

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie (N1501)
Studijní obor: NGEMOVI (1515T010)



Bc. Alena Černá

Studium exprese mutantních alel a stavu X inaktivace ve vztahu ke klinickým
projevům vybraných monogenních X vázaných onemocnění

Gene expression of mutant alleles and X inactivation pattern in patients with selected X-linked
disorders

Diplomová práce

Školitelka: RNDr. Lenka Dvořáková, CSc.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem Studium exprese mutantních alel a stavu X inaktivace ve vztahu ke klinickým projevům vybraných monogenních X vázaných onemocnění zpracovala samostatně pod vedením RNDr. Lenky Dvořákové, CSc. 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,

.....

Alena Černá

Na tomto místě bych ráda poděkovala především své školitelce RNDr. Lence Dvořákové, CSc. za její vstřícný přístup, podnětné připomínky, postřehy, cenné rady a trpělivost, kterou se mnou v průběhu psaní této práce měla. Současně bych chtěla poděkovat Heleně Wiederlechnerové, DiS. za pomoc s laboratorní částí této práce, Mgr. Martinu Řebounovi za poskytnutá data z masivně paralelního sekvenování, Ing. Heleně Poupětové za poskytnuté hodnoty aktivity enzymu, MUDr. Luboru Goláňovi za vyhodnocení klinického skóre fenotypu u vybraných pacientek a celému pracovnímu týmu laboratoře DNA diagnostiky Kliniky dětského a dorostového lékařství VFN za poskytnutí skvělého prostředí pro vypracování této diplomové práce. V neposlední řadě děkuji své rodině za jejich podporu a trpělivost, díky kterým bylo celé mé studium možné.

Abstrakt

U žen nalézáme dvojnásobný počet X-vázaných genů oproti mužům, neboť mají dva chromozomy X, zatímco muži jsou pro X-vázané geny hemizygoti. Tato nerovnováha je kompenzována v průběhu časně embryogeneze procesem X-inaktivace (XCI), tzv. primární X-inaktivace. Inaktivace chromozomu X je náhodný proces, přičemž ženy jsou mozaiky dvou buněčných populací. Poměr exprimovaných alel u žen může být náhodný (cca 50:50) nebo nevyvážený ($\geq 80:20$). K nevyvážené XCI může dojít v důsledku selekce, kdy je preferenčně inaktivována jedna z alel. V tomto případě mluvíme o sekundární XCI.

V této diplomové práci jsme prováděli stanovení inaktivace chromozomu X u heterozygotních žen s různou závažností fenotypových příznaků u vybraných X vázaných dědičných metabolických onemocnění. Naším hlavním zájmem byla Fabryho choroba (deficit enzymu α -galaktosidázy A kódovaného genem *GLA*). Dále jsme studovali XCI u jedné rodiny s X-vázanou agamaglobulinémií.

Zabývali jsme se studiem mutantních alel a stavu XCI na základě analýzy různých lokusů, různých metodických přístupů a různých tkání. Poprvé jsme využili přímou analýzu transkriptu genu *GLA* k detekci poměru alel. K alelově specifické expresi (ASE) jsme dále využili jednonukleotidových polymorfismů v genech *IDS* a *LAMP2*. K methyl-senzitivní restriční analýze (MSRA) jsme využili lokusy *AR*, *RP2* a *CNKS2*. Pro ASE jsme použili RNA izolovanou z krve a pro MSRA jsme využili DNA izolovanou z krve a bukalních stěrů. Testovali jsme zaměnitelnost a spolehlivost jednotlivých sond vzhledem k přímé analýze genu *GLA*, sledovali jsme tkáňovou specifitu v krvi a bukalních stěrech.

Mezi stanovovanými sondami jsme zjistili vysoký stupeň korelace. Tkáňová specifita odhalila u 25 % pacientek nevyvážené poměry XCI v krvi, zatímco mezi vzorky bukalních stěrů byl nevyvážený poměr XCI detekován pouze u jedné pacientky. Enzymová aktivita α -galaktosidázy A odpovídala hodnotám relativní exprese genu *GLA*.

Výsledky analýz ASE a MSRA byly porovnány s tíží klinických projevů pacientek s Fabryho chorobou a X-vázanou agamaglobulinémií. Výsledky ukazují, že stav XCI stanovený v krvi a bukalních stěrech neodpovídá fenotypovému postižení pacientek. U Fabryho choroby je zřejmě podstatnějším faktorem typ mutace a věk pacientky, u X-vázané agamaglobulinémie je výsledek stavu XCI v krvi ovlivněn sekundární X-inaktivací.

Klíčová slova:

Inaktivace chromozomu X, Fabryho choroba, X-vázaná agamaglobulinémie, methyl-senzitivní restrikční analýza, masivně paralelní sekvenování

Abstract

In comparison to men, the number of X-linked genes is doubled in women as they have two chromosomes X while men are hemizygotes for X-linked genes. This imbalance is compensated by X inactivation (XCI) process, also known as primary X-inactivation, occurring in the early stage of embryogenesis. X inactivation is a random process and females are mosaics of two cell populations. The ratio of expressed alleles in women can be random (50:50) or skewed ($\geq 80:20$). The skewed X inactivation may occur due to selection when one of the alleles is preferentially inactivated (secondary X inactivation).

In this study XCI status in heterozygous females with various severity of phenotypic symptoms and traits in selected X linked inherited metabolic diseases is analysed, with the focus being Fabry disease - the deficiency of the enzyme alpha-galactosidase A encoded by GLA gene. Moreover, XCI in one family with X linked agammaglobulinemia is examined.

Mutant alleles and XCI status based on various loci, different methodical approaches and different tissues is subjected to examination. For the first time, the direct analysis of GLA gene transcript to detect the allele ratio was used alongside with the single-nucleotide polymorphisms in the IDS and LAMP genes for allele-specific expression (ASE) and the AR, RP2 and CNKSR2 loci for methyl-sensitive restriction analysis (MSRA). RNA samples for ASE methods were isolated from blood and DNA samples for MSRA were isolated from blood and buccal swabs. The reliability of probes according to the direct analysis of GLA gene transcript was tested and the tissue specificity in blood and buccal swabs was observed.

The high degree of correlation was detected between the probes. The study of tissue specificity revealed skewed X inactivation ratio (XIR) in 25 % of patients in blood samples while the buccal swab samples showed only one skewed XIR. There was a concordance detected between the activity of enzyme alpha-galactosidase A and the results of relative expression of GLA gene.

The results of ASE and MSRA methods were compared to the clinical manifestations severity of Fabry disease and X-linked agammaglobulinemia. The XIR in blood and buccal swabs did not correspond to the phenotypic affection of patients. The more significant factor in Fabry disease are probably the type of mutation and patient's age. The XIR in X linked agammaglobulinemia is affected by secondary XCI.

Keywords:

Chromosome X inactivation, Fabry disease, X-linked agammaglobulinemia, methylation-sensitive restriction analysis, massive parallel sequencing

Obsah

1	Úvod.....	11
2	Přehled literatury.....	12
2.1	Determinace pohlaví	12
2.1.1	Genotypické určení pohlaví.....	12
2.1.2	Environmentální faktory ovlivňující pohlaví.....	13
2.2	Inaktivace chromosomu X	13
2.2.1	X inaktivační centrum.....	14
2.2.2	DNA methylace	15
2.2.3	Nevyvážený stav X inaktivace.....	15
2.2.4	Geny unikající X inaktivaci	16
2.3	X-vázaná dědičná onemocnění	17
2.3.1	Fabryho choroba	18
2.3.2	X-vázaná agamaglobulinémie.....	22
2.4	Masivně paralelní sekvenování	23
2.4.1	Přímá analýza genu <i>GLA</i>	23
2.4.2	Nepřímá analýza polymorfismů v genech <i>IDS</i> a <i>LAMP2</i>	23
2.5	Methyl-senzitivní restriční analýza	24
2.5.1	Androgenní receptor	24
2.5.2	Sondy RP2 a CNKSR2	25
3	Hypotézy a cíle	27
4	Materiál a metody	28
4.1	Soubor vyšetřovaných osob	28
4.2	Izolace DNA z nativní krve a bukalního stěru	28
4.3	Izolace RNA a reverzní transkripce	28

4.4	Masivně paralelní sekvenování	28
4.4.1	Informativnost pomocí Sangerova sekvenování	29
4.4.2	Masivně paralelní sekvenování na přístroji Illumina	29
4.4.3	Vyhodnocení výsledků paralelního sekvenování	29
4.5	Methyl-senzitivní restriční analýza	29
4.5.1	Použité reagensie MSRA	30
4.5.2	Laboratorní postupy MSRA	31
4.5.3	Vyhodnocení výsledků MSRA	35
5	Výsledky	36
5.1	Analýza exprese mutantních alel	36
5.1.1	Informativnost metod založených na masivně paralelním sekvenování	37
5.1.2	Výsledky přímé a nepřímé analýzy transkriptu	38
5.1.3	Korelace mutace <i>GLA</i> s nepřímou analýzou polymorfismů	41
5.1.4	Korelace enzymové aktivity α -gal A a transkriptu genu <i>GLA</i>	42
5.2	Studium stavu X inaktivace pomocí methyl-senzitivních restričních metod	43
5.2.1	Hodnocení methyl-senzitivních restričních metod	43
5.2.2	Informativnost použitých sond	48
5.2.3	Určení mutovaných alel	49
5.2.4	Stanovení X inaktivace pomocí methyl-senzitivních restričních analýz	50
5.2.5	Zaměnitelnost sond pro MSRA	52
5.2.6	Tkáňová specifita	54
5.3	Korelace stavu XCI určené relativní kvantifikací transkriptu a MSRA	56
5.4	Závislost fenotypových příznaků FD na nevyvážené XCI	58
5.5	Studium XCI u rodiny s X-vázanou agamaglobulinémií	59
6	Diskuze	63

7	Závěr	69
8	Seznam zkratek	70
9	Seznam literatury	72
10	Přílohy.....	84

1 Úvod

X inaktivace (XCI) je epigenetická modifikace vedoucí k umlčení jednoho ze dvou chromosomů X, čímž je docíleno vyrovnání genové dávky chromosomu X mezi muži a ženami. Rovnoměrný nebo naopak nevyvážený poměr exprimovaných alel může být jedním z faktorů ovlivňujících fenotypové projevy žen – heterozygotek pro X-vázaná onemocnění.

Předkládaná práce se zabývá studiem stavu XCI u pacientek s Fabryho chorobou a X-vázanou agamaglobulinémií.

Vzhledem k tomu, že pro pacienty s Fabryho chorobou existuje léčba - enzymová terapie, která je ale velmi nákladná a pacienty zatěžující, je snaha najít marker, který by predikoval míru postižení a sloužil jako kritérium při rozhodování o aplikaci léčby. U žen – heterozygotek pro X- vázaná onemocnění se nabízí, že takovým markerem by mohl být stav X-inaktivace.

Předkládaná práce porovnává výsledky analýz založených na relativní kvantifikaci transkriptu s výsledky methyl-senzitivních restričních metod a sleduje vztah mezi mírou exprese mutantní alely, XCI a fenotypovými příznaky pacientek.

2 Přehled literatury

2.1 Determinace pohlaví

Biparentální pohlavní rozmnožování je běžný způsob reprodukce u vyšších organismů. Tento druh reprodukce nacházíme u gonochoristů a dvoudomých rostlin a řas (Sander van Doorn, 2014). Samci a samice vykazují pohlavní dimorfismus, tedy značné fenotypové i fyziologické rozdíly. Odlišnosti nalézáme i v karyotypech obou pohlaví. Genomy obou pohlaví jsou téměř totožné, výjimku tvoří pohlavní chromosomy (Kramer et al., 2016; Wei and Barbash, 2015).

Determinace pohlaví u obratlovců může být ovlivněna genotypem jedince (genotypické určení pohlaví) nebo environmentálními faktory, například teplotou (na teplotě závislé určení pohlaví). Genotypickou determinaci pohlaví nalézáme u savců, ptáků a obojživelníků, na teplotě závislá determinace pohlaví se objevuje u některých ryb a plazů (Sabath et al., 2016).

2.1.1 Genotypové určení pohlaví

Karyotypy mnoha organismů obsahují vedle autozomů i pár pohlavních chromosomů (gonozomů). Na pohlavních chromozomech nalezneme geny, které jsou zodpovědné za pohlavní determinaci a diferenciaci. Existují dva hlavní systémy determinace pohlaví: systém ZZ/ZW a systém XY/XX. Samičí heterogametie je systém, kde samice mají dva odlišné chromosomy Z a W, samci jsou homogametické pohlaví ZZ. U samčí heterogametie obsahuje samčí karyotyp dva různé chromosomy X a Y, samice mají dvě kopie chromosomu X (Lucchesi and Kuroda, 2015; Muyle et al., 2017).

U člověka nacházíme systém určení pohlaví XX/XY. Přestože se pohlavní chromosomy během evoluce savců vyvinuly z páru autozomů, dramaticky se od sebe liší ve své morfologii a v počtu genů. Zatímco chromozom X obsahuje až 1000 genů, na chromozomu Y jich nalezneme jen pár desítek. Převážná většina genů na pohlavních chromozomech není přímo zapojena do determinace pohlaví, vývoj muže nebo ženy závisí na jediném hlavním pohlaví určujícím lokusu, *Sry* genu, který je lokalizován na chromosomu Y (Bachtrog et al., 2014). Gen *Sry* je aktivován v gonadálním primordiu u XY a iniciuje kaskádu molekulárních a morfologických událostí vedoucích k testikulární diferenciaci. V jeho nepřítomnosti dochází k diferenciaci ovaríí u gonád XX (Taketo, 2015).

2.1.2 Environmentální faktory ovlivňující pohlaví

Dalším faktorem ovlivňujícím determinaci pohlaví je teplota. V roce 1981 bylo na teplotě závislé určení pohlaví objeveno u Menidie kanadské (*Menidia menidia*), od té doby bylo zaznamenáno u více než 60 druhů ryb (Shen and Wang, 2014).

2.2 Inaktivace chromosomu X

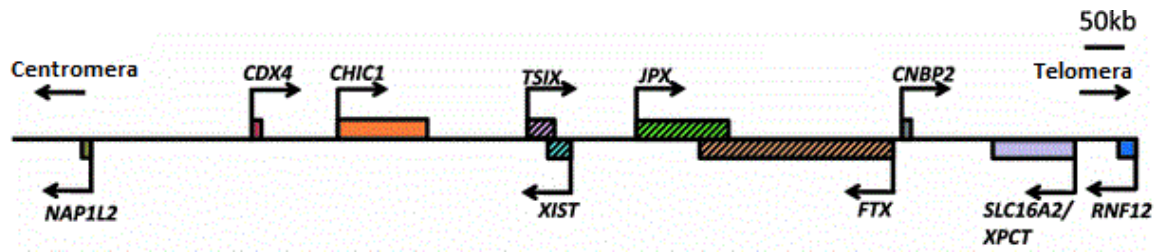
Jak bylo zmíněno výše, pohlavní chromosomy X a Y se vzájemně značně liší v obsahu genů. Během evoluce se vyvinuly mechanismy, které kompenzují dávku exprimovaných genů mezi samčími a samičími pohlavními chromosomy (Escamilla-Del-Arenal et al., 2011). Samice savců jsou mozaiky 2 populací somatických buněk, které exprimují geny z maternální nebo paternální alely chromosomu X (Calaway et al., 2013).

V roce 1961, Mary Lyon formulovala hypotézu o X inaktivaci. Tato hypotéza je založena na faktu, že myši s genotypem X0 jsou životaschopné (Lyon, 1961) a že samičí buňky obsahují heteropyknotické chromosomy X (Ohno and Hauschka, 1960). Mary Lyon interpretovala pestré barvy srsti myši jako důsledek klonálního růstu buněk s náhodným umlčením jednoho chromosomu X a předpověděla, že by tato hypotéza X inaktivace mohla být aplikována i na lidské buňky (Disteche and Berletch, 2015; Lyon, 1962).

Inaktivace chromosomu X je mechanismus genové regulace a transkripčního umlčování většiny genů na chromosomu X během samičí embryogeneze u savců. Tento proces slouží ke kompenzaci genové dávky mezi samicemi (XX) a samci (XY) (Bailey et al., 2000). U samic savců je transkripčně umlčován jeden ze dvou chromosomů X (Ercan, 2015). Další živočichové využívají odlišné strategie kompenzace genové dávky. U samců *Drosophily melangoster* je transkripce genů z chromosomu X dvakrát zvýšená, aby byla vyrovnána genová dávka. U *Caenorhabditis elegans* jsou reprimovaná exprese genů o polovinu u obou chromosomů X hermafroditů (XX), čímž se vyrovná transkripční úroveň u X0 samců (Gelbart and Kuroda, 2009; Kramer et al., 2015).

