

**Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta  
Katedra antropologie a genetiky člověka**

Charles University, Faculty of Science  
Department of Anthropology and Human Genetics

Doktorský studijní program: Antropologie a genetiky člověka  
Ph.D. study program: Anthropology and human genetics



Autoreferát disertační práce  
Summary of the Ph.D. thesis

**Molekulárně genetická analýza vybraných kryptických  
přestaveb lidských chromosomů**

**Molecular Genetic Analysis of Selected Cryptic Rearrangements of  
Human Chromosomes**

Mgr. Roman Šolc

Školitelka : RNDr. Kateřina Hirschfeldová, Ph.D.

PRAHA 2017

## **Abstrakt**

Předkládaná práce shrnuje výsledky výzkumu zaměřeného na studium kryptických přestaveb lidských chromosomů. Konkrétně se zaměřuje na tři základní oblasti výzkumu.

První oblast představuje výzkum kryptických přestaveb identifikovaných jako kauzální příčiny onemocnění u mentálně retardovaných pacientů s původně neznámou etiologií. Nejčastěji se jedná o tzv. mikrodeleční syndromy. Velká variabilita fenotypu a často překrývající se symptomy mikrodelečních syndromů vyžadují celogenomový přístup. V rámci výzkumu bylo vyšetřeno 64 probandů a u 10 (16 %) z nich byly nalezeny kryptické přestavby, jež byly dále analyzovány.

Druhou oblast představuje výzkum kryptických přestaveb asociovaných s pseudoautosomálním regionem 1 (konkrétně s oblastí genu *SHOX*), jež mohou být přirozenou součástí variability genomu i příčinami vzniku onemocnění. V rámci výzkumu bylo vyšetřeno 98 pacientů s Léri-Weillovou dyschondrosteózou nebo idiopatickým malým vzrůstem, přičemž kauzální mutace byla nalezena u 68,8 %, resp. 7,8 % probandů. Současně byla drobná delece, tzv. delece L05101 nalézající se v blízkosti regulačních oblastí genu *SHOX*, vyhodnocena jako populační polymorfismus bez zjevného fenotypového dopadu. Komparativní analýza duplikací detekovaných v souboru 250 zdravých jedinců v porovnání s rozsahem a umístěním duplikací u pacientů označila duplikace s vysokým patogenním potenciálem. Výsledky byly podpořeny metaanalýzou publikovaných duplikací ve sledované oblasti.

Třetí oblast představují přestavby chromosomálního regionu 8q24 a mutace v genu *TRPS1* asociované s velmi vzácným trichorhinofalangeálním syndromem. V rámci výzkumu bylo vyšetřeno 9 pacientů, u 7 byla nalezena pravděpodobná příčina onemocnění. Zvolená metodika umožnila rovněž analýzu rozsáhlých 5' a 3' netranslatovaných oblastí genu *TRPS1* a detekovala zde řadu polymorfismů.

Práce poukazuje na význam výzkumu kryptických přestaveb lidských chromosomů pro lepší porozumění strukturní variabilitě lidského genomu a pro pochopení vzniku určitých patologií s jednoduchým i komplexním genetickým pozadím.

## **Klíčová slova**

kryptické přestavby lidských chromosomů; mentální retardace; gen *SHOX*; duplikace v oblasti *SHOX*; trichorhinofalangeální syndrom; gen *TRPS1*; molekulární cytogenetika člověka

## **Abstract**

The presented dissertation summarizes the results of research focused on the study of cryptic rearrangements of human chromosomes. Specifically, it focuses on three core areas of research.

The first area is the research of cryptic rearrangements identified as causal causes of mental retardation in patients with previously unknown aetiology. The most common are the so-called microdeletion syndromes. The large variability of the phenotype and often overlapping symptoms of microdeletion syndromes require a whole-genome approach. Within the research, 64 probands were investigated and in 10 (16%) cryptic rearrangements were found and further analyzed.

The second area is the research of cryptic rearrangements associated with the pseudoautosomal region 1 (specifically with the *SHOX* gene region), which may be both natural components of population variability and the cause of the disease. Within the research, 98 patients with Léri-Weill dyschondrosteosis or idiopathic short stature were examined, with a causal mutation found in 68.8%, and 7.8% probands respectively. At the same time, the minor deletion (so-called L05101 deletion) was evaluated as a population polymorphism without an apparent phenotypic impact. Duplications with high pathogenic potential were identified by mean of comparative analysis of duplications detected in a set of 250 healthy individuals and patients. The results were supported by meta-analysis of published duplications in the observed area.

The third area is the research of rearrangements of chromosomal region 8q24 and *TRPS1* gene mutations associated with the rare trichorhinophalangeal syndrome. The probable cause of the disease was found in 7 patients out of 9. The chosen methodology also allowed analysis of extensive 5' and 3' untranslated regions of the *TRPS1* gene and detected a number of polymorphisms.

The dissertation highlights the importance of the research of cryptic rearrangements of human chromosomes in order to better understand the structural variability of the human genome and the origin of pathologies both with simple and complex genetic background.

## **Keywords**

cryptic rearrangements of human chromosomes; mental retardation; *SHOX* gene; *SHOX* area duplications; trichorhinophalangeal syndrome; *TRPS1* gene; human molecular cytogenetics

## Souhrn výzkumné problematiky

Předkládaná práce představuje shrnutí vědeckého výzkumu, na němž se předkladatel spolupodílel v průběhu svého postgraduálního doktorského studia. Práce není ve svém celku založena na řešení jednoho základního vědeckého problému, či na jednoduším hledání odpovědi na jednu zásadní vědeckou otázku, nýbrž je koncipována jako mozaika vícera dílčích vědeckých výzkumů, jež ovšem spojuje tématická souvislost. Z toho vychází i podoba práce coby souhrnné, obsahující jako nedílnou součást pěti původních vědeckých článků publikovaných v impaktovaných odborných časopisech (publikace I – V).

