genes & development*, 1990, 4.8: 1277-1287.

PLENGE, R. M., et al. A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation. *Nature genetics*, 1997, 17: 353.

PLENGE, R. M., et al. Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders. *The American Journal of Human Genetics*, 2002, 71.1: 168-173.

PUJOL, A., et al. Late onset neurological phenotype of the X-ALD gene inactivation in mice: a mouse model for adrenomyeloneuropathy. *Human molecular genetics*, 2002, 11.5: 499-505.

RAYMOND, G. V., et al. Head trauma can initiate the onset of adrenoleukodystrophy. *Journal of the neurological sciences*, 2010, 290.1: 70-74.

RIZZO, W. B., et al. Dietary erucic acid therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurology*, 1989, 39.11: 1415-1415.

SALSANO, E., et al. Preferential expression of mutant ABCD1 allele is common in adrenoleukodystrophy female carriers but unrelated to clinical symptoms. *Orphanet J Rare Dis*, 2012, 7.10.

SANDOVICI, I., et al. A longitudinal study of X-inactivation ratio in human females. *Human genetics*, 2004, 115.5: 387-392.

SEMMLER, A., et al. Genetic variants of methionine metabolism and X-ALD phenotype generation: results of a new study sample. *Journal of neurology*, 2009, 256.8: 1277-1280.

SHARP, A.; ROBINSON, D.; JACOBS, P. Age-and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Human genetics*, 2000, 107.4: 343-349.

SINGH, I., et al. Adrenoleukodystrophy: impaired oxidation of very long chain fatty acids in white blood cells, cultured skin fibroblasts, and amniocytes. *Pediatric research*, 1984, 18.3: 286-290.

SINGH, J.; KHAN, M.; SINGH, I. Caffeic acid phenethyl ester induces adrenoleukodystrophy (Abcd2) gene in human X-ALD fibroblasts and inhibits the proinflammatory response in Abcd1/2 silenced mouse primary astrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2013, 1831.4: 747-758.

SOARDI, F. C., et al. Phenotypic variability in a family with x-linked adrenoleukodystrophy caused by the p. Trp132Ter mutation. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 2010, 54.8: 738-743.

SWIERCZEK, S. I., et al. Methylation of AR locus does not always reflect X chromosome inactivation state. *Blood*, 2012, 119.13: e100-e109.

TIAN, D.; SUN, S.; LEE, J. T. The long noncoding RNA, Jpx, is a molecular switch for X chromosome inactivation. *Cell*, 2010, 143.3: 390-403.

THEDA, C., et al. Increased very long chain fatty acids in patients on a ketogenic diet: a cause of diagnostic confusion. *The Journal of pediatrics*, 1993, 122.5: 724-726.

THEDA, C., et al. Newborn screening for X-linked adrenoleukodystrophy: Further evidence high throughput screening is feasible. *Molecular genetics and metabolism*, 2014, 111.1: 55-57.

TUSCHL, K., et al. Mucopolysaccharidosis type II in females: case report and review of literature. *Pediatric neurology*, 2005, 32.4: 270-272.

UCHIDA, Y. The role of fatty acid elongation in epidermal structure and function. *Dermato-endocrinology*, 2011, 3.2: 65.

UZIEL, G., et al. Experience on therapy of adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. *Developmental neuroscience*, 1991, 13.4-5: 274-279.

VALIANPOUR, F., et al. Analysis of very long-chain fatty acids using electrospray ionization mass spectrometry. *Molecular genetics and metabolism*, 2003, 79.3: 189-196.

VAN DEN BERG, I. M., et al. X chromosome inactivation is initiated in human preimplantation embryos. *The American Journal of Human Genetics*, 2009, 84.6: 771-779.

VAN DIJK, J. P., et al. A novel, essential control for clonality analysis with human androgen receptor gene polymerase chain reaction. *The American journal of pathology*, 2002, 161.3: 807-812.

VAN GEEL, B. M., et al. Progression of abnormalities in adrenomyeloneuropathy and neurologically asymptomatic X-linked adrenoleukodystrophy despite treatment with "Lorenzo's oil". *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 1999, 67.3: 290-299.

VAN GEEL, B. M., et al. Evolution of phenotypes in adult male patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Annals of neurology*, 2001, 49.2: 186-194.

VAN ROERMUND, C. W. T, et al. The human peroxisomal ABC half transporter ALDP functions as a homodimer and accepts acyl-CoA esters. *The FASEB Journal*, 2008, 22.12: 4201-4208.

VAN ROERMUND, C. W. T, et al. Differential substrate specificities of human ABCD1 and ABCD2 in peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2011, 1811.3: 148-152.

VAN ROERMUND, C. W. T, et al. A role for the human peroxisomal half-transporter ABCD3 in the oxidation of dicarboxylic acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2013.

VARGAS, C. R., et al. Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1688:26–32.

WANG, Y., et al. X-linked adrenoleukodystrophy ABCD1 de novo mutations and mosaicism. *Molecular genetics and metabolism*, 2011, 104.1: 160-166.

WANG, Z., et al. Familial skewed x chromosome inactivation in adrenoleukodystrophy manifesting heterozygotes from a chinese pedigree. *PloS one*, 2013, 8.3: e57977.

WATKISS, E.; WEBB, T.; BUNDEY, S.. Is skewed X inactivation responsible for symptoms in female carriers for adrenoleucodystrophy?. *Journal of medical genetics*, 1993, 30.8: 651-654.

WIESINGER, C., et al. Impaired very long-chain acyl-coa  $\beta$ -oxidation in human x-linked adrenoleukodystrophy fibroblasts is a direct consequence of ABCD1 transporter dysfunction. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288.26: 19269-19279.

WHITCOMB, R. W.; LINEHAN, W. M.; KNAZEK, R. A. Effects of long-chain, saturated fatty acids on membrane microviscosity and adrenocorticotropin responsiveness of human adrenocortical cells in vitro. *Journal of Clinical Investigation*, 1988, 81.1: 185.

XUEBIN, Z., et al. Conservation of targeting but divergence in function and quality control of peroxisomal ABC transporters: an analysis using cross-kingdom expression. *Biochemical Journal*, 2011, 436.3: 547-557.

YORIFUJI, T., et al. X-inactivation pattern in the liver of a manifesting female with ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency. *Clinical genetics*, 1998, 54.4: 349-353.

ZHANG, L. X., et al. Clinical and electrophysiological improvement of adrenomyeloneuropathy with steroid treatment. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 2003, 74.6: 822-823.

ZHAO, J., et al. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science*, 2008, 322.5902: 750-756.

Internetové zdroje:

BERGER, J.; THEODOULOU, F.; KEMP, S. The effect of missense mutations on ALDP stability [online]. 6. 11. 2011 [cit. 26-02-2014]. Dostupné z: [www.x-ald.nl/mutations-gene/mutations-stability/](http://www.x-ald.nl/mutations-gene/mutations-stability/)

Databáze X-ALD [online]. 6. 11. 2013 [cit. 26-02-2014]. Dostupné z [www.x-ald.nl/mutations-gene/mutation-statistics/](http://www.x-ald.nl/mutations-gene/mutation-statistics/)

Gene [online]. 12. 4. 2014 [cit. 23-04-2014]. Dostupné z: [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/215](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/215)

Qiagen [online]. [cit. 30-04-2014]. Dostupné z: [www.qiagen.com/products/catalog/automated-solutions/pyrosequencing/pyromark-q96-id#productdetails](http://www.qiagen.com/products/catalog/automated-solutions/pyrosequencing/pyromark-q96-id#productdetails)