2.2.1 X inaktivační centrum

Genetické elementy zapojující se v regulaci XCI byly předmětem studií po několik desetiletí. Na chromozomu X byla identifikována oblast potřebná pro XCI. U člověka je tato oblast označována jako XIC (X-inaktivační centrum), které je mapováno jako 680 – 1200 kb dlouhá oblast na Xq13 (Leppig et al., 1993; de Hoon et al., 2017). Oblast XIC je relativně GC chudá, obsahuje repetitivní sekvence (převážně LINE a SINE) a velmi malé procento protein kódujících genů (Chureau et al., 2002).



Obr. 1 Schéma X inaktivačního centra u člověka (Upraveno podle: Yang et al., 2010).

Nejprominentnějším nekódujícím genem nacházejícím se v tomto regionu na lidském chromozomu X je gen *XIST* (Brown et al., 1991). *XIST* je exprimován výhradně z budoucího inaktivního chromosomu X a jeho transkript je dlouhý 17 kb (Brown et al., 1992). *XIST* RNA obaluje inaktivní chromosom X *in cis* (Clemson et al., 1996) a spouští kaskádu událostí, které synergicky produkují transkripčně inaktivovaný stav (Clemson et al., 1998).

U myši byl objeven gen *Tsix*, jehož transkript vykazuje antisense homologii k myšimu genu *Xist* (Lee et al., 1999). Transkript *Tsix* je asociován s aktivním chromozomem X a pravděpodobně se jedná o maternálně exprimovaný faktor, který chrání maternální chromosom X před imprintovanou inaktivací (Lee, 2000; Sado et al., 2001). Lidský ortholog *TSIX* vykazuje jen částečnou antisense homologii s genem *XIST* (Migeon et al., 2001; Chow et al., 2003).

Gen *RNF12* kóduje E3 ubikvitin ligázu (Bach et al., 1999) a pravděpodobně působí jako aktivátor *XIST in trans* během procesu XCI (Jonkers et al., 2009; Barakat et al., 2011).

Přesné molekulární mechanismy skrývající se za XCI stále nejsou úplně vyjasněny, ale zahrnují několik kroků včetně determinace počtu chromosomů X v buňce, výběr maternálního nebo paternálního chromosomu X pro následnou inaktivaci a iniciace samotného inaktivačního procesu (Chen and Prchal, 2007).

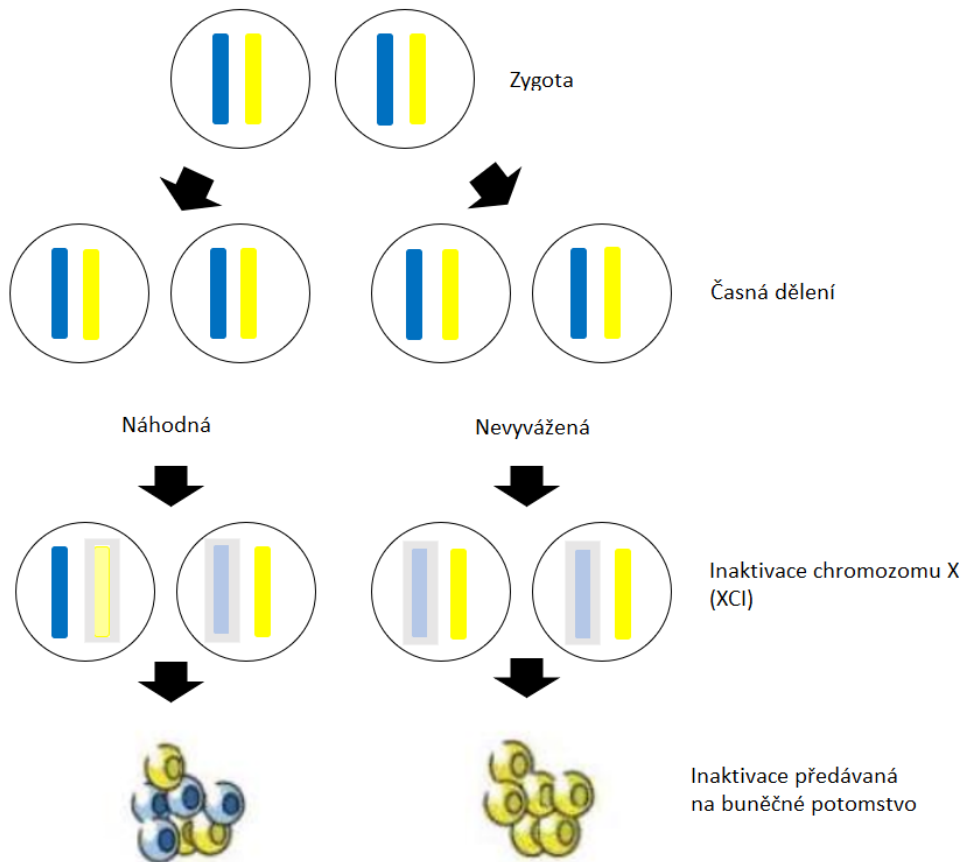
2.2.2 DNA methylace

DNA methylace je jednou z nejlépe charakterizovaných epigenetických modifikací. U savců je DNA methylace součástí mnoha biologických procesů včetně umlčování transpozonů, regulace genové exprese, genomického imprintingu a inaktivace chromozomu X (Li and Zhang, 2014). Je známo, že DNA methylace řídí transkripční aktivitu různým způsobem v závislosti na genomické lokaci methylace (Hall et al., 2014). V somatických buňkách člověka nalézáme DNA methylaci téměř výhradně v místech CG dinukleotidů (Lister et al., 2013), které jsou v různé míře zastoupeny v lidském genomu. Nejvíce zastoupeny jsou v promotorových oblastech 60 % genů, tyto regiony jsou známy jako CpG ostrovy (Bird, 1980). Obecně se předpokládá, že DNA methylace v promotorech genů může být zdrojem genového umlčování (Hall et al., 2014) Jiná studie ukazuje, že ačkoliv je transkripční represe asociována s methylací v promotoru, snáze je jí dosahováno methylací prvního exonu (Brenet et al., 2011).

Epigenetická regulace se během vývoje může objevovat již během časně embryogeneze a řídí formování různých orgánových systémů. DNA methylace je udržována DNA methyltransferázou 1 (DNMT1) v mitóze a meióze a je považována za nejstabilnější epigenetickou modifikaci (Liu et al., 2010). Methylová skupina tvoří kovalentní vazbu na pátém uhlíku cytosinového prstence a vytváří tak 5-methylcytosin (Yamada et al., 2004). Methylace CpG ostrovů v promotorových oblastech je spolu se specifickou modifikací histonů a přítomností *XIST* charakteristickým rysem inaktivního X chromosomu.

2.2.3 Nevyvážený stav X inaktivace

Nenáhodnost X inaktivace může být způsobena primárními nebo sekundárními stochastickými či genetickými procesy. Primární XCI nastává vlivem náhody již během procesu X inaktivace (obr. 2). K sekundární XCI dochází vlivem selekce, kdy alely jednoho z chromosomů X poskytují buňkám selektivní výhodu (Morey and Avner, 2011).



Obr. 2 Mechanismus primární inaktivace chromozomu X u žen. Chromozomy X rodičovského původu jsou odlišeny barevně (žlutá, modrá), inaktivní chromozom X je znázorněn šedivým rámečkem (Upraveno podle: Chabchoub, 2013).

Nevyvážený stav X inaktivace může mít příznivé i nepříznivé důsledky pro heterozygotní ženy nesoucí mutaci pro X-vázané onemocnění. Je-li přednostně inaktivována mutovaná alela, může být nositelka X-vázané mutace chráněna před fenotypickými důsledky onemocnění. V opačném případě, kdy je přednostně inaktivována normální (divoká) alela, heterozygotní ženy přenášející mutaci mohou projevit příznaky onemocnění podobné postiženým mužům (Desai et al., 2011).

2.2.4 Geny unikající X inaktivaci

Při inaktivaci je transkripčně umlčováno ~1,500 genů lokalizovaných na lidském X chromosomu (Jäger et al., 2013). Nicméně ne všechny geny nacházející se na inaktivovaném X chromosomu jsou kompletně umlčovány. Až 15 % lidských genů uniká inaktivaci a podíl genů, které inaktivaci unikly, se může lišit mezi různými regiony chromosomu X (Carrel and

Willard, 2005; Fieremans et al., 2016). Oproti člověku, u myši uniká X inaktivaci pouze 3 % genů (Yang et al., 2010).

Geny unikající inaktivaci mohou být exprimovány jak z aktivní alely (X_a), tak z alely inaktivní (X_i) (Carrel and Willard, 1999). Většina genů unikajících XCI je lokalizována na krátkém raménku chromozomu X, pravděpodobně proto, že se tato oblast evolučně odlišila od chromozomu Y poměrně nedávno (Carrel and Willard, 2005). Další hypotézou je, že geny lokalizované na X_p unikají XCI častěji, protože jsou více vzdáleny od X-inaktivačního centra, které se nachází na X_q (Zhang et al., 2013). Řada genů unikajících X inaktivaci je lokalizována v pseudoautosomální oblasti (PAR), která obsahuje geny přítomné i na chromozomu Y. (Disteche, 1997).

U savců nalézáme odlišnosti v XCI mezi jednotlivci nebo mezi tkáněmi, ale tato variabilita ovlivňuje jen malý počet genů (Anderson and Brown, 1999; Berletch et al., 2011). U člověka tuto variabilitu vykazuje asi 10 % X-vázaných genů (Carrel and Willard, 2005), v jiné studii byla variabilita detekována u 6-17 % X-vázaných genů (Zhang et al., 2013). Exprese X- vázaných genů se může měnit v průběhu vývoje nebo dospělosti (Schoeftner et al., 2009).

2.3 X-vázaná dědičná onemocnění

V současné době bylo identifikováno více než 100 X-vázaných onemocnění u člověka (Germain, 2006). Termíny X-vázaná dominantní a recesivní dědičnost byly popsány Morganem před více než 100 lety (Morgan, 1915). Dobyns et al. ve své práci poukazuje na fakt, že u člověka, na rozdíl od *Drosophily*, není možné jednoznačně odlišit X-vázané dominantní a recesivní znaky a navrhuje používání termínu X-vázaná onemocnění (Dobyns et al., 2004).

Muži jsou pro X-vázané geny hemizygoti, u většiny onemocnění je penetrance X-vázaných chorob u nich téměř 100 %. Manifestace fenotypových příznaků X-vázaných chorob u žen se různí v závislosti na daném onemocnění a svou roli zde hraje X inaktivace (lyonizace). U žen mohou být projevy těchto mutací tlumeny náhodnou XCI, která vede k expresi normální alely v buněčných populacích, nebo dokonce potlačeny nevyváženou XCI ve prospěch normální alely (Dobyns et al., 2004; Deng et al., 2014).

2.3.1 Fabryho choroba

Fabryho choroba (OMIM 301500, Fabry disease, FD), též známá jako Anderson-Fabryho nemoc, je vzácná X-vázaná porucha metabolismu glykosfingolipidů (Schiffmann, 2015). Toto onemocnění je způsobeno deficitem lysozomálního enzymu α -galaktodidázy A (EC 3.2.1.22; α -gal A) (Gibas et al., 2006). Enzym α -gal A je kódován genem *GLA*, který je lokalizován na Xq22.1 (Topaloglu et al., 1999). α -gal A hydrolyzuje terminální α -galaktosyl části z glykolipidů a glykoproteinů. Insuficience enzymu α -gal A vede k akumulaci substrátů, převážně globotriaosylceramidu (Gb3) v buňkách vaskulárního endotelu, v různých typech renálních buněk, v epiteliálních buňkách a buňkách hladké svaloviny kardiovaskulárního a renálního systému (Eng et al., 2006; Mauer et al., 2014).

Fabryho choroba se může projevit v jakémkoliv věku, u mužů se příznaky objevují obvykle dříve než u žen (Ries et al., 2005). U mužů s FD je medián dožití 50-55 let, u žen 70 let (Branton et al., 2002; Vedder et al., 2007a). Penetrance FD u mužů je 100 % a u žen 70 % (Dobyns et al., 2004).

Onemocnění se dělí na závažnější klasický fenotyp a obecně méně závažný atypický fenotyp s pozdějším nástupem. Klasická varianta FD je popisována jako multiorgánové onemocnění, postihuje zejména nervový systém, srdce a ledviny (Tuttolomondo et al., 2013; Arends et al., 2017). Netytická varianta FD je charakterizována variabilnějším průběhem onemocnění, při kterém jsou pacienti obvykle méně postiženi a manifestace choroby je limitována na jeden orgán (Smid et al., 2015).

Klasická varianta

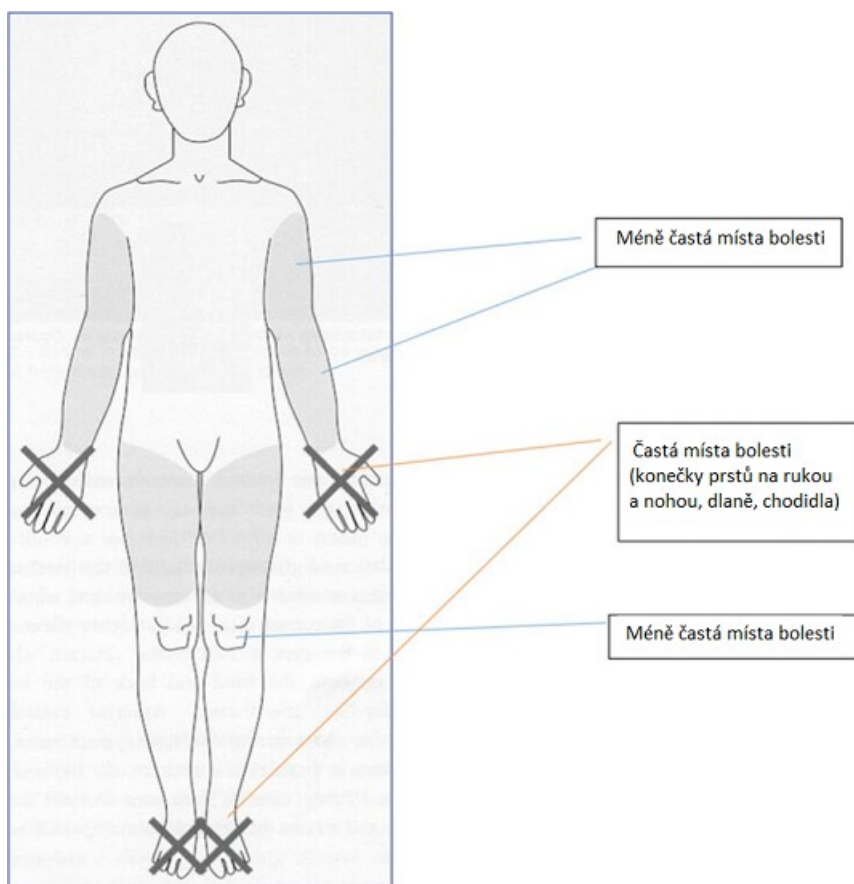
Fabryho choroba je komplexní multisystémové onemocnění s nesespecifickými symptomy a znaky (Schiffmann et al., 2017). Symptomy klasické varianty FD jsou popsány v tab. 1. U hemizygotních mužů se onemocnění může projevit v dětství nebo v průběhu dospívání. Mezi znaky klasické varianty FD patří neuropatická bolest, hypohidróza, anhidróza, angioteratomy, cornea verticillata a mikroalbuminurie. V pozdějším věku se může objevit progresivní renální onemocnění, hypertrofická kardiomyopatie a cerebrovaskulární onemocnění (mrtvice). Heterozygotní ženy mohou být postiženy stejně jako muži, obecně však vykazují mnohem variabilnější fenotyp (MacDermot et al., 2001a, 2001b).

Tab. 1 Časné symptomy klasické formy Fabryho choroby (*Upraveno podle: Burlina et al., 2011*).

Orgánový systém	Znak/Symptom
Obecné	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Snížená kvalita života, snížené výkony v práci, ve škole a při volnočasových aktivitách (včetně sportu) ▪ Psychosociální poruchy a poruchy chování ▪ Slabé přibírání na váze
Nervový systém	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Chronická pálivá bolest ▪ Ataky nesnesitelné bolesti ▪ Parestézie, dysestézie ▪ Ztráta senzoričkových funkcí ▪ Hypohidróza, anhidróza ▪ Křeče v abdominu, průjem, nadýmání, nevolnost ▪ Zvonění v uších, ztráta sluchu ▪ Závratě
Kůže	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cévní léze (angioteratomy)
Oči	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Korneální a lentikulární opacity ▪ Cévní křehkost (sítnice, spojivky)
Ledviny	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mikroalbuminurie, proteinurie ▪ Zvýšené vylučování Gb3 močí ▪ Renální hyperfiltrace (časné), snížená rychlost glomerulární filtrace
Srdce	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Abnormality při EKG ▪ Arytmie, hypertrofické cardiomyopatie

Mezi časné příznaky FD patří neuropatická bolest, která postihuje 60 % mužů a 41 % žen (Eng et al., 2007; Hopkin et al., 2008). Nejčastější místa projevů bolesti jsou prsty na ruce a nohou, dlaně a chodidla (obr. 3). Bolest se však může projevit i v dalších oblastech jako jsou paže, ramena, nohy, klouby a zuby (Üçeyler et al., 2014). Bolest u pacientů s FD dosahuje nejvyššího stupně ve třetí a čtvrté dekádě života a následně klesá se zhoršující se senzoričkovou funkcí. Bolest

může být kontinuální nebo epizodická a je obvykle vyvolána změnou teploty okolí, namáhavým cvičením, nebo stresem (Zarate and Hopkin, 2008).