Středobodem předkladateloiva vědeckého zájmu v kontextu této práce jsou kryptické strukturní aberace lidských chromosomů, jednak jako příčiny patologií a jednak jako součást přirozené lidské genetické variability. Za účelem užšího vymezení ji tedy lze tématicky klasifikovat do oboru molekulární cytogenetika člověka. Vlastní výzkum se konkrétně dotýká

- a) kryptických přestaveb asociovaných s mentální retardací (publikace I)
- b) kryptických přestaveb asociovaných s kostními dyspláziemi, konkrétně
  - a. přestaveb pseudoautosomálního regionu 1 (publikace II, III a IV)
  - b. přestaveb chromosomálního regionu 8q24 (publikace V).

Jako „kryptické přestavby“ se obvykle označují takové strukturní aberace chromosomů, které není možné detekovat za využití metod klasické cytogenetiky, tedy za využití rozličných pruhovacích technik aplikovatelných na metafázní chromosomy. Kryptické přestavby se od klasických neodlišují kvalitativně, jedná se o kvantitativní kontinuum, přičemž rozhraní je relevantní čistě z metodologického hlediska. S ohledem na to nelze ani stanovit jednoznačnou obecnou velikostní hranici mezi kryptickými a klasickými přestavbami, neboť nejnižší rozlišovací schopnost pruhovacích technik se mírně liší v závislosti na různých chromosomových oblastech. Obecně se dá říci, že za kryptické lze považovat přestavby menší než 3 – 5 Mb (Gijsbers et al., 2009, Salman et al., 2004). Co do typu se může jednat o přestavby různého druhu – delece, duplikace, translokace atd. Označují se pak většinou předponou „mikro“, tedy jako „mikrodelece“, „mikroduplikace“ apod.

Kryptické přestavby lze detekovat za využití technik molekulární genetiky a molekulární cytogenetiky. Tyto metody můžeme pro přehlednost rozdělit do tří

vývojových skupin. První skupinu tvoří metody postavené na hybridizaci (např. FISH, m-FISH, SKY a nejpokročilejší CGH, resp. aCGH); druhou skupinu pak metody odvozené od metody PCR, zejména qPCR; třetí skupinu pak představují metody kombinující oba předchozí mechanismy do jednoho celku (MAPH a MLPA).

Mikrodelece a mikroduplikace mohou vznikat kdekoli v genomu, ale některá místa jsou k jejich vzniku náchylnější (Ballif et al., 2007; de Vries et al., 2003; Weise et al., 2012). Jedná se o oblasti s vysokou sekvenční homologií, konkrétně o tzv. LCR (low copy repeats;  $10^2 - 10^3$  kb) (Bailey et al. 2002; Mefford et Eichler 2009) a TAR (telomere associated repetition;  $10^3$  kb) (Flint et al., 1997).

Vysoký stupeň homologie těchto sekvencí umožňuje nealelickou homologní rekombinaci (NAHR; non-allelic homologous recombination). Důsledkem NAHR je delece, případně reciproká duplikace chromosomálního úseku ležícího mezi sekvencemi účastnícími se rekombinace. Pokud deletovaná oblast obsahuje geny, může být jejich ztráta spojena s patologickým fenotypem. V rámci jednoho repetitivního úseku se rekombinace odehrává často mezi dvěma určitými homologními úseky. Tímto způsobem vznikají opakující se charakteristické přestavby asociované s některými mikrodelečními syndromy (Gu et al., 2008; Shaffer et Lupski, 2000).

Významnou roli při vzniku chromosomálních přestaveb hrají mechanismy, které se účastní opravy dvouvláknových zlomů, tzv. NHEJ (non-homologous end joining) (Karran, 2000). Další mechanismus založený na využití mikrohomologie nealelních oblastí, který vede k tvorbě chromosomálních přestaveb je tzv. FoSTeS (fork stalling and template switching) uplatňující se během replikační fáze (Gu et al., 2008).

První oblast vědeckého zájmu této práce představují kryptické strukturní aberace chromosomů asociované s mentální retardací. Kryptické přestavby chromosomů, zejména pak mikrodelece, mohou vést ke vzniku komplexních onemocnění (syndromů). K symptomům u řady těchto syndromů patří mimo jiné právě i mentální retardace.

Druhou a nejrozsáhlejší oblastí vědeckého zájmu této práce, jsou mikrodelece a mikroduplikace lokalizované do pseudoautosomálního regionu 1 (PAR1; Xp22 a Yp11), konkrétně do oblasti genu *SHOX* a jeho známých regulačních elementů. Tento gen kóduje významný transkripční faktor, který hraje zásadní úlohu při regulaci růstu, zejména růstu dlouhých kostí. V sousedství genu se nalézají velké množství regulačních elementů

s povahou zesilovačů. Aktivita některých z nich je natolik významná, že jejich ztráta v důsledku delece vede, i přes zachování neporušeného genu *SHOX*, k patologickému fenotypu. Vzhledem k tomu, že nelze fenotypově odlišit jedince s delecí genu *SHOX* od jedinců nesoucích sekvenční mutaci, byla současně provedena i mutační analýza tohoto genu. Výše uvedené (zejména strukturní) varianty či mutace byly analyzovány jak z pohledu klinického, tak z perspektivy přirozené variability lidského genomu.

Poslední oblastí vědeckého zájmu, již se zabývá tato práce, jsou strukturní aberace spojené s chromosomálním regionem 8q24, konkrétně s genem *TRPS1*, a mutace v genu *TRPS1*. V klinické rovině jsou tyto mutace asociované s tzv. trichorhinofalangeálním syndromem.