Obr. 3 Potenciální lokalizace projevů bolesti u pacientů s Fabryho chorobou. (Upraveno podle: Politei et al., 2016)

Muži trpící klasickou formou FD mají obvykle obličejové abnormality, mezi které patří silná periorbitální oblast, prominentní ušní lalůčky, husté obočí, ustupující čelo, velký cibulovitý nos a výrazný úhel nosu, prominentní nadočnicové oblouky a nosní můstek, mělké lícní kosti a plné rty (Ries et al., 2006).

Kardiální varianta

Kardiální varianta Fabryho choroby byla u českého pacienta poprvé popsána v roce 1990 (Elleder et al., 1990). Pacienti s touto formou FD mají obvykle reziduální aktivitu enzymu α -gal A (1-5 % fyziologické hodnoty). Příznaky se často objevují až později v průběhu života a choroba je manifestována jen srdečními projevy, zatímco funkce ostatních orgánů zůstává zachována (Elleder et al., 1990; Nakao et al., 1995) . Kardiální dysfunkce je způsobena akumulací glykosfingolipidů v myocytech a vodivé tkáni, avšak depozit Gb3 činí méně než 3 % hmotnosti myokardu. Pravděpodobněji je tedy onemocnění srdce důsledkem aktivace jiných signalizačních cest vedoucích k hypertrofii, apoptóze, nekróze a fibróze (Linhart et al., 2000; Kampmann et al., 2008). Mezi příznaky kardiální varianty patří hypertrofie levé komory a poruchy srdečního rytmu, u některých pacientů se objevila i proteinurie, avšak nedocházelo ke konečnému stádiu renálního selhání jako u klasické varianty FD (Nakao et al., 1995; Linhart and Elliott, 2007).

Renální varianta

Další formou FD je renální varianta, u které se fenotypové příznaky nemoci projevují především v ledvinách a současně nedochází k manifestaci dalších příznaků typických pro klasickou variantu choroby, jako je neuropatická bolest, angioteratomy nebo hypohidróza (Desnick et al., 2002; Nakao et al., 2003). K selhání ledvin nejčastěji dochází u mužů před čtvrtou dekadou života (MacDermot et al., 2001b). Špatná renální prognóza je pozorována u některých heterozygotních žen (MacDermot et al., 2001a). Gb3 se postupně hromadí v lysozomech renálních buněk, což vede k mikrovaskulární dysfunkci, okluzi a ischemii s následným vývojem tubulární atrofie, segmentální a globální sklerózy a intersticiální fibrózy (Fogo et al., 2010; Warnock et al., 2010).

Laboratorní diagnostika FD

V případě, že klinické příznaky pacienta vedou k podezření na FD, provádí se laboratorní diagnostika na úrovni metabolitu (LysoGB3), enzymu (stanovení aktivity α -Gal A) a genetického vyšetření (mutační analýza genu *GLA*) (Desnick et al., 2014; Duro et al., 2018). U pacientů s Fabryho chorobou bylo zaznamenáno více než 800 mutací (Bird et al., 2017). Mezi mutace působící klasický fenotyp FD patří missense a nonsense mutace, velké a malé inzerce

nebo delece a chyby sestřihu. Srdeční forma FD je asociovaná se specifickými mutacemi typu missense nebo sestřihovými mutacemi (Ishii et al., 2002; Nakao et al., 2003).

Léčba

Pro enzymovou substituční terapii (ERT) byly vyvinuty dvě lidské rekombinantní α -galaktosidázy (Desnick et al., 2003). Agalsidáza beta (Fabrazyme; Genzyme Therapeutics, Cambridge, MA) je produkována klasickou transdukcí ovariálních buněk křečičků čínských s lidskou α -gal A cDNA (Eng et al., 2001). Fabrazyme je dodáván jako lyofilizovaný prášek ve 35 mg zkumavkách, který je ředěn v diluentu těsně před samotnou infuzí, dávkování je 1 mg/kg každé 2 týdny (Lee, 2003). Agalsidáza alfa (Replagal; Transkaryotic Therapies, Cambridge, Massachusetts, USA) je produkována s využitím lidských kožních fibroblastů s aktivovaným promotorem genu α -gal A (Schiffmann et al., 2000). Replagal je dodáván jako tekutý přípravek s koncentrací 1 mg/ml, který je před infuzí ředěn na koncentraci 0,2 mg/ml každé 2 týdny (Lee, 2003). Léčba pomocí rekombinantní α -gal A je velice drahá, roční náklady obou léčiv se rovnají přibližně 210 000 euro pro 70 kg pacienta (Vedder et al., 2007b).

2.3.2 X-vázaná agamaglobulinémie

X-vázaná agamaglobulinémie (OMIM 300300), poprvé popsána Ogdenem Brutonem v roce 1952, je X-vázané recesivní onemocnění charakterizované nízkým počtem B-buněk v periferní krvi (Vu et al., 2014). Toto onemocnění je způsobeno mutací v genu *BTK* (Brutonova tyrosinkináza). Gen *BTK* je lokalizován na Xq22.1, obsahuje 19 exonů na délce 37,5 kb (Zheng et al., 2014).

V současné době bylo detekováno více než 1000 mutací genu *BTK*, které jsou spojeny s X- vázanou agamaglobulinémií (XLA) (Lee et al., 2016). Tyto mutace způsobí, že se v kostní dřeni prekurzory B-buněk nevyvíjejí do zralých B-lymfocytů, tudíž pacienti s XLA mají nízkou hladinu B-lymfocytů v periferní krvi a výrazně snížené množství všech typů imunoglobulinu v séru. Incidence XLA je přibližně 1:250 000 (Ponader and Burger, 2014).

Klinická kritéria, která jsou dostatečná pro pravděpodobnou diagnózu XLA, zahrnují muže s méně než 2 % CD19+ B-buněk v periferní krvi, u kterých byly vyloučeny jiné příčiny hypogamaglobulinémie a současně mají alespoň jeden s následujícími příznaky: nástup

opakujících se bakteriálních infekcí během prvních 5 let života, sérové hladiny IgG, IgM a IgA nižší o více než 2 SD, než je normální pro jejich věk a slabou odpověď na vakcíny (Segundo et al., 2018).

Definitivní diagnóza XLA zahrnuje molekulárně genetickou analýzu, která potvrdí mutaci v genu *BTK*. Mezi další metody, které potvrdí tuto diagnózu, patří analýza exprese proteinu BTK v monocytech a krevních destičkách nebo absence mRNA BTK v neutrofilech a monocytech zjištěná pomocí Northern blotu (Lim et al., 2013). Současná léčba XLA je paliativní a zahrnuje imunoglobulinovou substituční terapii a antibiotika (Pérez de Diego et al., 2008).

2.4 Masivně paralelní sekvenování

Technologie next-generation sequencing (NGS) umožňuje sekvenování milionů individuálních řetězců DNA ve směsi DNA. Současné NGS platformy produkují kratší sekvence než je tomu u Sangerova sekvenování, množství kopií těchto sekvencí je však mnohonásobně vyšší, což zvyšuje komplexitu těchto metod (Treangen and Salzberg, 2011). Vývoj a vylepšení platform pro NGS umožňují vysokou propustnost těchto metod a nízké náklady na analýzu, což značně usnadňuje genetické a genomové výzkumy (Zavodna et al., 2014).

V současné době se využívají dva základní přístupy – sekvenace fragmentované DNA obvykle následované vychytáváním cílových úseků (sequence capture) nebo sekvenace multiplexních amplikonů (Abdelkrim et al., 2009). V předkládané práci využíváme pro vyšetření poměrného zastoupení alel sekvenování amplikonů.

2.4.1 Přímá analýza genu *GLA*

Přímá analýza relativní kvantifikace transkriptu využívá mutace v genu *GLA* u heterozygotních pacientek k detekci poměru mutované vs normální alely. V případě, že nedochází k ovlivnění exprese jinými faktory, odráží hodnota toho poměru stav XCI.

2.4.2 Nepřímá analýza polymorfismů v genech *IDS* a *LAMP2*

Nepřímá analýza relativní kvantifikace transkriptu využívá jednonukleotidových polymorfismů (SNPs) v genech, které podléhají XCI (Mossner et al., 2013). Produkt RT-PCR obsahující SNP

je použit pro kvantifikaci frekvence SNP alel, která odpovídá poměru XCI (Řeboun et al., 2016). V této práci byly použity polymorfismy v genech *IDS* c.438C>T (rs1141608) a *LAMP2* c.156A>T (rs12097), které mají vysokou frekvenci v populaci (Cotton et al., 2013; The 1000 Genomes Project Consortium et al., 2015; Řeboun et al., 2016)

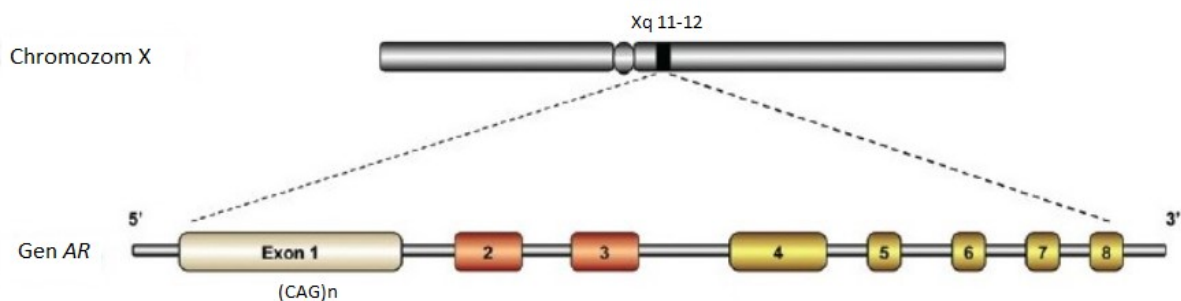
2.5 Methyl-senzitivní restriční analýza

U všech organismů nalézáme četné odlišnosti v jejich genomové DNA sekvenci. Analýza polymorfismů délky restričních fragmentů (RFLP) byla jednou z prvních technik široce využívaných k detekci variability na úrovni sekvence jaderné DNA (Haliem and Al-Huqail, 2013). RFLP markery byly poprvé použity pro genetické mapování v roce 1975 k identifikaci polymorfismů u teplotně-senzitivních mutantů adenovirových sérotypů (Sambrook et al., 1975). Pro mapování genomu člověka byla analýza RFLP použita v roce 1980 (Botstein et al., 1980). Analýza RFLP využívá restričních enzymů, endodeoxyribonukleáz, které rozeznávají specifickou nukleotidovou sekvenci v dsDNA a následně štěpí oba řetězce. Specifická restriční místa mohou být modifikována, nejčastěji methylací a v takovém případě ke štěpení restričním enzymem v tomto místě nedochází (Nathans and Smith, 1975).

Štěpením vznikají fragmenty DNA, jejich délka a počet se liší mezi jednotlivci a druhy. Dva jedinci stejného druhu mají téměř identické genomy, ale mohou se lišit v několika nukleotidech z důvodu bodových mutací, delecí, inzercí, inverzí, translokací a duplikací. Tyto odlišnosti v DNA sekvenci restričního místa mohou mít za následek vznik nového nebo naopak ztrátu či relokaci restričních míst (Semagn et al., 2006).

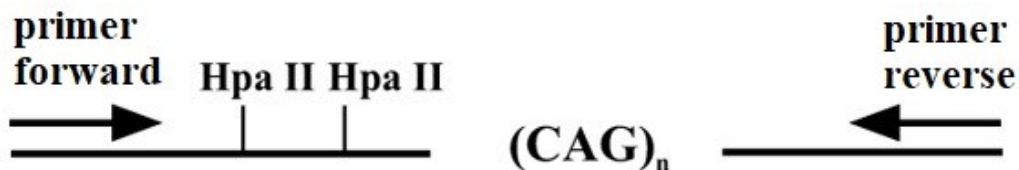
2.5.1 Androgenní receptor

Androgenní receptor (AR) patří do skupiny jaderných receptorů steroidních hormonů (Tan et al., 2015). Gen *AR* je lokalizován na Xq11-Xq12 (Lubahn et al., 1988). Protein-kódující region obsahuje 2757 nukleotidů a zahrnuje 8 exonů (obr. 4).



Obr. 4 Schéma genu *AR* (Upraveno podle: Lonergan and Tindall, 2011).

Analýza lidského androgenního receptoru (human androgen receptor assay, HUMARA) využívá vysoce polymorfní trinukleotidové repetice v kódující oblasti prvního exonu genu *AR*. Repetice $(CAG)_n$ je úzce spojena s methylačními místy, která jsou základem pro studium inaktivace chromozomu X (obr. 5). Methylační místa jsou nemethylovaná na aktivním chromozomu X a methylovaná na neaktivním X chromozomu (Busque et al., 1994). Metoda HUMARA využívá methyl-senzitivní nukleázy ke štěpení nemethylované (aktivní) alely (Allen et al., 1992).



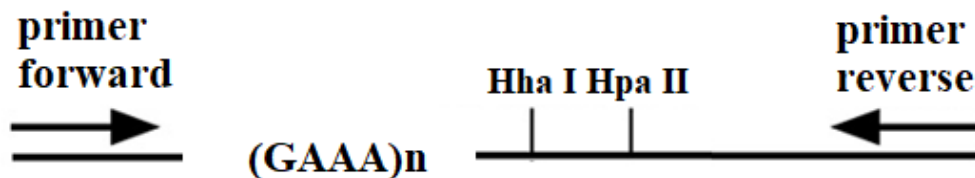
Obr. 5 Schéma prvního exonu genu *AR* – repetice CAG ohraničená Hpa II restrikčními místy a relativní pozice forward a reverse primerů pro PCR (Upraveno podle: Chitnis et al., 2000).

Podle literatury je metoda HUMARA je informativní pro ~ 85 % žen, (Machado et al., 2014).

2.5.2 Sondy RP2 a CNKSR2

Retinitis pigmentosa (RP) je skupina dědičných retinálních degenerativních onemocnění charakterizovaných progresivní ztrátou fotoreceptorové funkce (Liu et al., 2017). Gen pro X- vázanou formu retinitis pigmentosa *RP2* je lokalizován na Xp11.3 a stav methylace CpG

v jeho promotorové oblasti koreluje s XCI (Machado et al., 2014). Gen se skládá z 5 exonů, (Schwahn et al., 1998) a v jeho promotorové oblasti se nachází polymorfní tetranukleotidová repetice a restrikční místa enzymů Hha I a Hpa II (obr. 6). S využitím vhodných primerů lze tuto oblast použít jako sondu ke stanovení stavu XCI u heterozygotních žen tohoto lokusu (Machado et al., 2014).



Obr. 6 Schéma extragenové oblasti genu *RP2* - tandemové repetice GAAA ohraničená Hha I a Hpa II restrikčními místy a relativní pozice forward a reverse primerů pro PCR (Upraveno podle: Machado et al., 2014).

Lidský CNK2 protein je multidoménový adaptorový protein stimulující MAPK (mitogen-activated protein kinase) signalizaci (Roy et al., 2002). Gen *CNKSR2* je ve vysoké míře exprimován v mozku a mutace v tomto genu vedou často k intelektuálnímu postižení (Houge et al., 2012).

Gen *CNKSR2* obsahuje v 5'oblasti trinukleotidové repetice (GCA)_n a restrikční místa enzymů HpaII a RsaI. V roce 2015 byl použit jako sonda methyl-senzitivní restrikční analýzy. Korelační koeficient výsledků s metodou HUMARA činil 0,87 (Musalkova et al., 2015). Stanovení poměru XCI pomocí methyl-senzitivní restrikční analýzy (MSRA) v lokusu *CNKSR2* bylo následně použito i v dalších studiích (Řeboun et al., 2016; Musalkova et al., 2018).

3 Hypotézy a cíle

Hypotézy

- X-inaktivace ovlivňuje tíži fenotypových příznaků u pacientek s X-vázanými onemocněními.
- X-inaktivace měřená v periferních tkáních odráží stav X-inaktivace v orgánech spojených s manifestací onemocnění.
- Výsledky stanovení X-inaktivace lze použít jako marker pro predikci onemocnění.

Cílem této práce je zjistit, zda výsledky stanovení X inaktivace korelují s tíží postižení pacientek s Fabryho chorobou a X-vázanou agamaglobulinémií. K tomuto účelu je důležité zjistit, jak spolehlivé jsou nepřímé sondy (analýza transkriptu na dvou polymorfních lokusech a MSRA) a jaký má přínos přímá analýza transkriptu.

Mezi dílčí cíle této práce patří:

- analyzovat transkript v místě heterozygotní mutace genu *GLA* pomocí masivně paralelního sekvenování,
- analyzovat transkript v místech vysoce polymorfních SNP genů *IDS* (c.438C>T) a *LAMP2* (c.156A>T) pomocí masivně paralelního sekvenování,
- identifikovat mutované alely z výsledků nepřímé analýzy transkriptu porovnáním s výsledky přímé analýzy,
- provést vyšetření stavu XCI pomocí methyl-senzitivních restrikčních metod v lokusech *AR*, *RP2* a *CNKSR2*,
- identifikovat mutované alely z výsledků MSRA porovnáním s alelami probandů,
- zhodnotit zaměnitelnost použitých sond pro stanovení XCI,
- zhodnotit souvislost fenotypových příznaků studovaných X vázaných onemocnění s nevyváženým stavem XCI a použití získaných dat jako vhodných biomarkerů pro vysvětlení fenotypových projevů a predikce dalšího vývoje studovaných onemocnění.

4 Materiál a metody

4.1 Soubor vyšetřovaných osob

Pro studium stavu inaktivace X chromosomu jsme použili biologický materiál 34 pacientek s diagnostikovanou Fabryho chorobou pocházejících z 25 nepříbuzných rodin. Dále jsme vyšetřovali X inaktivaci u 5 pacientek z jedné rodiny s X vázané agamaglobulinémie

K identifikaci mutantních alel u nepřímých analýz jsme použili vzorky mužských pacientů s FD nebo XLA. U methyl-senzitivních restrikčních analýz byly použity vzorky DNA nepříbuzných mužských kontrol. Od všech pacientů nebo jejich zákonných zástupců a kontro byl získán informovaný souhlas.

4.2 Izolace DNA z nativní krve a bukalního stěru

DNA byla z biologických materiálů izolována kolonkovou metodou použitím sady QIAamp DNA Blood Mini Kit od firmy QIAGEN. Takto izolovaná DNA byla použita pro methyl-senzitivní restrikční analýzy a stanovení informovanosti heterozygotních žen pomocí Sangerova sekvenování.

4.3 Izolace RNA a reverzní transkripce

Pro studium transkriptu v místě heterozygotní mutace v genu *GLA* a polymorfismech *IDS* a *LAMP2* bylo nutné izolovat celkovou RNA pomocí sady BiOstic Blood Total RNA Isolation Kit od firmy MO BIO Laboratories, Inc. Následně byla provedena reverzní transkripce RNA do cDNA pomocí sady High Capacity RNA-to-cDNA Kit od firmy Applied Biosystems.

4.4 Masivně paralelní sekvenování

Pomocí masivně paralelního sekvenování (MPS) jsme studovali nevyvážený poměr XCI kvantifikací transkriptu v místě heterozygotní mutace. Analýzou mutace v genu *GLA* a v polymorfismech genů *IDS* a *LAMP2* jsme získali poměr alel.

4.4.1 Informativnost pomocí Sangerova sekvenování

Pro stanovení informovanosti byla využita DNA pacientek izolovaná kolonkovou metodou použitím sady QIAamp DNA Blood Mini Kit od firmy QIAGEN. Izolovaná DNA byla nejprve amplifikována pomocí PCR a výsledný produkt byl sekvenován metodou podle Sangera na přístroji 3500XL Gene Analyzer od firmy Applied Biosystems.

4.4.2 Masivně paralelní sekvenování na přístroji Illumina

Vzorky primárně ověřené Sangerovým sekvenováním byly použity pro masivně paralelní sekvenování. Nejprve byla izolována celková RNA pomocí izolačního kitu BiOstic Blood Total RNA od firmy MO BIO Laboratories, Inc. K přepisu RNA do cDNA byla použita sada High Capacity RNA-to-cDNA od firmy Applied Biosystems. RT-PCR produkty obsahující polymorfnní místa v genech *IDS* a *LAMP2* a místa kauzálních mutací v genu *GLA* byly použity pro přípravu knihovny pomocí sady Illumina Nextera XT Library Prep Kit. K sekvenování na MiSeq sekvenátoru byla použita sada MiSeq Reagent Kit v2.

4.4.3 Vyhodnocení výsledků paralelního sekvenování

Data získaná metodou masivně paralelního sekvenování byla po bioinformatickém zpracování hodnocena pomocí softwaru Integrative Genomic Viewer (IGV). V místě mutace nebo polymorfismu byly sledovány počty čtení pro jednotlivé alely, výsledky pak byly převedeny do procentuální podoby.

4.5 Methyl-senzitivní restrikční analýza

Pomocí methyl-senzitivních restrikčních analýz (MSRA) jsme sledovali poměr X inaktivace v lokusech *AR*, *RP2* a *CNKSR2*.

4.5.1 Použité reagensie MSRA

Restrikční analýza

CutSmart Buffer, BioLabs

Restrikční enzym HpaII (10U), BioLabs

Restrikční enzym RsaI (10U), BioLabs

dH₂O

PCR

Plain PP Mastermix, Top-Bio

PCR Ultra H₂O, Top-Bio

Primery 10 pmol/μl

Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich

Tab. 2 Použité primery pro PCR

AR forward primer	Cy5-GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCAT
AR reverse primer	TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC
RP2 forward primer	PET-TGACATAGCGAGACCCTGTG
RP2 reverse primer	GTGGTGGGTTCTCTAGCTGG
CNKS2 forward primer	6-FAM-CGAGCGGGCAAGTTGGCTGA
CNKS2 reverse primer	TGTCGGGTCTCGCGGCTGTA

Horizontální gelová elektroforéza

Agaróza, Top-Bio

1x TBE pufr, Sigma-Aldrich

milliQ H₂O

6x DNA Loading Dye, Thermo Scientific

Marker Gene Ruller 100 bp, Applied Biosystems

10 000x Gel Green, Biotium

Fragmentační analýza

Formamid, Applied Biosystems

Gene Scan 500 ROX Size Standard, Applied Biosystems

4.5.2 Laboratorní postupy MSRA

Informativnost sond

Nejdříve bylo potřeba stanovit informativnost sond v jednotlivých lokusech.

1. Vyizolovanou DNA jsme krátce promíchali pomocí vortexu a centrifugovali ve stolní centrifuze.
2. V laminárním boxu jsme připravili směsi pro PCR podle tab. 3.

Tab. 3 Příprava směsi pro PCR v lokusech *AR*, *RP2* a *CNKSR2* (objemy pro 1 reakci)

	<i>AR</i>	<i>RP2</i>	<i>CNKSR2</i>
PPP Master mix bez barvy	7,9 µl	5,3 µl	7,8 µl
Forward primer	0,5 µl	0,3 µl	0,5 µl
Reverse primer	0,5 µl	0,3 µl	0,5 µl
H₂O	0,6 µl	3,6 µl	-
DMSO	-	-	0,7 µl
DNA	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl

3. K 9,5 µl PCR směsi jsme přidali 0,5 µl DNA.
4. Vzorky byli několik sekund vortexovány a krátce centrifugovány.
5. Připravené směsi s DNA byly vloženy do termocycleru. Podmínky pro PCR jsou v tabulkách 4 a 5.

Tab. 4 Podmínky pro PCR *AR* a *CNKSR2*.

Teplota	Čas
94 °C	2 min
94 °C	15 s
63 °C	20 s 30x
72 °C	30 s
72 °C	10 min

Tab. 5 Podmínky pro PCR *RP2*.

Teplota	Čas	
94 °C	5 min	
94 °C	30 s	
64 °C	30 s	30x
71 °C	30 s	

6. Výsledný PCR produkt byl ověřen pomocí elektroforézy (30 min, 120 V).
7. Po následné fragmentační analýze byl produkt hodnocen pomocí softwarového programu GeneMapper.

Výsledek byl považován za informativní, pokud se jednotlivé alely pro lokus *AR* a *CNKSR2* lišili alespoň o 2 trinukleotidové repetice a pro lokus *RP2* o alespoň 1 tetranukleotidovou repetici.

Restrikční analýza

U vzorků DNA informativních pro sondu *AR*, *RP2* nebo *CNKSR2* jsme provedli restrikční štěpení.

1. Změřili jsme koncentraci DNA na spektrofotometru BioSpec-nano od firmy Shimadzu.
2. Podle výsledné koncentrace jsme vzorky smíchali s destilovanou vodou tak, aby každý vzorek obsahoval 100 ng DNA v objemu 21,8 μ l pro lokusy *AR* a *CNKSR2* a v objemu 22 μ l pro lokus *RP2*.
3. Vzorky jsme zvortexovali a několik sekund centrifugovali ve stolní centrifuze.
4. Připravili jsme štěpící směsi podle tabulek 6 a 7. Vzorky pro restrikční analýzu jsme připravili v duplikátech – štěpený a neštěpený produkt. Ke směsi pufru, enzymu nebo vody jsme přidali DNA naředěnou v bodu 2.

Tab. 6 Příprava štěpící směsi pro lokusy *AR* a *CNKS2* (objemy pro jednu reakci)

	štěpený produkt	neštěpený produkt
CutSmart pufr	2,5 µl	2,5 µl
HpaII	0,5 µl	0 µl
RsaI	0,2 µl	0,2 µl
H₂O	0 µl	0,5 µl
DNA	21,8 µl	21,8 µl

Tab. 7 Příprava štěpící směsi pro lokus *RP2* (objemy pro jednu reakci)

	štěpený produkt	neštěpený produkt
CutSmart pufr	2,5 µl	2,5 µl
HpaII	0,5 µl	0 µl
H₂O	0 µl	0,5 µl
DNA	22 µl	22 µl

5. Vzorky jsme krátce centrifugovali a následně inkubovali v termocycleru přes noc při teplotě 37 °C.

PCR

Provedli jsme amplifikaci štěpených a neštěpených fragmentů DNA pomocí polymerázové řetězové reakce.

1. Vzorky po restriční analýze jsme nejprve 20 minut inaktivovali při teplotě 80 °C v termocycleru.
2. Po vyjmutí z termocycleru byly vzorky zvortexovány a krátce centrifugovány.
3. V laminárním boxu jsme připravili směsi pro PCR. Reagencie pro tyto směsi jsou v tabulkách 8, 9 a 10.

Tab. 8 Příprava směsi pro PCR AR (objemy pro jednu reakci)

PPP Master mix bez barvy	5 μ l
AR forward primer	0,3 μ l
AR reverse primer	0,3 μ l
H₂O	0,4 μ l
DNA	4 μ l

Tab. 9 Příprava směsi pro PCR RP2 (objemy pro jednu reakci)

PPP Master mix bez barvy	5 μ l
RP2 forward primer	0,3 μ l
RP2 reverse primer	0,3 μ l
H₂O	3,4 μ l
DNA	1 μ l

Tab. 10 Příprava směsi pro PCR CNKSR2 (objemy pro jednu reakci)

PPP Master mix bez barvy	5 μ l
CNKSR2 forward primer	0,3 μ l
CNKSR2 reverse primer	0,3 μ l
DMSO	0,5 μ l
DNA	3,9 μ l

4. K připravené PCR směsi bylo přidáno odpovídající množství DNA po restrikční analýze - 4 μ l v případě lokusu *AR*, 1 μ l v případě lokusu *RP2* a 3,9 μ l v případě lokusu *CNKSR2*.
5. Vzorky obsahující PCR směs jsme zvortexovali, krátce centrifugovali a vložili do termocycleru za podmínek podle tabulek 4 a 5.

Horizontální gelová elektroforéza

Vzorky po PCR reakci jsme ověřili gelovou elektroforézou.

1. Připravili jsme roztok 1 % agarózy. Navážili jsme 0,5 g práškové agarózy, přenesli do Erlenmayerovy baňky a doplnili 50 ml.
2. Roztok jsme zahřívali v mikrovlnné troubě až do úplného rozpuštění agarózy. Do ještě horkého roztoku jsme přidali 1 μ l Gel Green barviva.
3. Po ochlazení Erlenmayerovy baňky pod tekoucí vodou jsme roztok nalili do elektroforetické formy a nechali ztuhnout.
4. K 5 μ l každého vzorku jsme přidali 2 μ l 6x DNA Loading Dye a přenesli do jamky gelu. Pro určení velikosti fragmentu jsme použili velikostní marker Gene Ruller 100 bp (2 μ l), ke kterému jsme přidali 2 μ l 6x DNA Loading Dye a 4 μ l milliQ H₂O.
5. Elektroforéza probíhala 30 minut při napětí 120 V.
6. Po rozebrání elektroforézy jsme gel opatrně přenesli na FastGene Blue LED Illuminator a zvizualizovali tak délku fragmentů jednotlivých vzorků.

Fragmentační analýza

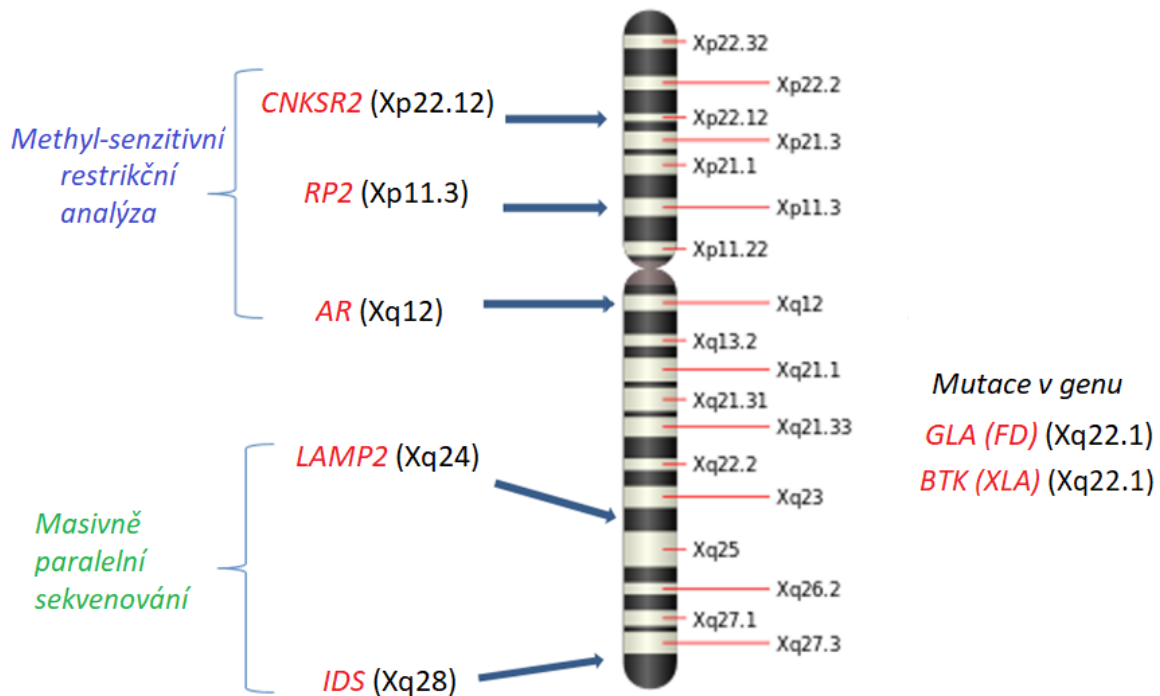
1. Do jamek mikrotitrační destičky jsme napipetovali 9 μ l formamidu, 0,5 μ l vnitřního standardu ROX 500 a 0,5 μ l produktu po PCR.
2. Jamky jsme uzavřeli plastovými víčky a vzorky byly následně denaturovány 3 minuty při teplotě 95°C.
3. Odstranili jsme víčka a celou mikrotitrační destičku vložili do přístroje 3500xL Gene Analyzer od firmy Thermo Fisher Scientific.

4.5.3 Vyhodnocení výsledků MSRA

Hodnocení výsledků jsme prováděli v programu Gene Mapper. Pomocí toho softwaru jsme sledovali informativnost jednotlivých vzorků a následně jsme vypočítali poměr alel pomocí ploch píků a vzorce pro korigovaný poměr alel.

5 Výsledky

V této práci porovnááme výsledky exprese mutantních alel získaných pomocí metod masivně paralelního sekvenování s výsledky získanými pomocí methyl-senzitivních restričních metod. Analyzované lokusy jsou znázorněny na následujícím schématu (obr. 7).