Výzkum kryptických přestaveb lidských chromosomů se i do budoucna jeví jako velmi perspektivní a stojí před řadou zajímavých otázek. Oproti svým počátkům, kdy se pozornost soustředila zejména na klinicky významné přestavby s přímým patologickým dopadem na svého nositele, současný výzkum se vedle toho výrazněji zaměřuje: zprv na delece a duplikace, jež jsou součástí přirozené variability lidského genomu a nemají klinický význam (včetně těch, jež mohou představovat evoluční stopu); a zadruhé na přestavby, jež mohou nějakým způsobem hrát roli při vzniku komplexních, polygenně podmíněných a multifaktoriálních onemocnění. Souhrnem lze říci, že kryptické přestavby lidských chromosomů představují výzkumnou oblast, jejíž studium nám může přinést řadu poznatků o přirozené strukturní variabilitě lidského genomu a jeho evoluci, fyziologickém i patologickém fungování genů a proteinů, regulaci genové exprese i o složitém genetickém pozadí polygenních a multifaktoriálních onemocnění.

## **Summary of the research issues**

This PhD thesis presents a summary of the scientific research on which the applicant participated during his postgraduate doctoral studies. The thesis is not based on solving one fundamental scientific problem, or on finding a single answer to one fundamental scientific question, but it is conceived as a mosaic of several partial scientific studies, which, however, are combined by the thematic connection. This is the reason that the form of the thesis as a summary, containing as its integral part five original scientific papers published in impacted scientific journals (publications I – V).

The core of the scientific interest in the context of this thesis are the cryptic structural aberrations of human chromosomes, both as a cause of pathologies and as a part of natural human genetic variability. To get a precise inclusion, it can be thematically classified into the field of human molecular cytogenetics. The actual research affects specifically

- a) the cryptic rearrangements associated with mental retardation (publication I)
- b) the cryptic rearrangements associated with bone dysplasia, specifically
  - a. the rearrangements of the pseudoautosomal region 1 (publications II, III and IV)
  - b. the rearrangements of chromosomal region 8q24 (publication V).

As the „cryptic rearrangements“ are commonly referred those structural aberrations of chromosomes, which can not be detected using methods of classical cytogenetics (variety of banding techniques applicable to metaphase chromosomes). Cryptic rearrangements are not qualitatively distinct from the classical, it is a quantitative continuum, where the edge is relevant purely methodologically. In view of this, it is impossible to establish a clear general boundary between the cryptic and the classical rearrangements, because the lowest resolution of banding techniques differs slightly depending on different chromosomal regions. Generally speaking, the rearrangements of less than 3 – 5 Mb can be considered as the cryptic ones (Gijsbers et al., 2009, Salman et al., 2004). They could be of different types – deletions, duplications, translocations, etc. They are usually referred to as „microdeletions“, „microduplications“ etc.

Cryptic rearrangements can be detected using techniques of molecular genetics and molecular cytogenetics. From the methodological point of view, we can divide them into three groups. The first group consists of hybridization methods (e.g. FISH, m-FISH, SKY

and the most advanced CGH or aCGH respectively); the second group consist of methods derived from the PCR method, in particular qPCR; the third group then represents the methods where both previous approaches are combined (MAPH and MLPA).

Microdeletions and microduplications can occur anywhere in the genome, but some sites are more prone to their appearance (Ballif et al., 2007, de Vries et al., 2003, Weise et al., 2012). These are areas of high sequence homology, namely LCR (low copy repeats;  $10^2 - 10^3$  kb) (Bailey et al 2002, Mefford et Eichler 2009) and TAR (telomere associated repetition;  $10^3$  kb) (Flint et al ., 1997).

The high degree of homology of these sequences allows the non-allelic homologous recombination (NAHR). The consequence of the NAHR is the deletion or reciprocal duplication of the chromosomal region lying in between the sequences involved in the recombination. If the deleted region contains genes, their loss may be associated with a pathological phenotype. Within a repetitive stretch, a recombination occurs frequently between two particular homologous regions. In this way, characteristic recurrent rearrangements associated with certain microdeletion syndromes arise (Gu et al., 2008; Shaffer et Lupski, 2000).

A significant role in the development of chromosomal rearrangements is played by mechanisms involved in the repair of double-strand breaks, the so-called NHEJ (non-homologous end-joining) (Karran, 2000). Another mechanism based on the use of microhomology of non-parallel regions that leads to chromosomal rearrangements is the so-called FoSTeS (fork stalling and template switching) applied during the replication phase (Gu et al., 2008).

The first area of scientific interest in this thesis are the cryptic structural aberrations associated with mental retardation. The cryptic rearrangements of chromosomes, especially microdeletions, can lead to complex diseases (syndromes), where mental retardation is one of the symptoms.

The second and most extensive area of scientific interest in this thesis are the microdeletions and microduplications located in the pseudoautosomal region 1 (PAR1; Xp22 and Yp11), specifically in the *SHOX* gene region and its known regulatory elements. This gene encodes an important transcription factor that plays a crucial role in regulation of growth of the middle part of limbs. There are many regulatory elements both upstream and



downstream of the gene with the nature of enhancers. The activity of some of them is so important, that their loss due to deletion, despite preservation of the intact *SHOX* gene, leads to a pathological phenotype. Because individuals with deletion of the *SHOX* gene and individuals carrying the sequence mutation can not be distinguished by the phenotype, mutation analysis of the coding portion of the gene was performed at the same time. The found variability (especially structural) or mutations were analyzed both from a clinical point of view and from a perspective of the natural variability of the human genome.

The last area of scientific interest that this thesis deals with are the structural aberrations associated with the chromosomal region 8q24. This is primarily the *TRPS1* gene region. At the clinical level, mutations and structural aberrations of the *TRPS1* gene are associated with the so-called trichorhinophalangeal syndrome.