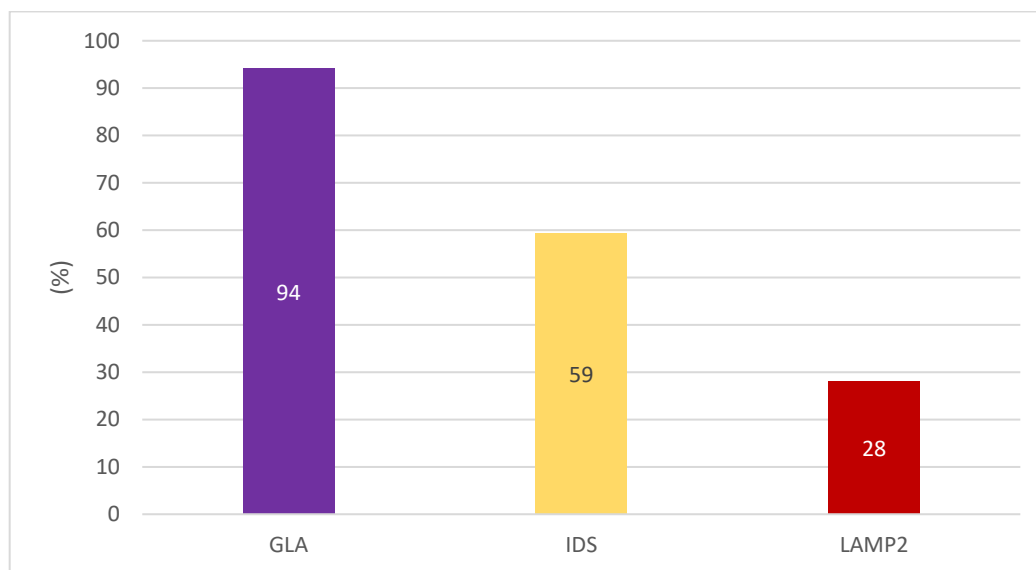
Obr. 7 Přehled lokusů pro analýzu inaktivace chromozomu X využitím methyl-senzitivních restričních metod a studium exprese mutantních alel pomocí metod masivně paralelního sekvenování.

5.1 Analýza exprese mutantních alel

Expres mutantních alel byla studována přímou a nepřímou analýzou transkriptu pomocí masivně paralelního sekvenování. Přímou metodou byla provedena relativní kvantifikace transkriptu v místě mutace v genu *GLA*. Dále byl transkript analyzován v polymorfismech genů *IDS* (c.438C>T) a *LAMP2* (c.156A>T). U nepřímých metod analýzy polymorfismů jsme sledovali poměrné zastoupení alel. Chromosom X nesoucí mutovanou alelu byl určen na základě výsledků přímé sondy nebo enzymové aktivity.

5.1.1 Informativnost metod založených na masivně paralelním sekvenování

Informativnost byla provedena pomocí Sangerova sekvenování na přístroji 3500XL Gene Analyzer od firmy Applied Biosystems a informativnost jednotlivých metod je zachycena v grafu (obr. 8). Za informativní považujeme ty vzorky pacientek, které jsou pro sledovaný polymorfismus heterozygotní.



Obr. 8 Dostupnost vzorků pro přímou analýzu transkriptu v genu *GLA* a informativnost relativní kvantifikace transkriptu polymorfismů v genech *IDS* a *LAMP2*.

Ze studovaného souboru 34 vzorků pacientek heterozygotních pro mutaci v genu *GLA* byla provedena relativní kvantifikace transkriptu ve 32 případech (94 %). Izolace RNA pro analýzu se u 2 vzorků nezdařila. Polymorfismus v genu *IDS* (rs1141608) byl informativní u 59 % vzorků, polymorfismus v genu *LAMP2* (rs12097) byl informativní u 28 % vzorků. Konkrétní počty stanovení informovanosti jsou zobrazeny v tab. 11.

Tab. 11 Informativnost sond využívající relativní kvantifikace transkriptu v místech polymorfismů genů *IDS* (c.438C>T) a *LAMP2* (c.156A>T).

Sonda	Počet pacientek
<i>IDS</i>	19
<i>LAMP2</i>	9

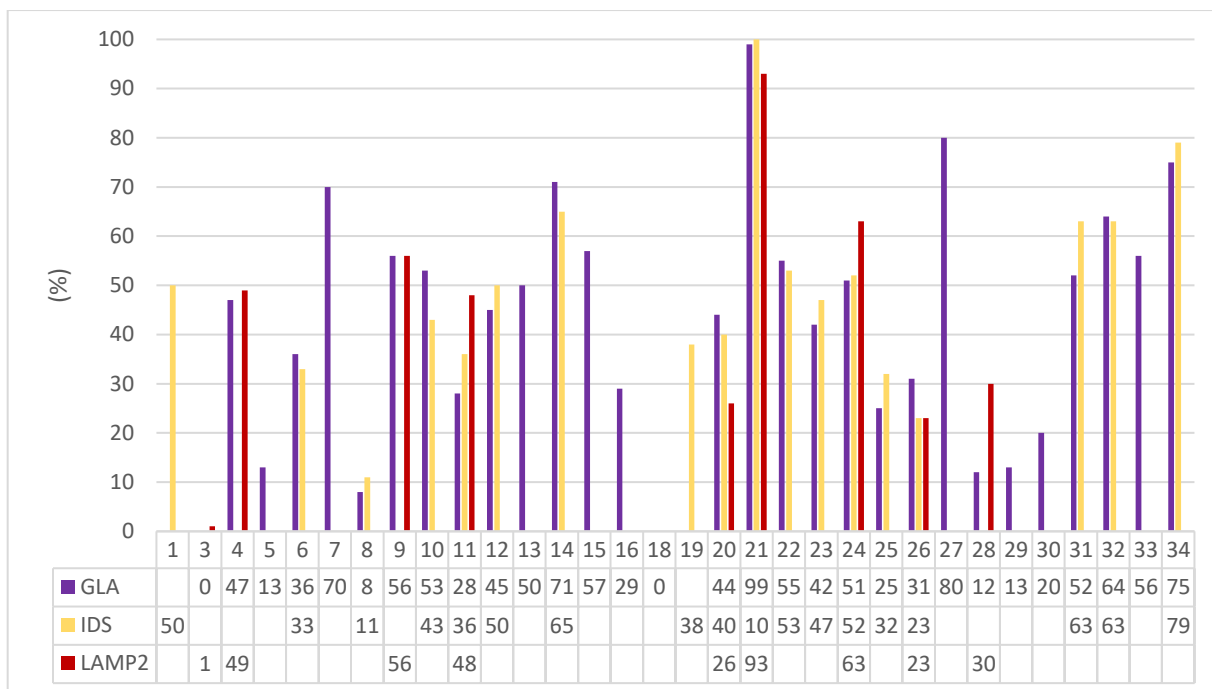
V tab. 12 nalezneme přehled mutací genu *GLA* u studovaného souboru.

Tab. 12 Přehled mutací v genu *GLA* u jednotlivých vzorků.

Č. vzorku	Mutace	Č. vzorku	Mutace
1	c.[195_369del]	18	c.[559_560delAT]
2	c.[195_369del]	19	c.[674_732del]
3	c.1025G>A	20	c.1024C>T
4	c.1025G>A	21	c.1024C>T
5	c.950T>C	22	c.277G>A
6	c.488G>T	23	c.1078G>A
7	c.902G>A	24	c.1085C>T
8	c.902G>A	25	c.1085C>T
9	c.463G>C	26	c.1085C>T
10	c.463G>C	27	c.511G>C
11	c.644A>G	28	c.881T>G
12	c.644A>G	29	c.194+2T>C
13	c.644A>G	30	c.1025G>A
14	c.644A>G	31	c.671A>C
15	c.801+3A>G	32	c.671A>C
16	c.551A>G	33	c.1034dupT
17	c.551A>G	34	c.427G>A

Přímou a nepřímou analýzou nebylo možné stanovit poměr alel u pacientek č. 2 a 17, izolace celkové RNA z těchto vzorků se opakovaně nezdařila. U pacientek č. 1, 15, 18, 19 a 29 nelze hodnotit analýzu v genu *GLA*, typ mutace je zde limitujícím faktorem metody.

Analýzou mutace v genu *GLA* jsme získali poměr normální a mutované alely. Analýzou polymorfismů v genech *IDS* a *LAMP2* jsme získali poměr alel, identifikace divoké a mutované alely je provedena porovnáním s výsledky poměru alel genu *GLA*. (obr. 10).



Obr. 10 Výsledky přímé a nepřímé analýzy transkriptu. Procentuální zastoupení mutované alely genu *GLA* (označeno fialově) a procentuální zastoupení polymorfismů v genech *IDS* a *LAMP2* (žlutá a červená). Čísla 1-34 odpovídají číslům pacientek.

Metodou analýzy transkriptu jsme získali poměr divoké a mutované alely pouze přímou analýzou genu *GLA* u 10 pacientek. Poměr alel stanovený pouze nepřímou analýzou polymorfismu v genu *IDS* byl detekován u pacientek č. 1 a 19.

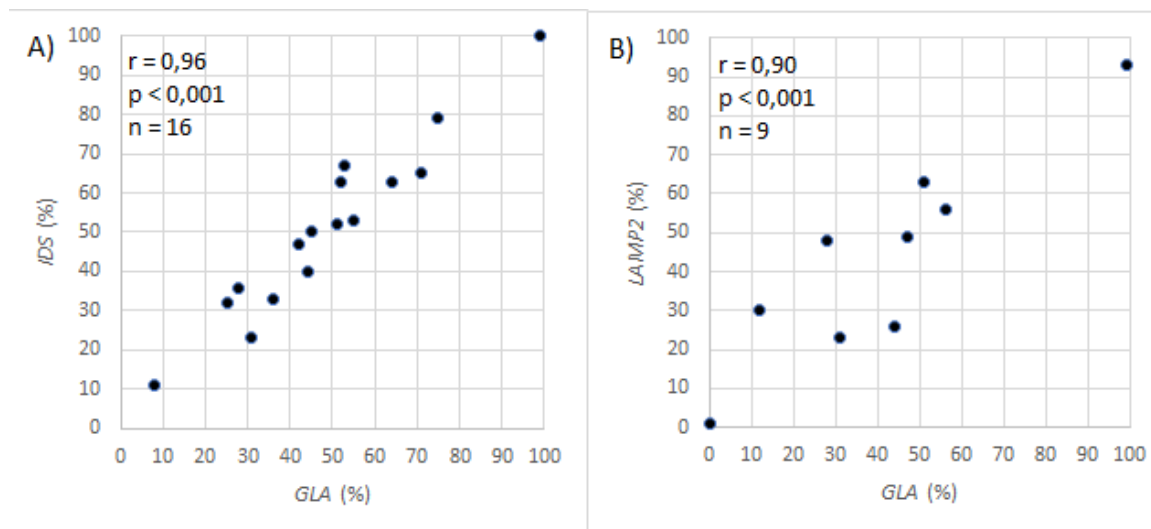
U dalších 20 pacientek bylo možné stanovit poměr alel pomocí přímé analýzy a současně pomocí alespoň jedné z analýz polymorfismů. Tyto výsledky jsme porovnali. Patnáct pacientek vykazuje shodný výsledek (rozdíl činí méně než 10 %) v procentuálních zastoupeních mutovaných alel stanovené různými metodami. U 6 pacientek pozorujeme rozdíly ve výsledcích jednotlivých metod vyšší než 10 %.

5.1.3 Korelace mutace *GLA* s nepřímou analýzou polymorfismů

Kvantifikací transkriptu genu *GLA* jsme získali poměr divoké a mutované alely. Nepřímou analýzou polymorfismů v genech *IDS* a *LAMP2* jsme získali poměr alel pomocí SNP. Mezi daty získanými přímou analýzou genu *GLA* a nepřímými analýzami jednotlivých polymorfismů jsme vypočítali korelaci pomocí Pearsonova korelačního koeficientu (PCC) (obr. 11).

Výpočtem PCC jsme získali míru korelace mezi sondami. Korelační koeficient nabývá hodnot od -1 do 1, čím vyšší je absolutní hodnota koeficientu, tím silnější je korelace mezi proměnnými. Kladná a záporná hodnota odpovídá přímému a nepřímému vztahu mezi proměnnými (Chen and Popovich, 2002). Korelační koeficient vypočítaný z dat přímé analýzy genu *GLA* a kvantifikace SNP genu *IDS* je 0,96. Výpočet korelace pomocí PCC mezi výsledky získané studiem genu *GLA* a SNP v genu *LAMP2* je nižší, r je 0,90.

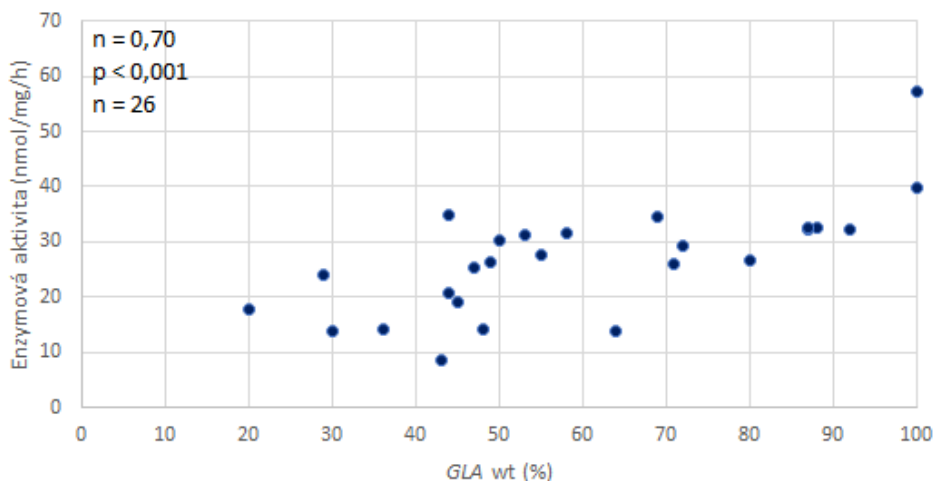
Další veličina získaná výpočtem PCC je signifikance p . Hodnota p značí pravděpodobnost, že bychom dosáhli stejného výsledku, pokud by byl korelační koeficient nulový (nulová hypotéza). Pokud je p nižší, než 0,05, je korelační koeficient r považován za statisticky signifikantní (Schoonjans, 2018). U obou výpočtů pozorujeme hodnotu $p < 0,001$, což značí statistickou signifikaci získaných hodnot PCC.



Obr. 11 Korelace mezi přímou analýzou transkriptu genu *GLA* a nepřímými analýzami SNP v genech *IDS* a *LAMP2*. Korelace je stanovena pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. (A) Korelace procentuálního zastoupení mutované alely mezi kvantifikací transkriptu genu *GLA* a kvantifikací SNP genu *IDS*. (B) Korelace procentuálního zastoupení mutované alely mezi kvantifikací transkriptu genu *GLA* a kvantifikací SNP genu *LAMP2*.

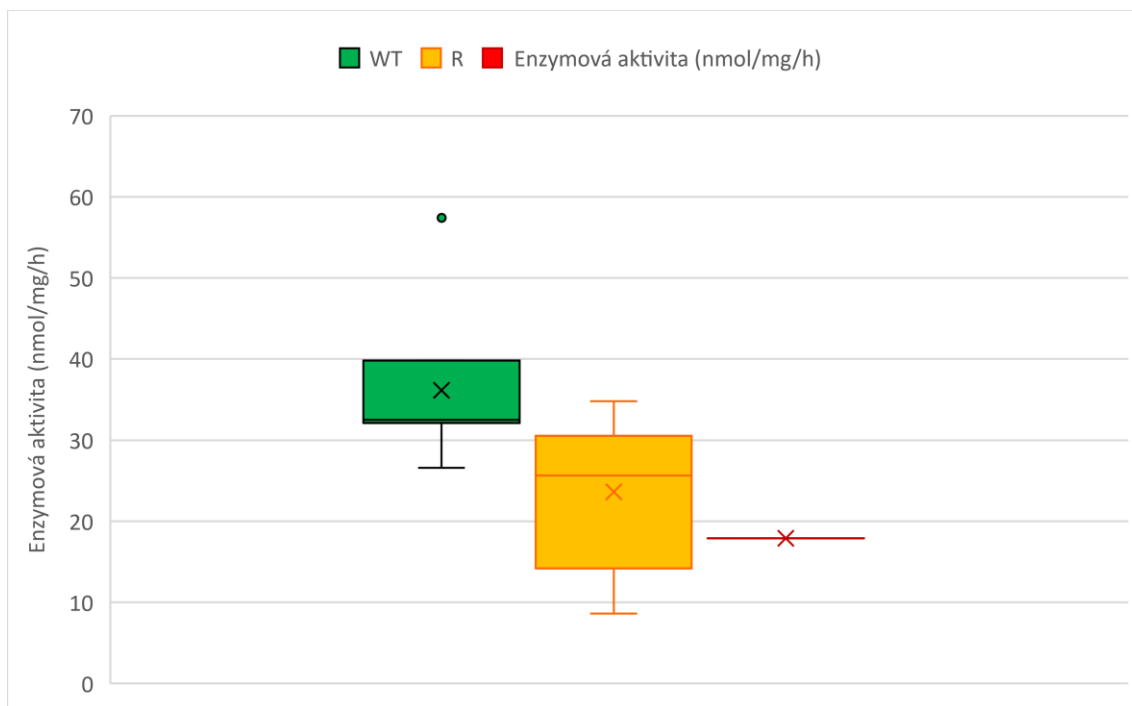
5.1.4 Korelace enzymové aktivity α -gal A a transkriptu genu *GLA*

Fabryho choroba je způsobena deficitem enzymu α -galaktosidázy A. Hodnoty relativní kvantifikace transkriptu genu *GLA* a enzymové aktivity α -gal A jsme získali u 26 pacientek, výsledky jsme porovnali pomocí PCC (obr. 12).



Obr. 12 Korelace enzymové aktivity α -gal a relativní kvantifikace transkriptu v genu *GLA*. Výsledky *GLA* jsou zobrazeny jako procentuální zastoupení divoké (normální) alely. Korelace je stanovena pomocí Pearsonova korelačního koeficientu.

Porovnání enzymové aktivity s výsledky zastoupení divoké a mutované alely získané kvantifikací transkriptu jsou zobrazeny na obr. 13. V případě posunu v zastoupení alel ve prospěch divoké alely u 7 pacientek pozorujeme vysokou (fyziologickou) aktivitu enzymu. Naopak, v případě nerovnoměrného zastoupení alel ve prospěch alely mutované, které bylo detekováno u 1 pacientky, sledujeme velmi nízkou enzymovou aktivitu. U náhodného zastoupení obou alel pozorujeme různé hodnoty aktivity α -gal A v případě 18 testovaných vzorků pacientek.



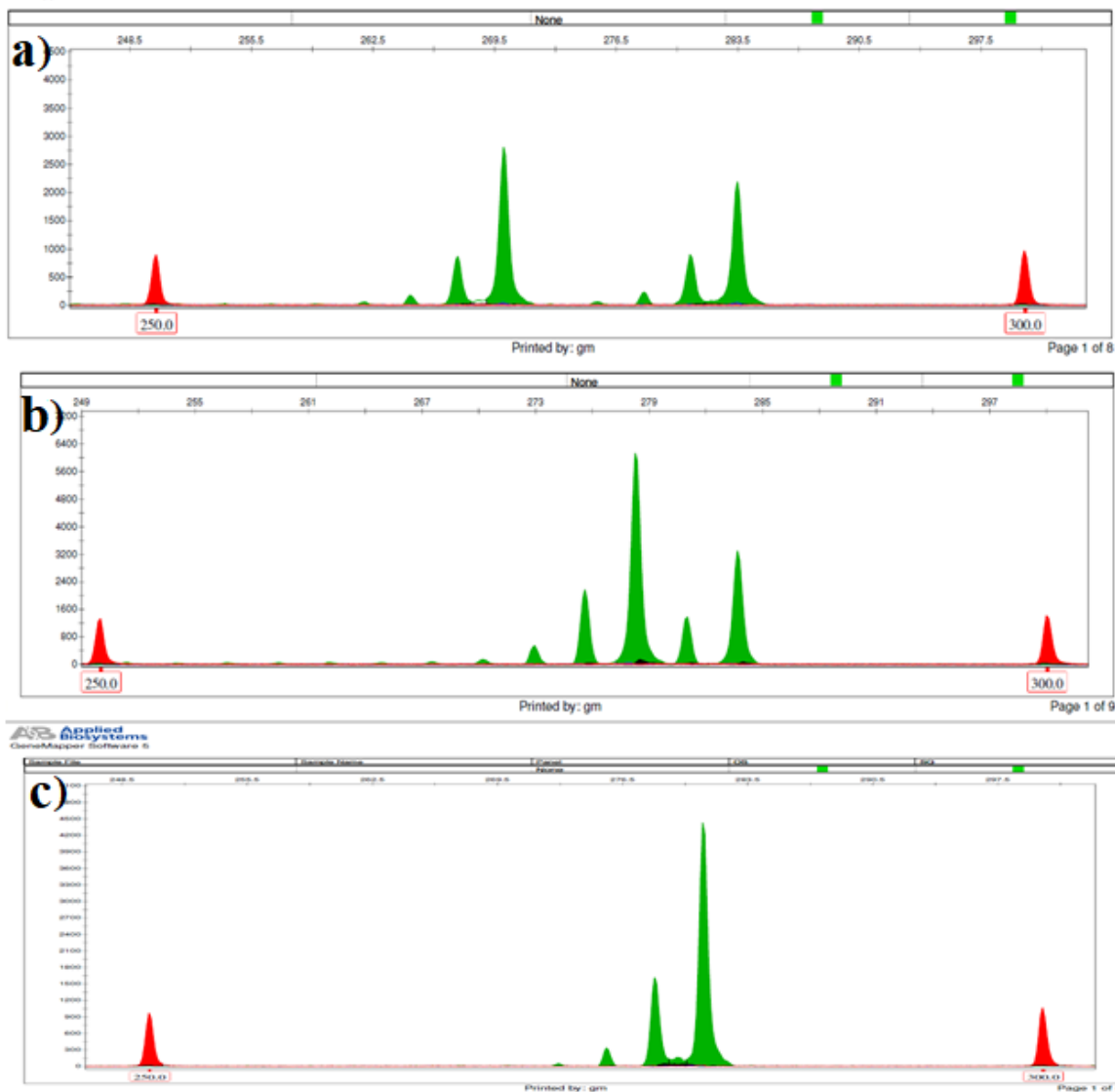
Obr. 13 Vztah enzymové aktivity a výsledků přímé analýzy transkriptu v genu *GLA*. Zelená – nevyvážená XCI ve prospěch zdravé (wild type, WT) alely; žlutá – náhodná XCI (random, R); červená – nevyvážená XCI ve prospěch mutované (mutation, M) alely.

5.2 Studium stavu X inaktivace pomocí methyl-senzitivních restričních metod

K analýze stavu XCI pomocí methyl-senzitivní restriční analýzy jsme použili tři sondy v různých lokusech *AR*, *RP2* a *CNKSR2* (obr. 7)

5.2.1 Hodnocení methyl-senzitivních restričních metod

Při studii stavu X inaktivace pomocí MSRA byla nejprve hodnocena informativnost sond. Sonda je informativní, pokud se alely pro lokusy *AR* a *CNKSR2* liší alespoň o 2 trinukleotidové repeticity a alely lokusu *RP2* alespoň o jedno opakování tetranukleotidového motivu. Data získaná z fragmentační analýzy byla vyhodnocována v programu GeneMapper. Na obr. 14 jsou znázorněny ilustrativní výsledky stanovení informativnosti lokusu *AR*, přičemž výsledek je hodnocen jako informativní, částečně informativní nebo neinformativní.



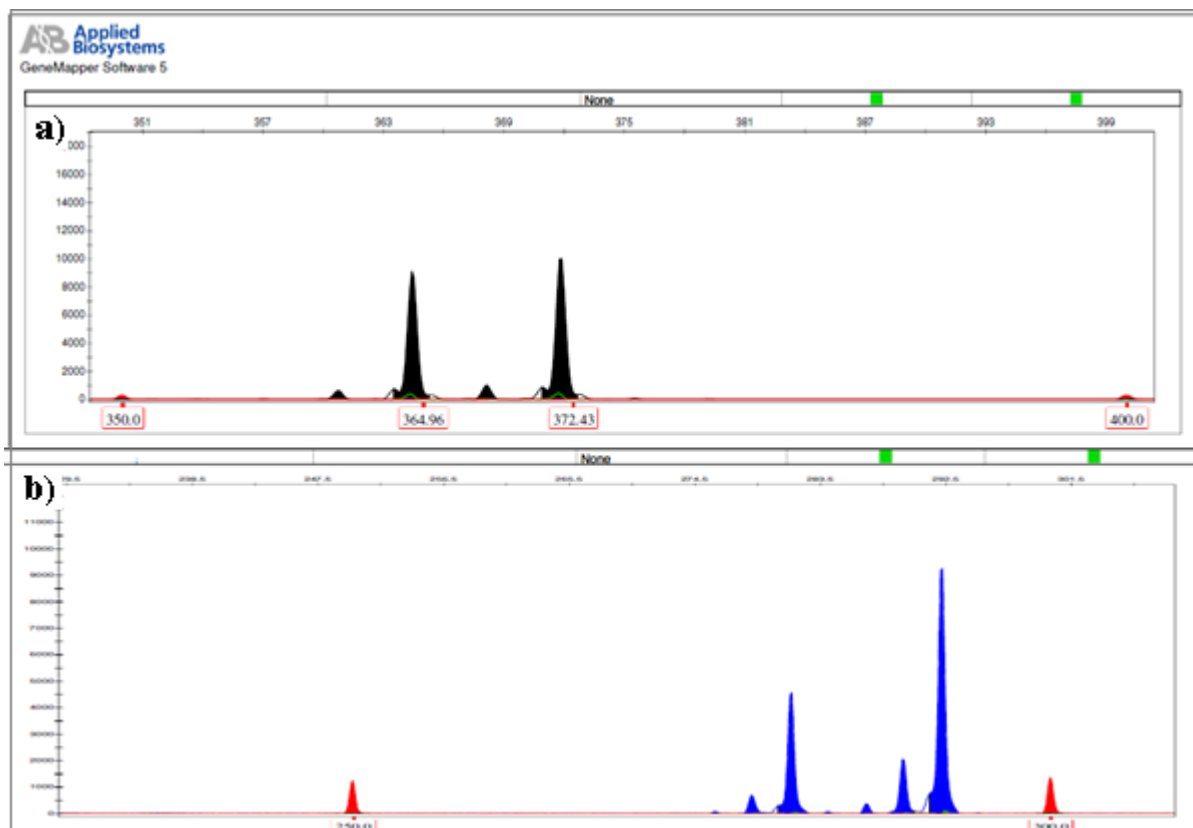
Obr. 14 Ilustrativní výsledky stanovení informativnosti v lokusu *AR* (zelené píky). A) Informativní výsledek. B) Částečně informativní výsledek. C) Neinformativní výsledek. Červeně jsou označeny velikostní standardy.

Informativní výsledek (obr. 14a) je takový, kdy je možné od sebe jednotlivé alely striktně odlišit. Délky alel se musí lišit alespoň o dvě opakování repetitivního motivu CAG a u obou alel pozorujeme jeden hlavní pík a dva menší stutter píky. Plochy píků lze následně použít pro výpočet korigovaného poměru XCI.

Pro hodnocení MSRA je možné použít i částečně informativní výsledky (obr. 14b). Alely se od sebe liší o 1 nebo 2 opakování repetitivního motivu, obvykle pozorujeme překryv hlavního vrcholu kratší alely se stutter píkem delší alely. U částečně informativního vzorku lze identifikovat délku alel, např. 278 bp a 284 bp, avšak výpočet korigovaného poměru XCI poskytne pouze orientační zastoupení alel.

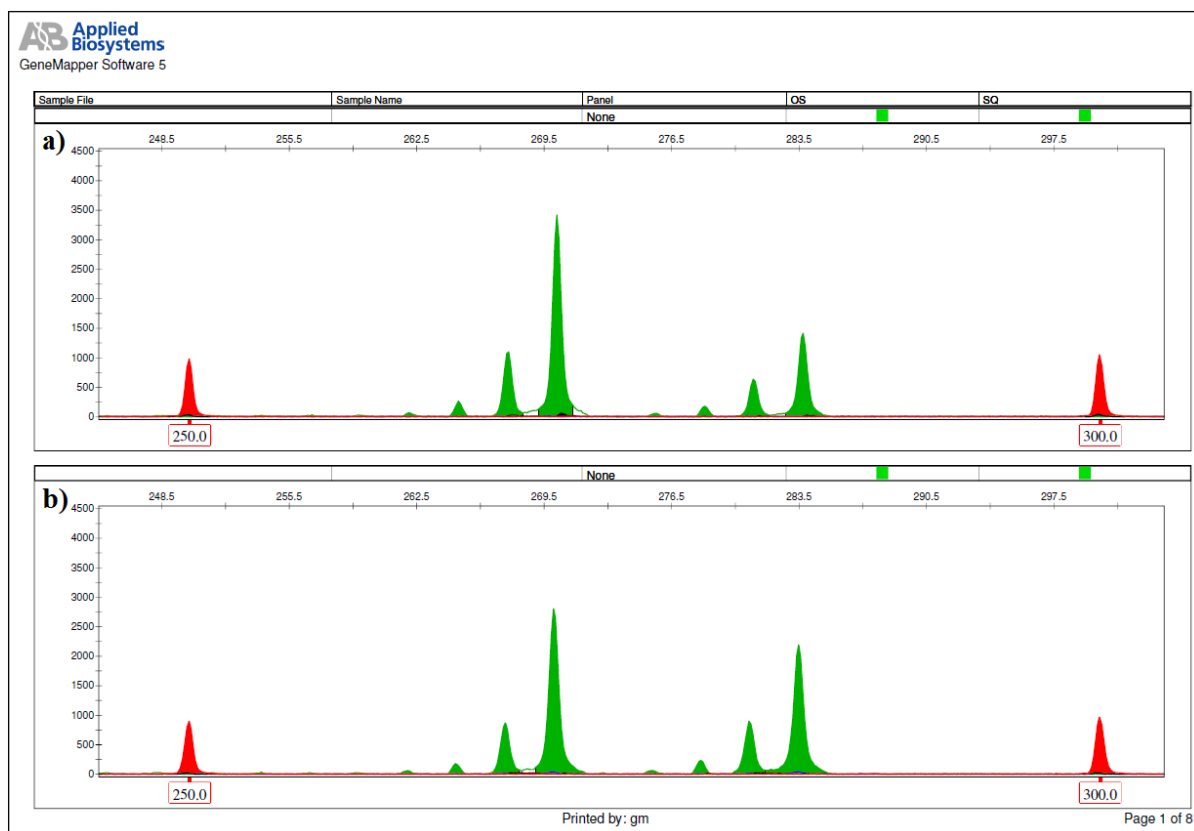
Neinformativní výsledek (obr. 14c) je takový, kdy mají obě alely stejnou délku, obsahují stejný počet repetitivních motivů CAG.

Stanovení informovanosti bylo provedeno i pro lokusy *RP2* a *CNKSR2* (obr. 15). U informativního výsledku pro lokus *RP2* (obr. 15a) byl detekován jeden hlavní vrchol a jeden menší stutter vrchol. Informativní výsledek lokusu *CNKSR2* (obr. 15b) se v počtu píků podobá lokusu *AR*, u obou alel jsou rovněž pozorovány dva stutter píky a jeden pík hlavní.



Obr. 15 Ilustrativní informativní výsledky v lokusech *RP2* (a) a *CNKSR2* (b). Červeně jsou označeny velikostní standardy.

Vzorky hodnocené jako informativní nebo částečně informativní byly následně použity pro MSRA. Methyl-senzitivní restrikční analýza byla u informativních vzorků provedena ve dvou zkumavkách, jedna reakce obsahovala methylsenzitivní restrikční enzym a výsledkem byl štěpený produkt, do druhé reakce označené jako neštěpený produkt methylsenzitivní restrikční enzym přidán nebyl. Při analýze v lokusech AR a CNKSR2 byl do obou zkumavek přidán i pomocný restrikční enzym. Na obr. 16 jsou demonstrovány plochy píků štěpeného (a) a neštěpeného (b) produktu u informativního výsledku v lokusu *AR*.



Obr. 16 Methyl-senzitivní restrikční analýza v lokusu *AR*, informativní výsledek (zelené píky); a) štěpený produkt; b) neštěpený produkt; červeně jsou označeny velikostní standardy.