The research into the cryptic rearrangements of human chromosomes appears to be very promising in the future and faces a number of interesting questions. Current research focuses not only on clinically important chromosomal rearrangements with a direct pathological impact but also on copy number variations that are a part of the natural variability of the human genome and have no clinical relevance (including those that can represent the evolutionary trail). It is also becoming increasingly important to study rearrangements that may somehow play a role in complex, polygenic and multifactorial illnesses. In summary, the cryptic rearrangements of human chromosomes represent a research area whose study can provide us with a number of findings about the natural structural variability of the human genome and its evolution. Together with that, we uncover the knowledge about physiological and pathological functioning of genes, complexity of gene expression regulation and genetic background of polygenic and multifactorial diseases.

## Použité zkratky / Abbreviations

aCGH ... array CGH

CGH ... comparative genomic hybridization (komparativní genomová hybridizace)

FISH ... fluorescent *in situ* hybridization (fluorescenční *in situ* hybridizace)

FoSTeS ... fork stalling and template switching

LCR ... low-copy repeats

MAPH ... multilocus amplifiable probe hybridization

m-FISH ... multicolour FISH (mnohobarevná FISH)

MLPA ... multiplex ligation-dependent probe amplification

NAHR ... non-allelic homologous recombination (nealelická homologní rekombinace)

NHEJ ... non-homologous end joining (nehomologní spojování konců)

PAR1 ... pseudoautosomal region 1 (pseudoautosomální region 1)

PCR ... polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)

qPCR ... quantitative PCR (kvantitativní PCR)

*SHOX* ... short stature homeobox-containing gene (lidský gen)

SKY ... spectral karyotyping (spektrální karyotypizace)

TAR ... telomere associated repetition

*TRPS1* ... transcriptional repressor GATA binding 1 (lidský gen)

## Použitá literatura / References

**Bailey JA, Gu Z, Clark RA, Reinert K, Samonte RV, Schwartz S, Adams MD, Myers EW, Li PW, Eichler EE** (2002) Recent segmental duplications in the human genome. *Science*, 297, 1003-1007

**Ballif BC, Sulpizio SG, Lloyd RM, Minier SL, Theisen A, Bejjani BA, Shaffer LG** (2007) The clinical utility of enhanced subtelomeric coverage in array CGH. *Am J Med Genet*, 143A, 1850-1857

**De Vries BBA, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C** (2003) Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet*, 40, 385-398

**Flint J, Bates GP, Clark K, Dorman A, Willingham D, Roe BA, Micklem G, Higgs DR, Louis EJ** (1997) Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. *Hum Mol Genet*, 6, 1305-1314

**Gijsbers ACJ, Lew JYK, Bosch CAJ, Schuurs-Hoeijmakers JHM, van Haeringen A, den Hollander NS, Kant SG, Bijlsma EK, Breuning MH, Bakker E, Ruivenkamp CAL** (2009) A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: test arrays first. *European Journal of Human Genetics*, 17, 1394-1402

**Gu W, Zhang F, Lupski JR** (2008) Mechanisms for human genomic rearrangements. *PathoGenetics*, 1(1), 4

**Karran P** (2000) DNA double strand break repair in mammalian cells. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10(2), 144-150

**Mefford HC, Eichler EE** (2009) Duplication hotspots, rare genomic disorders and common disease. *Current Opinion in Genetics and Development*, 19(3), 196-204

**Salman M, Jhanwar SC, Ostrer H** (2004) Will the new cytogenetics replace the old cytogenetics? *Clin Genet*, 66, 265-275

**Shaffer LG, Lupski JR** (2000) Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet*, 34, 297-329

**Weise A1, Mrasek K, Klein E, Mulatinho M, Llerena JC jr, Hardekopf D, Pekova S, Bhatt S, Kosyakova N, Liehr T** (2012) Microdeletion and microduplication syndromes. *J Histochem Cytochem*, 60(5), 346-58

## **Shrnutí předkládaných publikací**

### **/ Summary of the presented publications**

D) Hirschfeldova K, Baxova A, Kebrdlova V, Solc R, Mihalova R, Lnenicka P, Vesela K, Stekrova J (2011) *Cryptic chromosomal rearrangements in children with idiopathic mental retardation in the Czech population*. Genetic Testing and Molecular Biomarkers, 15(9), 607-611

Shrnutí: Cílem naší studie bylo detekovat kryptické přestavby metodou *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) v kohortě 64 probandů s mentální retardací nebo opožděným vývojem v kombinaci s alespoň jedním z vybraných symptomů (poporodní hypotonie, vrozené anomálie nebo faciální dysmorfie), ale bez pozitivního cytogenetického nálezu. Studie přispívá k poznání mikrolečních syndromů a pomáhá odhalit jejich přirozenou fenotypovou variabilitu. Celkem bylo zjištěno 10 pozitivních nálezů (16 %), konkrétně 3 duplikace (Xpter-p22.32; 17p11.2; 22q11) a 6 různých delecí (1p36; 7q11.23; 10p15; 15q11-q13; 17p11.2; 17p13.3), 1 z nich u 2 probandů. Kromě dobře charakterizovaných syndromů byly také zachyceny méně obvyklé přestavby s nejednoznačnými fenotypovými souvislostmi. Některé přestavby, zejména duplikace, jsou spojeny s neurčitým fenotypem a jejich četnost výskytu tedy může být podhodnocena.

Summary: The aim of our study was to scan for cryptic rearrangements using the multiplex ligation probe amplification (MLPA) method in a cohort of 64 probands diagnosed with mental retardation or developmental delays in combination with at least one of the following symptoms: hypotonia after birth, congenital anomalies, or face dysmorphisms; but without a positive cytogenetic finding. The study contributes to the knowledge of microdeletion syndromes and helps disclose their natural phenotypic variability. In total, 10 positives (16%) were detected, particularly 3 duplications (Xpter-p22.32; 17p11.2; 22q11) and 6 different deletions (1p36; 7q11.23; 10p15; 15q11-q13; 17p11.2; 17p13.3), 1 of these in 2 probands. Besides the well-characterized syndromes, less-often described rearrangements with ambiguous phenotype associations were also detected. Some rearrangements, particularly duplications, are associated with vague phenotypes; and their frequency could be underestimated.

**II)** Hirschfeldova K, **Solc R**, Baxova A, Zapletalova J, Kebrdlova V, Gaillyova R, Prasilova S, Soukalova J, Mihalova R, Lnenicka P, Florianova M, Stekrova J (2012) *SHOX gene defects and selected dysmorphic signs in patients of idiopathic short stature and Léri-Weill dyschondrosteosis*. *Gene*, 491(2), 123-127

Shrnutí: Cílem studie bylo analyzovat frekvenci poruch genu *SHOX* a vybraných dysmorfických symptomů u pacientů s idiopatickým malým vzrůstem (ISS) nebo Léri-Weillovou dyschondrosteózou (LWD), původem z české populace. Celkem bylo v rámci studie vyšetřeno 98 jedinců. Kritériem zařazení byla přítomnost malého vzrůstu ( $-2,0$  SD) v kombinaci s alespoň jedním z vybraných dysmorfických příznaků pro skupinu ISS+; anebo přítomnost Madelungovy deformity bez pozitivního vyšetření karyotypu pro skupinu LWD+. Každý proband byl vyšetřen za použití MLPA kitu P018, který pokrývá *SHOX* a jeho regulační sekvence. Dále byla provedena mutační analýza kódujících sekvencí genu *SHOX*. Jak rozsah, tak lokalizace zlomů u nalezených delecí/duplikací byly poměrně variabilní. V PAR1 byly objeveny některé přestavby bez očividné fenotypové souvislosti. Ve skupině ISS+ byly za použití MLPA nalezeny čtyři delece v oblasti PAR1 spojené s poruchou genu *SHOX*, duplikace PAR1 s nejednoznačným účinkem a dvě bodové mutace *SHOX* (13,7 %). Ve skupině LWD+ metoda MLPA odhalila devět delecí v oblasti PAR1 se škodlivým účinkem na *SHOX*, první pospaný případ izolované duplikace enhanceru *SHOX* a bodové mutace *SHOX* (68,8 %). V obou skupinách ISS+ a LWD+ byl pozitivní nález spojen s disproporčně malým vzrůstem; ve skupině ISS v kombinaci se svalovou hypertrofií. Zdá se, že malé přestavby PAR1 se mohou v populaci vyskytovat poměrně často. Naše studie ukazuje, že disproporčnost, zejména v kombinaci se svalovou hypertrofií, je relevantním indikátorem toho, že ISS vznikl v důsledku poruchy *SHOX*.

Summary: The aim of the study was to analyze frequency of *SHOX* gene defects and selected dysmorphic signs in patients of both idiopathic short stature (ISS) and Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD), all derived from the Czech population. Overall, 98 subjects were analyzed in the study. Inclusion criteria were the presence of short stature ( $-2.0$  SD), in combination with at least one of the selected dysmorphic signs for the ISS+ group; and the presence of Madelung deformity, without positive karyotyping for the LWD+ group. Each proband was analyzed by use of P018 MLPA kit, which covers *SHOX* and its regulatory sequences. Additionally, mutation survey was done of the coding portions of the

*SHOX*. Both the range and breakpoint location of found deletions/duplications were quite variable. Some PAR1 rearrangements were detected, without obvious phenotypic association. In the ISS+ group, MLPA analysis detected four PAR1 deletions associated with the *SHOX* gene defect, single PAR1 duplication with an ambiguous effect, and two *SHOX* mutations (13.7%). In the LWD+ group, MLPA analysis detected nine deletions in PAR1 region, with a deleterious effect on *SHOX*, first reported case of isolated *SHOX* enhancer duplication, and a single *SHOX* mutation (68.8%). In both ISS+ and LWD+ groups were positivity associated with a disproportionate short stature; in the ISS+ group, in combination with muscular hypertrophy. It seems that small PAR1 rearrangements might be quite frequent in the population. Our study suggests disproportionateness, especially in combination with muscular hypertrophy, as an important indicator that ISS is caused by a *SHOX* defect.

**III) Solc R, Hirschfeldova K, Kebrdlova V, Baxova A (2014) *Analysis of common SHOX gene sequence variants, and ~4.9kb PAR1 deletion in ISS patients*. Journal of Genetics, 93(2), 505-508**

Shrnutí: Běžné sekvenční varianty genu *SHOX* (short stature homeobox-containing gene) mohou být odpovědné za známý fenotyp, jakým je ISS. Analyzovali jsme asociaci často se vyskytující delece v PAR1 o velikosti přibližně 4,9 kb (L05101) a častých sekvenčních variant v genu *SHOX*, včetně 5' netranslatované oblasti a proximální části promotoru 1, s fenotypem ISS. Potvrdili jsme, že malá delece L05101 v PAR1 představuje nepatogenní polymorfismus. Zjevně také neexistuje souvislost mezi častými bodovými polymorfismy v genu *SHOX* s fenotypem ISS.

Summary: Common sequence variants of *SHOX* gene (short stature homeobox-containing gene) could be responsible for common phenotype such as ISS. We have analysed an association of common ~4,9kb PAR1 deletion (L05101), and common sequence variants detected in the *SHOX* gene, including 5' untranslated region and proximal part of the promoter 1, with ISS phenotype. We confirmed the small L05101 PAR1 deletion

represents a non-pathogenic polymorphism. There was no obvious association of *SHOX* gene common polymorphic sites (haplotypes) with ISS phenotype.