Během PCR reakce je preferenčně amplifikována kratší alela (obr 16). Z tohoto důvodu bylo potřeba vypočítat skutečný poměr alel, kdy poměr alel štěpeného produktu byl korigován podle poměru alel produktu neštěpeného. K výpočtu skutečného (korigovaného) poměru jsme použili následující rovnici:

$$x (\%) = \frac{\frac{S1 \cdot 0,5}{N1}}{\frac{S1 \cdot 0,5}{N1} + \frac{S2 \cdot 0,5}{N2}} \cdot 100$$

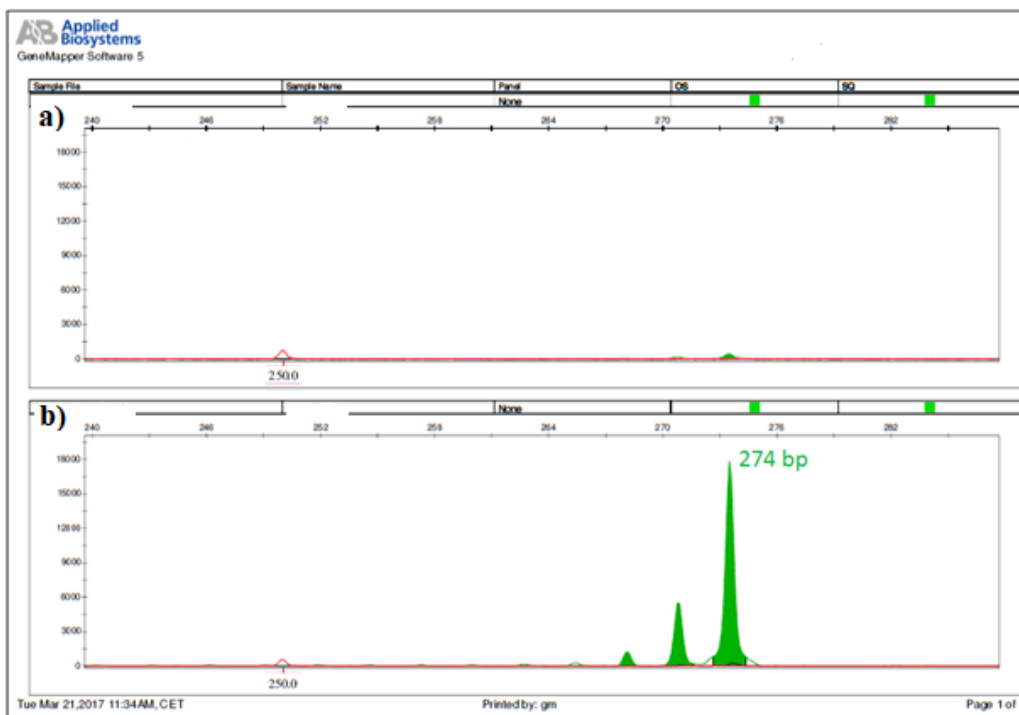
kde x je procentuální zastoupení kratší alely, $S1$ je součet ploch píků kratší alely štěpeného produktu, $S2$ je součet ploch píků delší alely štěpeného produktu, $N1$ je součet ploch píků kratší alely neštěpeného produktu, $N2$ je součet ploch píků delší alely neštěpeného produktu.

Zastoupení delší alely pak bylo vypočítáno jako:

$$y (\%) = 100 - x$$

kde y je procentuální zastoupení delší alely.

U methyl-senzitivních restrikčních analýz byla jako kontrolní vzorek použita DNA muže (obr. 17). V grafu štěpeného (a) a neštěpeného (b) produktu jsme kontrolovali, zda proběhlo restrikční štěpení.



Obr. 17 Mužský vzorek, methyl-senzitivní restrikční analýza v lokusu AR; a) štěpený produkt; b) neštěpený produkt. Tento vzorek vykazuje 1 % nedoštěpeného produktu.

Výpočtem využívajícím ploch píků štěpené a neštěpené alely jsme dostali výsledek nedoštěpeného produktu:

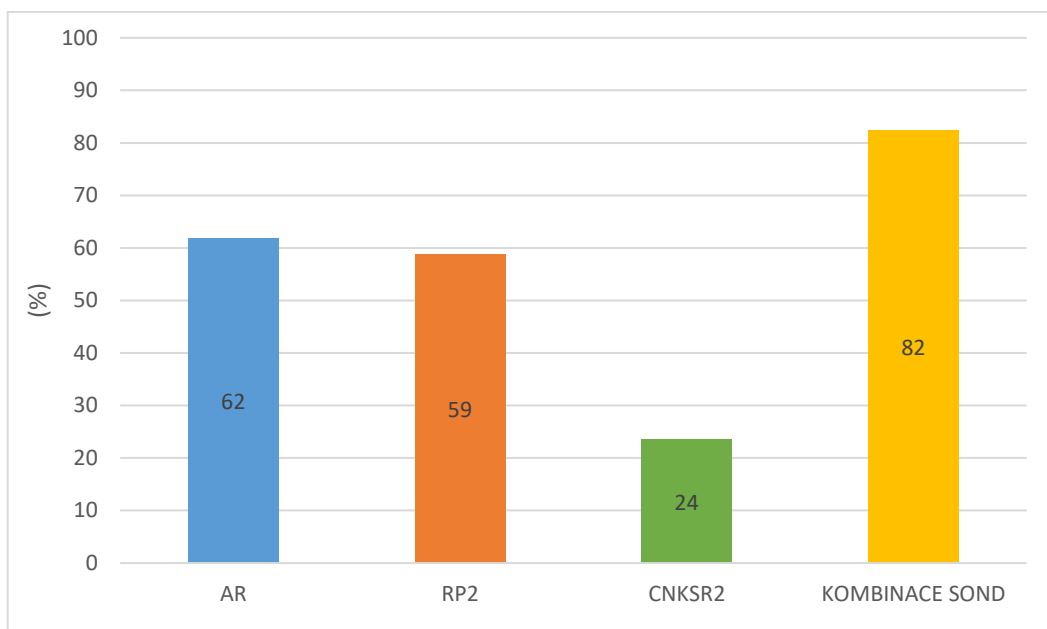
$$m (\%) = \frac{S}{S + N} \cdot 100$$

kde m je procento nedoštěpeného produktu, S je součet ploch píků alely štěpeného produktu a N je součet ploch píků alely neštěpeného produktu.

Výsledky získané methyl-senzitivní restriční analýzou byly relevantní, pokud hodnota nedoštěpeného produktu nepřesahovala 5 %. V opačném případě bylo nutné analýzu zopakovat.

5.2.2 Informativnost použitých sond

Detekce stavu XCI byla provedena pomocí methyl-senzitivních restričních analýz v lokusech *AR*, *RP2* a *CNKS2* u celkem 34 pacientek heterozygotních pro Fabryho chorobu. Informativnost jednotlivých metod je zachycena na obr. 18.



Obr. 18 Informativnost methyl-senzitivních restričních metod (modrá – procentuální informativnost sondy *AR*, červená – procentuální informativnost sondy *RP2*, zelená – procentuální informativnost sondy *CNKS2*, žlutá – informativnost methyl-senzitivních restričních metod v případě kombinace všech tří sond)

Při použití sond v lokusech *AR* a *RP2* jsme získali obdobný informativní výsledek - cca 60 % případů. Sonda *CNKSR2* poskytla informativní výsledek pouze u čtvrtiny testovaných vzorků, V případě kombinace všech tří methyl-senzitivních restrikčních metod bylo 82 % vzorků informativních alespoň pro jednu z použitých sond. Konkrétní počty pacientek informativních pro jednotlivé sondy nalezneme v tab. 13.

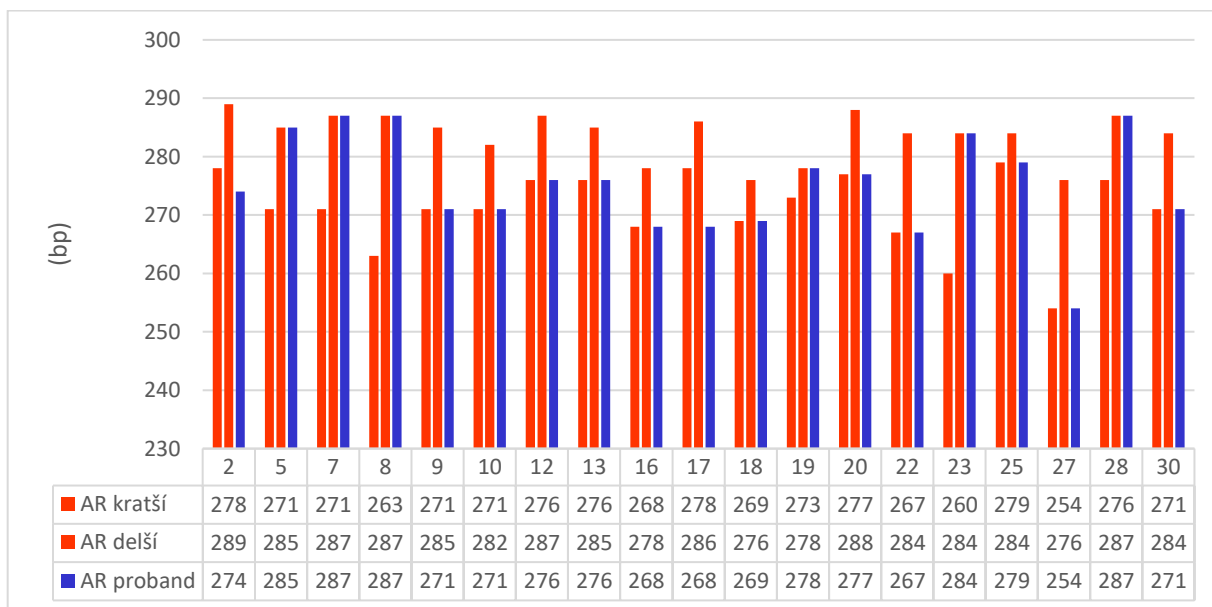
Tab. 13 Informativnost stanovení stavu XCI pomocí methyl-senzitivních restrikčních metod.

Sonda	Počet pacientek
<i>AR</i>	21
<i>RP2</i>	20
<i>CNKSR2</i>	8
Kombinace sond	28

5.2.3 Určení mutovaných alel

U pacientek, jejichž paternální a maternální alely genů *AR* a *RP2* se liší počtem repetitivních motivů, byly mutované alely určeny pomocí vyšetření alel hemizygotních probandů.

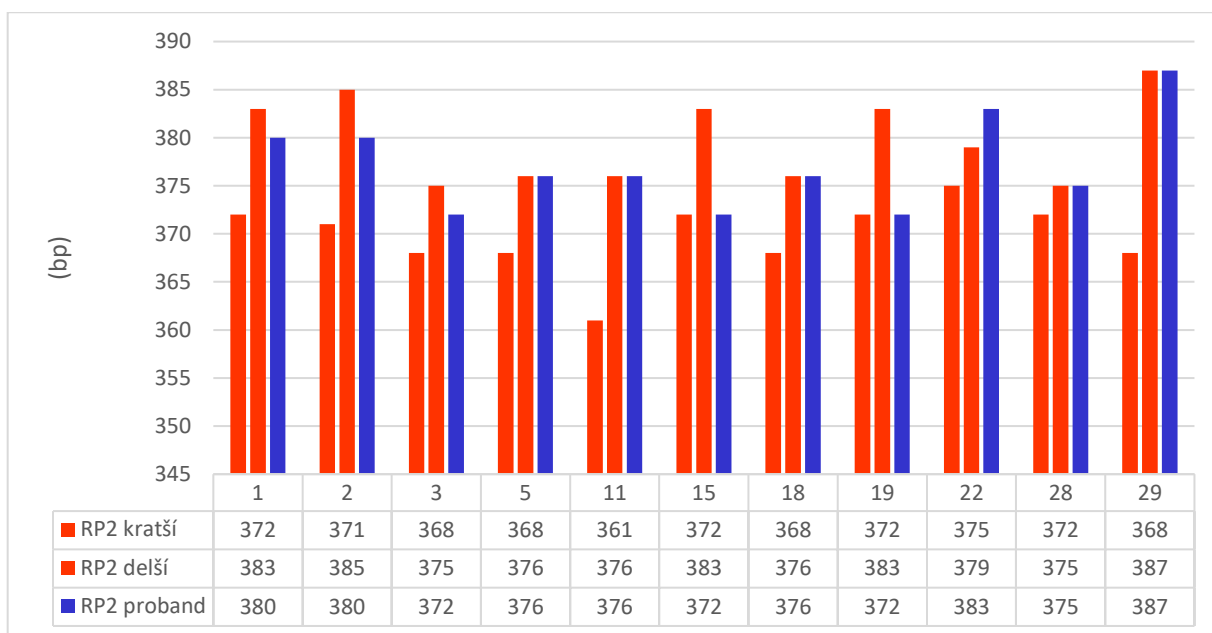
DNA probanda byla dostupná pro 19 z 21 pacientek informativních pro lokus *AR* (obr. 19).



Obr. 19 Identifikace mutovaných alel pomocí vyšetření probandů sondou *AR*. Červeně je označena délka kratší a delší alela pacientky, modře je označena délka alely probanda.

Metodou *AR* se podařilo určit mutované alely pomocí probandů u 17 pacientek. Pacientky č. 2 a 17 mají alely lišící se od alely probanda. Pacientky č. 32 a 33 byly také informativní pro lokus *AR*, ovšem probandem v rodině těchto pacientek byla žena, mutované alely nebylo možné určit.

Pro lokus *RP2* bylo informativních 20 pacientek. Identifikace mutovaných alel tohoto lokusu byla provedena u 11 vzorků (obr. 20).



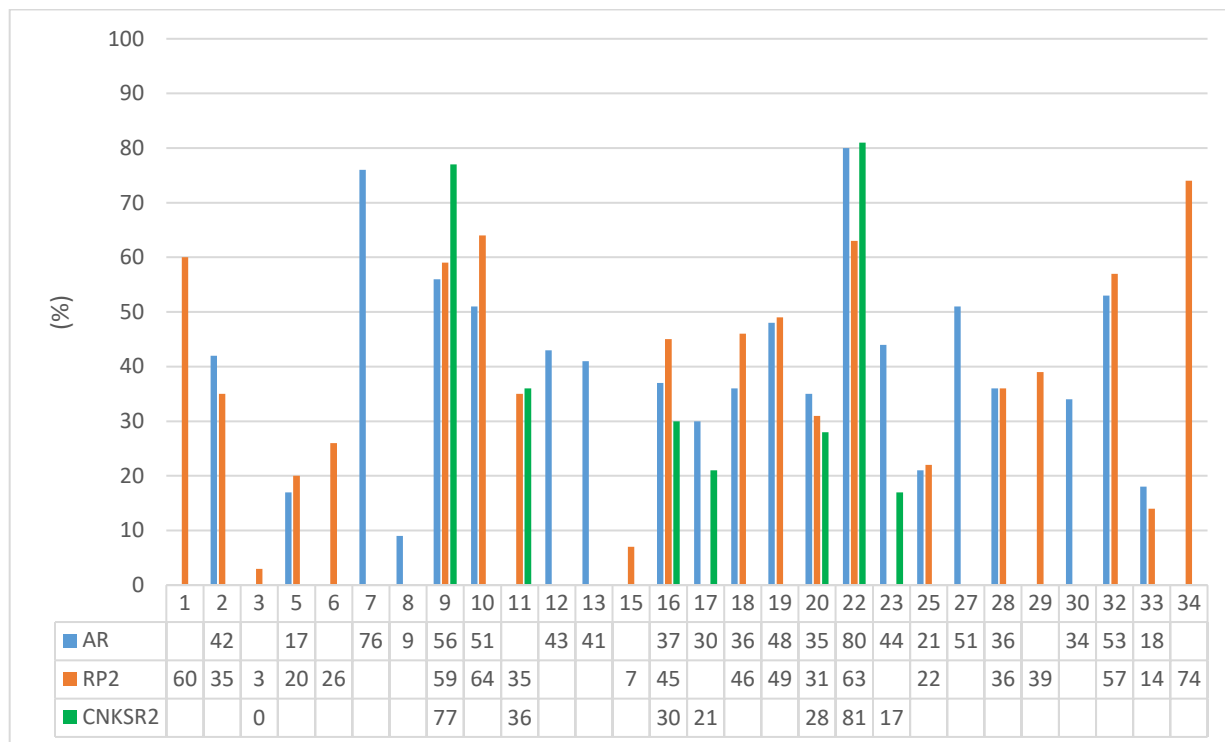
Obr. 20 Identifikace mutovaných alel pomocí vyšetření probandů sondou *RP2*. Červeně je označena délka kratší a delší alela pacientky, modře je označena délka alely probanda.

Mutované alely lokusu *RP2* byly jednoznačně identifikovány u 7 pacientek. Pacientky č. 1, 2, 3 a 22 vykazovaly odlišné délky alel od délky mutované alely probanda. U zbývajících 9 pacientek informativních pro sondu *RP2* nebyla analýza k identifikaci mutované alely provedena. Čtyři z těchto vzorků (č. 18, 19, 22 a 28) byly informativní již pro sondu *AR*, identifikace mutované alely proběhla porovnáním s výsledky předchozí analýzy. V rodinách třech pacientek byla probandem žena, mutantní alely nebylo možné detekovat.

5.2.4 Stanovení X inaktivace pomocí methyl-senzitivních restrikčních analýz

Vzorky 28 informativních pacientek byly analyzovány pomocí methyl-senzitivních restrikčních analýz (MSRA). Ke stanovení byly použity vzorky DNA izolovaných z krve a bukalních stěrů.