**IV) Hirschfeldova K, Solc R (2017) Comparison of *SHOX* and associated elements duplications distribution between patients (Léri-Weill dyschondrosteosis/idiopathic short stature) and population sample. Gene, 627, 164-168**

Shrnutí: Účinek heterozygotních duplikací genu *SHOX* a souvisejících elementů na vývoj Léri-Weillovy dyschondrosteózy (LWD) a idiopatického malého vzrůstu (ISS) je ve srovnání s reciprokými delecemi méně jasný. Cílem naší studie bylo porovnat frekvenci a rozložení duplikací v rámci *SHOX* a souvisejících elementů mezi populačním souborem a pacienty s LWD/ISS. Předběžná analýza provedená na vzorku 250 obyvatel ČR ve srovnání s naším dříve popsáním souborem 352 českých pacientů s ISS/LWD ukázala, že spíše nežli ve frekvenci duplikací je patrný rozdíl v jejich distribuci. Konkrétně došlo v našem vzorku LWD/ISS ke zvýšené frekvenci výskytu duplikací zasahujících enhancer CNE-9. Abychom zjistili, zda jsou získané údaje v souladu s publikovanými studiemi, provedli jsme průzkum literatury, čímž jsme získali publikované případy duplikací *SHOX* nebo přidružených elementů a vytvořili z nich sloučený soubor pacientů s LWD, sloučený soubor pacientů s ISS a sloučený populační soubor. Vypočítali jsme relativní četnost duplikací jednotlivých regionů v každém z těchto sloučených souborů. Byl nalezen signifikantní rozdíl v relativní frekvenci duplikací enhanceru CNE-9 (11 vs. 3) a kompletních duplikací *SHOX* (exon1-6b) (4 vs. 24) ( $p=0,0139$ , resp.  $p=0,000014$ ) mezi sloučeným souborem pacientů s LWD a sloučeným populačním souborem. Předpokládáme tedy, že parciální duplikace *SHOX* a malé duplikace zasahující enhancer CNE-9 mohou představovat vysoce penetrantní alely spojené s rozvojem ISS a LWD.

Summary: The effect of heterozygous duplications of *SHOX* or associated regulatory elements on Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and idiopathic short stature (ISS) development is less distinct when compared to reciprocal deletions. The aim of our study was to compare frequency and distribution of duplications within *SHOX* and associated elements between population sample and LWD (ISS) patients. A preliminary analysis

conducted on Czech population sample of 250 individuals compared to our previously reported sample of 352 ISS/LWD Czech patients indicated that rather than the difference in frequency of duplications it is the difference in their distribution. Particularly, there was an increased frequency of duplications residing to the CNE-9 enhancer in our LWD/ISS sample. To see whether the obtained data are consistent across published studies we made a literature survey to get published cases with *SHOX* or associated elements duplication and formed the merged LWD, the merged ISS, and the merged population samples. Relative frequency of particular region duplication in each of those merged samples were calculated. There was a significant difference in the relative frequency of CNE-9 enhancer duplications (11 vs. 3) and complete *SHOX* (exon1-6b) duplications (4 vs. 24) (p-value 0.0139 and p-value 0.000014, respectively) between the merged LWD sample and the merged population sample. We thus propose that partial *SHOX* duplications and small duplications encompassing CNE-9 enhancer could be highly penetrant alleles associated with ISS and LWD development.

V) Solc R, Klugerova M, Vcelak J, Baxova A, Kuklik M, Vseticka J, Beharka R, Hirschfeldova K (2017) *Mutation analysis of TRPS1 gene including core promoter, 5'UTR, and 3'UTR regulatory sequences with insight into their organization*. Clinica Chimica Acta, 464(1), 30-36

Shrnutí: Protein TRPS1 je silným regulátorem proliferace, diferenciace a apoptózy. Poruchy genu *TRPS1* jsou pevně spojeny s rozvojem vzácného trichorinofalangeálního syndromu (TRPS). U devíti pacientů s TRPS jsme provedli vyšetření metodou MLPA, za účelem zachycení delece v klíčové chromozomální oblasti 8q24.1, v kombinaci s mutační analýzou genu *TRPS1*, včetně jádrového promotoru, sekvencí 5'UTR a 3'UTR. Nízká komplexita či velký rozsah netranslatovaných regulačních sekvencí je vyloučil z analýzy v předchozích studiích. Sekvenování ampliconů sekvenáčnickými technikami nové generace použité v naší studii tato technická omezení překonalo. Nakonec jsme provedli rozšířenou analýzu regulačních sekvencí genu *TRPS1*. Byla detekována pouze jedna rozsáhlá delece a jedna intragenová delece zasahující několik exonů. Mutační analýza odhalila pět mutací v genu *TRPS1* (dvě strukturní přestavby, dvě *nonsense* mutace a jednu *missense* substituci) a



dosáhla celkové míry detekce poruch 78 %. V rámci analyzovaných regulačních sekvencí bylo zjištěno několik polymorfních variant, avšak bez předpokládaného patogenního účinku. Analýza *in silico* naznačila využívání alternativních promotorů a odlišnou efektivitu exprese různých transkriptů *TRPS1*. Haploinsuficience genu *TRPS1* byla zodpovědná za většinu fenotypu TRPS. Struktura regulačních sekvencí genu *TRPS1* naznačuje obecně nízkou míru exprese jedné alely a její přísnou kontrolu.

Summary: The TRPS1 protein is a potent regulator of proliferation, differentiation, and apoptosis. The *TRPS1* gene aberrations are strongly associated with rare trichorhinophalangeal syndrome (TRPS) development. We have conducted MLPA analysis to capture deletion within the crucial 8q24.1 chromosomal region in combination with mutational analysis of *TRPS1* gene including core promoter, 5'UTR, and 3'UTR sequences in nine TRPS patients. Low complexity or extent of untranslated regulatory sequences avoided them from analysis in previous studies. Amplicon based next generation sequencing used in our study bridge over these technical limitations. Finally, we have made extended *in silico* analysis of *TRPS1* gene regulatory sequences organization. Single contiguous deletion and an intragenic deletion intervening several exons were detected. Mutational analysis revealed five *TRPS1* gene aberrations (two structural rearrangements, two nonsense mutations, and one missense substitution) reaching the overall detection rate of 78%. Several polymorphic variants were detected within the analysed regulatory sequences but without proposed pathogenic effect. *In silico* analysis suggested alternative promoter usage and diverse expression effectivity for different *TRPS1* transcripts. Haploinsufficiency of *TRPS1* gene was responsible for most of the TRPS phenotype. Structure of *TRPS1* gene regulatory sequences is indicative of generally low single allele expression and its precise control.

## Curriculum vitae

\* 26.2.1986 v Lomnici nad Popelkou

### **Vzdělání :**

- 2011 – dosud : Ph.D., Antropologie a genetiky člověka; Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta; disertační práce: *Molekulárně genetická analýza vybraných kryptických přestaveb lidských chromosomů*
- 2008 – 2011 : NMgr., Antropologie a genetiky člověka; Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta; diplomová práce: *Molekulárně genetická analýza u pacientů s podezřením na kryptickou přestavbu*
- 2008 – 2011 : mimořádné studium k získání pedagogické způsobilosti – biologie; Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta; závěrečná práce: *Výuka genetiky na gymnáziích*
- 2005 – 2008 : Bc., Molekulární biologie a biochemie organismů; Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta; bakalářská práce: *Molekulárně genetická analýza u pacientů s podezřením na mikroleční syndrom*
- 2001 – 2005: Lepařovo gymnázium v Jičíně

### **Zaměstnání :**

2011 – dosud : laborant; Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta

### **Členství v odborných společnostech :**

- 2017 – dosud : The European Society of Human Genetics
- 2015 – dosud : Československá biologická společnost
- 2014 – dosud : Genetická společnost Gregora Mendela
- 2014 – dosud : Společnost lékařské genetiky a genomiky ČLS JEP

### **Výzkumné granty :**

- 2015 – 2016 : GAUK (202615): Komplexní genetická analýza u pacientů s vybranými kostními dysplaziemi; hlavní řešitel
- 2009 – 2011 : IGA MZ (NS/10327-3): Komplexní genetická analýza u pacientů s mentální retardací a dysmorfiiemi – stanovení vhodného diagnostického postupu; spolupracovník

### **Pedagogická činnost :**

*Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta*

- přímá výuka

- 2015 – dosud : Molekulární cytogenetika člověka (100 %)
- 2013 – dosud : Repetitorium biologie podle RVP G III (8 %)
- 2012 – dosud : Molekulární antropologie (17 %)
- 2012 – dosud : Praktikum z antropologie (17 %)
- 2012 – dosud : Základy lékařské genetiky (8 %)
- 2010 – dosud : Antropologie (8 %)
- 2010 – dosud : Genetika v medicíně (17 %)

- školitelství (obhájené práce):

1 diplomová práce, 10 bakalářských prací, 1 závěrečná práce ČŽV

- oponentury:

3 diplomové práce, 4 bakalářské práce

*Univerzita Karlova, Filozofická fakulta*

- přímá výuka

- 2015 – dosud : Biologie člověka (100 %)

## **Publikační a prezentační činnost**

### **Předkládané publikace v impaktovaných časopisech**

Hirschfeldova K, **Solc R** (2017) Comparison of *SHOX* and associated elements duplications distribution between patients (Léri-Weill dyschondrosteosis/idiopathic short stature) and population sample. *Gene*, 627, 164-168, IF<sub>2016</sub> = 2,415

**Solc R**, Klugerova M, Vcelak J, Baxova A, Kuklik M, Vseticka J, Beharka R, Hirschfeldova K (2017) Mutation analysis of *TRPS1* gene including core promoter, 5'UTR, and 3'UTR regulatory sequences with insight into their organization. *Clinica Chimica Acta*, 464(1), 30-36, IF<sub>2016</sub> = 2,873

**Solc R**, Hirschfeldova K, Kebrdlova V, Baxova A (2014) Analysis of common *SHOX* gene sequence variants, and ~4.9kb PAR1 deletion in ISS patients. *Journal of Genetics*, 93(2), 505-508, IF<sub>2014</sub> = 1,093

Hirschfeldova K, **Solc R**, Baxova A, Zapletalova J, Kebrdlova V, Gaillyova R, Prasilova S, Soukalova J, Mihalova R, Lnenicka P, Florianova M, Stekrova J (2012) *SHOX* gene defects and selected dysmorphic signs in patients of idiopathic short stature and Léri-Weill dyschondrosteosis. *Gene*, 491(2), 123-127, IF<sub>2012</sub> = 2,196

Hirschfeldova K, Baxova A, Kebrdlova V, **Solc R**, Mihalova R, Lnenicka P, Vesela K, Stekrova J (2011) Cryptic chromosomal rearrangements in children with idiopathic mental retardation in the Czech population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 15(9), 607-611, IF<sub>2011</sub> = 1,110

### **Další publikace v impaktovaném časopise**

**Solc R** (2014) The Czech system of evaluation of science research handicaps interdisciplinary science. *Knowledge Organization*, 41(5), 410-413, IF<sub>2014</sub> = 0,585

## **Příspěvky na mezinárodních odborných konferencích**

**Solc R**, Hirschfeldova K: Comparison of the distribution of duplicated regions associated with *SHOX* gene between LWD/ISS patients and population sample. European human genetic conference (ESHG), May 2017, Copenhagen; poster

**Solc R**, Hirschfeldova K, Klugerova M, Vcelak J, Baxova A, Kuklik M, Vseticka J: *TRPS1* gene defects in patients with trichorhinophalangeal syndrome. European human genetic conference (ESHG), May 2016, Barcelona; poster

Mihalova R, Hirschfeldova K, Baxova A, Kebrdlova V, Lnenicka P, **Solc R**, Stekrova J, Vesela K: Detection efficiency of FISH vs. MLPA method in microdeletion syndromes patients. European human genetic conference (ESHG), May 28.-31. 2011, Amsterdam RAI, Netherlands; poster, abstrakt: European Journal of Human Genetics, 2011, Vol.19, Suppl.2, p.145

Hirschfeldova K, Kebrdlova V, **Solc R**, Florianova M, Lnenicka P, Stekrova J, Mihalova R, Baxova A: *SHOX* gene polymorphic variants and their association with isolated short stature. European human genetics conference (ESHG), May 28.-31. 2011, Amsterdam, Netherlands; poster, abstrakt: European Journal of Human Genetics, 2011, Vol.19, Suppl.2, p.120-121

Hirschfeldova K, Kebrdlova V, Mihalova R, Stekrova J, Vesela K, Lnenicka P, Florianova M, **Solc R**, Baxova A: MLPA analysis in children with mental retardation. European human genetics conference (ESHG) , June 12.-15. 2010, Gothenburg, Sweden; poster, abstrakt: European Journal of Human Genetics, 2010, Vol.18, Suppl.1, p.121.

Baxova A, Kebrdlova V, **Solc R**, Lnenicka P, Florianova M, Stekrova J, Mihalova R, Vesela K, Hirschfeldova K: PAR1 deletion/duplication in patients with dyschondrosteosis or idiopathic short stature. European human genetics conference (ESHG) , June 12.-15. 2010, Gothenburg, Sweden; poster, abstrakt: European Journal of Human Genetics, 2010, Vol.18, Suppl.1, p.342

## **Příspěvky na domácích odborných konferencích**

**Šolc R**, Klugerová M, Včelák J, Baxová A, Kuklík M, Všetička J, Beharka R, Hirschfeldová K: Komplexní molekulárně genetická analýza genu *TRPS1* u pacientů s trichorhinofalangeálním syndromem. 20. celostátní konference DNA diagnostiky, listopad 2016, Dolní Morava; přednáška

**Šolc R**, Klugerová M, Hirschfeldová K, Baxová A, Kuklík M: Molekulárně genetická analýza u pacientů s trichorhinofalangeálním syndromem. 19. celostátní konference DNA diagnostiky, listopad 2015, České Budějovice; přednáška

**Šolc R**, Klugerová M, Hirschfeldová K, Baxová A, Kuklík M: Strukturní aberace chromozomové oblasti 8q24 a mutace v kódujících oblastech genu *TRPS1* u pacientů s trichorhinofalangeálním syndromem 48. cytogenetická konferenc SLG ČLS, září 2015, Brno; poster, abstrakt ve sborníku

**Šolc R**, Hirschfeldová K, Kebrdlová V, Baxová A: Role ~4,9 kb delece v regulačních oblastech genu *SHOX* v regionu PAR1: příčina malého vzrůstu, anebo populační polymorfismus? Konference GSGM, 24.-26. září 2014, Průhonice; poster, abstrakt ve sborníku: str. 92

Hirschfeldová K, Kebrdlová V, Mihalová R, Štekrová J, Lněnička P, **Šolc R**, Vranová V, Baxová A: Komplexní genetická analýza u dětí s mentální retardací a opožděným PMR vývojem. 15. celostátní konference DNA diagnostiky, 24.-25. listopadu 2011, Praha; poster

Hirschfeldová K, Baxová A, Kebrdlová V, **Šolc R**, Lněnička P, Gaillyová R, Mihalová R, Veselá K, Štekrová J: Komplexní analýza *SHOX* genu u pacientů s dyschondrosteózou a idiopatickým malým vzrůstem. 14. celostátní konference DNA diagnostiky, 25.-26. listopadu 2010, Brno; poster, abstrakt ve sborníku: str.55

## **Překlady knih**

Al-Khalili Jim, McFadden Johnjoe: Život na hraně. Vyšehrad, Praha, *v přípravě k vydání* (přeložil **Šolc R.**)

Ayala Francesco: Velké otázky. Evoluce. Universum, Praha, 2014 (přeložili **Šolc R.** a Lhotský J.)

Dawkins Richard: Největší show pod Sluncem. Dokořán a Argo, Praha, 2011 (přeložili Lhotský J. a **Šolc R.**)

## **Popularizační články**

Hora M, **Šolc R** (2016) Konečně nalezena: Lidská stopa v genomu neandertálců. Vesmír. online 24. 4. 2016

**Šolc R** (2013) Zrada na sedm způsobů. Vesmír, 92, 519

**Šolc R** (2013) Příliš povyku pro nic? Vesmír, 92, 244

**Šolc R** (2013) Anti-popularizace teorie strun. Vesmír, 92, 54

**Šolc R** (2012) Jeden za všechny, všichni za Pauliho! Vesmír, 91, 681

**Šolc R**, Lhotský J, Čepl J, Vosolsobě S (2008) Mýty a skutečnost. Vesmír, 88, 466-468.

## **Obsah**

<b>Abstrakt, klíčová slova</b> .....	<b>2</b>
<b>Abstract, keywords</b> .....	<b>3</b>
<b>Souhrn výzkumné problematiky</b> .....	<b>4</b>
<b>Summary of the research issues</b> .....	<b>7</b>
<b>Použité zkratky / Abbreviations</b> .....	<b>10</b>
<b>Použitá literatura / References</b> .....	<b>11</b>
<b>Shrnutí předkládaných publikací / Summary of the presented publications</b>	<b>12</b>
<b>Curriculum vitae</b> .....	<b>18</b>
<b>Publikační a prezentační činnost</b> .....	<b>20</b>