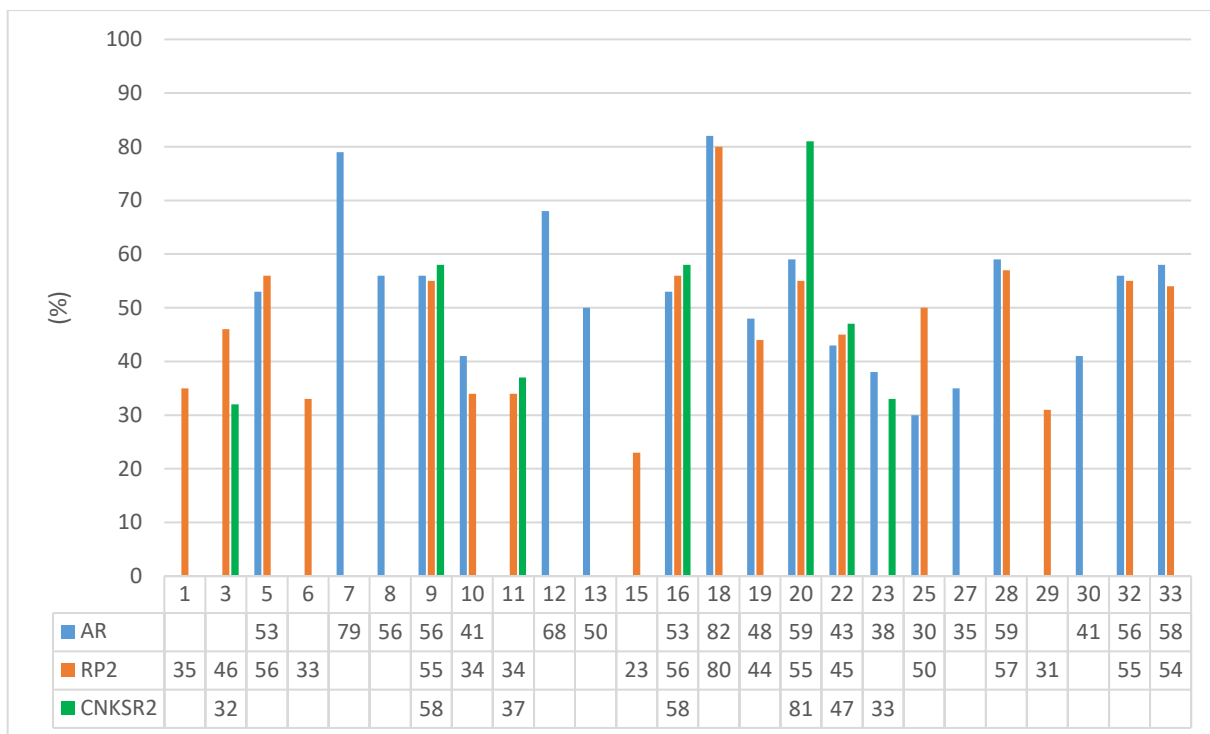
Na obr. 21 jsou uvedeny výsledky sond AR, RP2 a CNKSR2 provedených ze vzorků DNA izolovaných z krve.



Obr. 21 Procentuální zastoupení mutovaných alel získaná pomocí methyl-senzitivních restrikčních metod v lokusech *AR*, *RP2* a *CNKSR2* u vzorků DNA izolovaných z krve. Čísla 1-34 odpovídají číslům pacientek, modře je vyznačen lokus *AR*, oranžově lokus *RP2* a zeleně lokus *CNKSR2*.

Vzorky 11 pacientek byly informativní pouze pro jeden lokus (*AR* nebo *RP2*). U 13 pacientek sledujeme podobný nebo stejný výsledek XCI ve více metodách. Ve vzorcích č. 9, 10, 16, 22 a 23 jsou zřejmé rozdíly mezi výsledky jednotlivých sond. Nevyváženou XCI, tedy poměr alel vyšší než 80:20, pozorujeme u 7 pacientek.

Porovnání výsledků nenáhodné XCI získaných pomocí methyl-senzitivních restrikčních metod bylo provedeno i u vzorků DNA izolovaných z bukalních stěrů. K porovnání jsme měli k dispozici 25 vzorků pacientek informativních alespoň pro jednu ze studovaných sond (obr. 22).

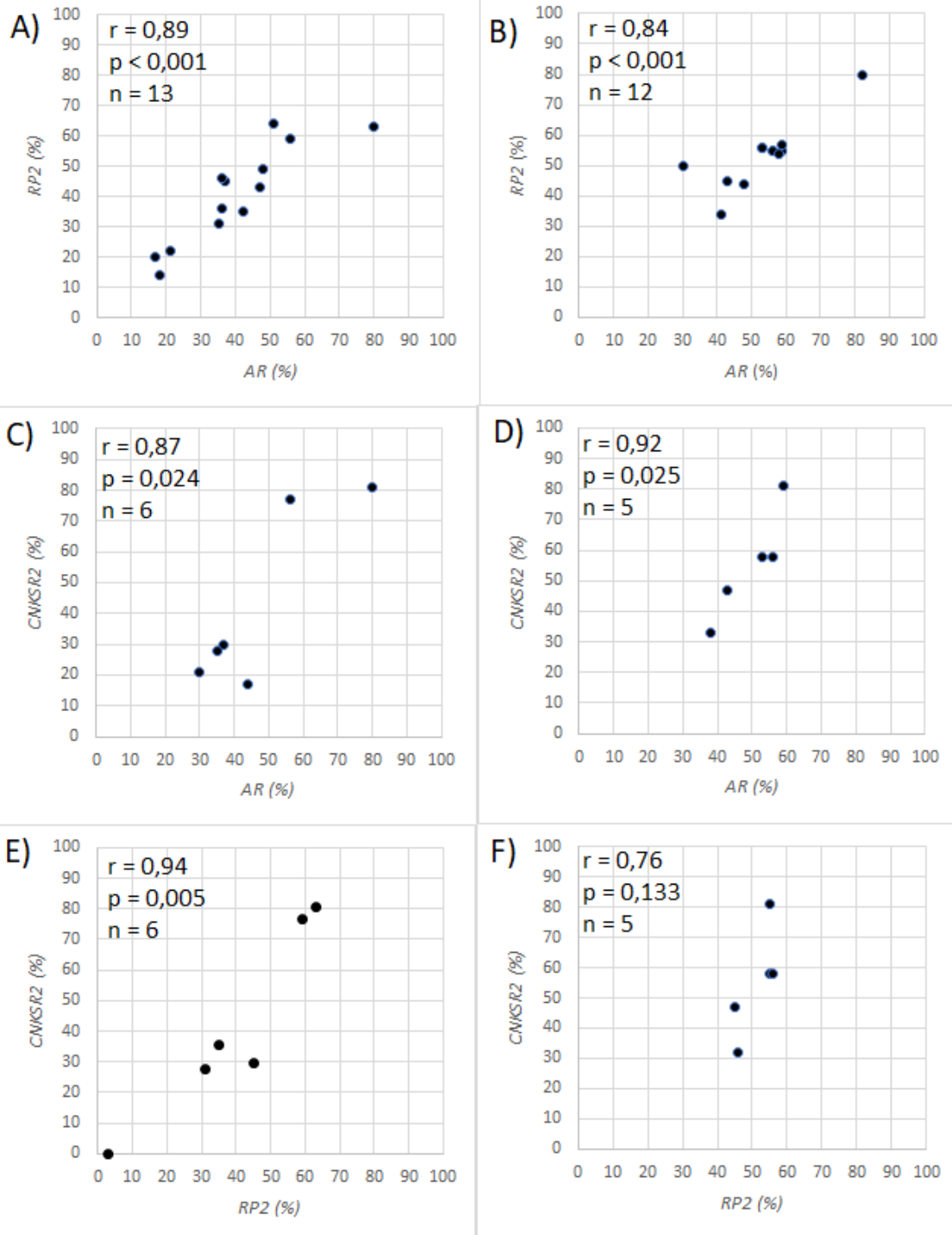


Obr. 22 Procentuální zastoupení mutovaných alel získaná pomocí methyl-senzitivních restrikčních metod v lokusech *AR*, *RP2* a *CNKSR2* u vzorků DNA izolovaných z bukálních stěrů. Čísla 1-34 odpovídají číslům pacientek, modře je vyznačen lokus *AR*, oranžově lokus *RP2* a zeleně lokus *CNKSR2*.

Procentuální zastoupení mutované alely pomocí pouze jedné ze sond vykazovalo 10 pacientek. Porovnáním alespoň 2 metod jsme získali shodné výsledky u 12 vzorků. Nenáhodná XCI se objevuje u pacientek č. 18 a 20. U pacientky 20 je nevyvážená XCI pozorovaná jen u sondy *CNKSR2*, která je částečně informativní. Plně informativní sondy *AR* a *RP2* ukazují náhodnou XCI.

5.2.5 Zaměnitelnost sond pro MSRA

Analýza DNA pomocí MSRA byla provedena ve třech lokusech genů *AR*, *RP2* a *CNKSR2*. U vzorků, které byly informativní alespoň pro dvě z těchto sond, jsme provedli korelaci mezi výsledky získanými těmito analýzami. Dvojice sond použitých ke stanovení XCI u vzorků DNA izolovaných z NK a BS nalezneme na obr. 23.



Obr. 23 Korelace mezi MSRA požitých pro stanovení XCI v lokusech AR, RP2 a CNKSR2. Korelace je stanovena pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. (A) Korelace procentuálního zastoupení mutované alely mezi lokusy AR a RP2 u vzorků DNA izolovaných z NK. (B) Korelace procentuálního zastoupení mutované alely mezi lokusy AR a RP2 u vzorků DNA izolovaných z BS. (C) Korelace procentuálního zastoupení mutované alely mezi lokusy AR a CNKSR2 u vzorků DNA izolovaných z NK. (D) Korelace procentuálního zastoupení mutované alely mezi lokusy AR a CNKSR2 u vzorků DNA izolovaných z BS. (E) Korelace procentuálního zastoupení mutované alely mezi lokusy RP2 a CNKSR2 u vzorků DNA izolovaných z NK. (F) Korelace procentuálního zastoupení mutované alely mezi lokusy RP2 a CNKSR2 u vzorků DNA izolovaných z BS.

Korelační koeficient mezi výsledky sond *AR* a *RP2* byl 0,89 ve vzorcích izolovaných z NK a 0,84 ve vzorcích izolovaných z BS. U dvojice sond *AR* a *CNKSR2* byl PCC 0,87 u vzorků NK a 0,92 u vzorků BS. Naopak, u sond *RP2* a *CNKSR2* byla nižší hodnota PCC mezi vzorky BS, tedy 0,76 a vyšší u vzorků NK, 0,94. U všech 6 výpočtů pozorujeme PCC v rozmezí 0,50 – 1, které značí vysoký stupeň korelace mezi sondami.

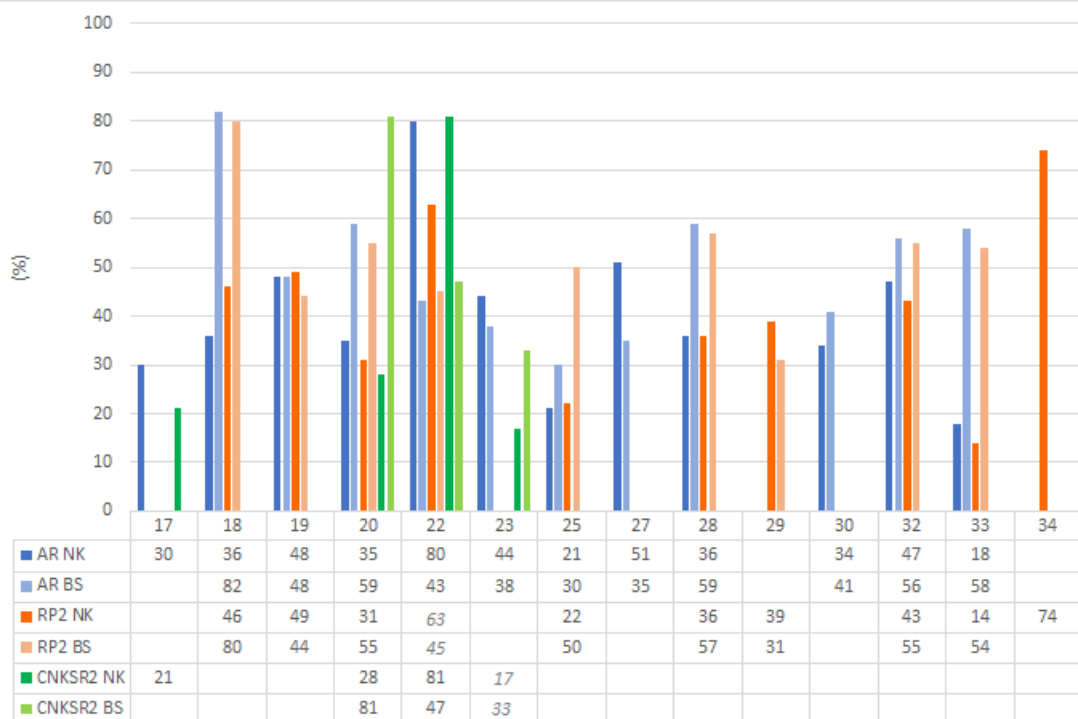
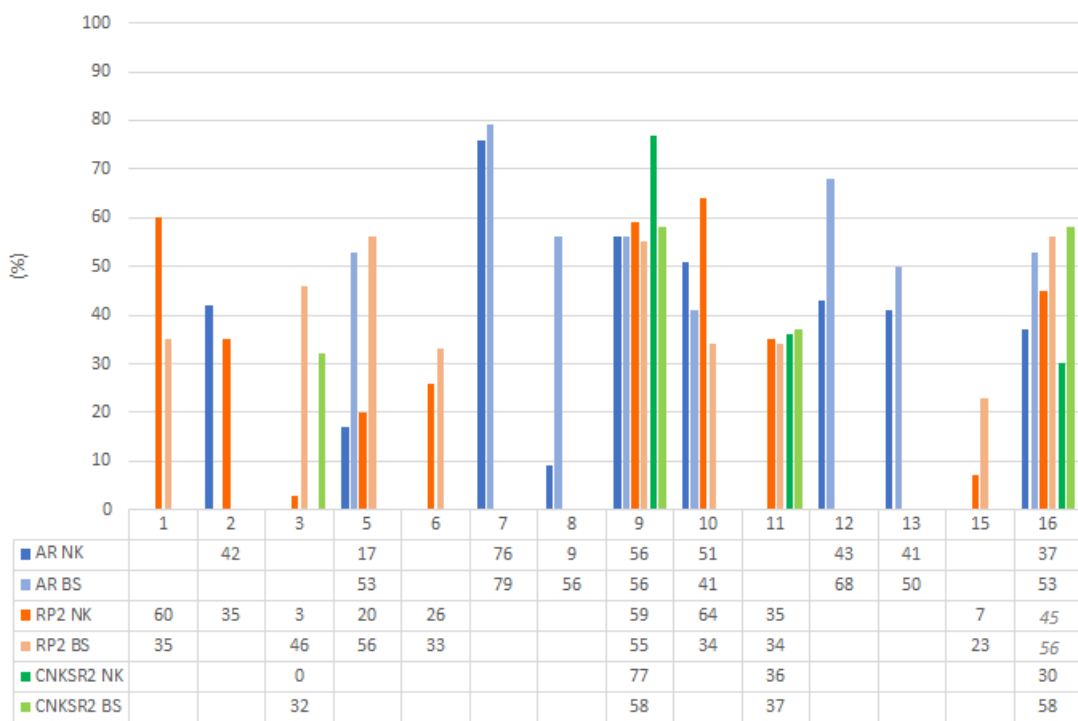
Hodnota *p* v případě korelace sond *RP2* a *CNKSR2* u vzorků BS je 0,133. U zbývajících 5 porovnání sond pozorujeme hodnotu *p* nižší než 0,05, tedy statisticky signifikantní korelační koeficient.

5.2.6 Tkáňová specifita

Pro sledování tkáňové specifity jsme porovnali výsledky XCI u vzorků krve a bukálních stěrů. Pomocí sondy *AR* byl detekován stav XCI u 21 vzorků DNA izolovaných z krve a 19 vzorků DNA izolovaných z bukálních stěrů (obr. 24).

Detekci stavu XCI pomocí MSRA alespoň v jednom lokusu v krvi a bukálním stěru bylo možné provést u 25 vzorků. Pacientky č. 4, 14, 21, 24, 26 a 31 byly neinformativní pro všechny 3 použité sondy. U pacientek č. 2, 17 a 34 nebyly vzorky BS k dispozici pro analýzu.

Korelaci výsledků stanovení XCI u vzorků krve a BS do 10 % pozorujeme u 7 vzorků. Šest vzorků vykazovalo nenáhodný stav XCI ve vzorcích DNA izolovaných z krve, zatímco u vzorků BS byla pozorována náhodná XCI. Naopak je tomu u vzorku č. 18, kde XCI v krvi vykazuje náhodný stav, zatímco v BS byla pozorována nevyvážená XCI.



Obr. 24 Porovnání stavu X inaktivace u vzorků DNA izolované z krve (NK) a bukůlních stěrů (BS) v lokusech *AR*, *RP2* a *CNKSR2*. Výsledky jsou zaznamenány jako procentuální zastoupení mutované alely. Čísla 1-34 odpovídají číslům analyzovaných vzorků.

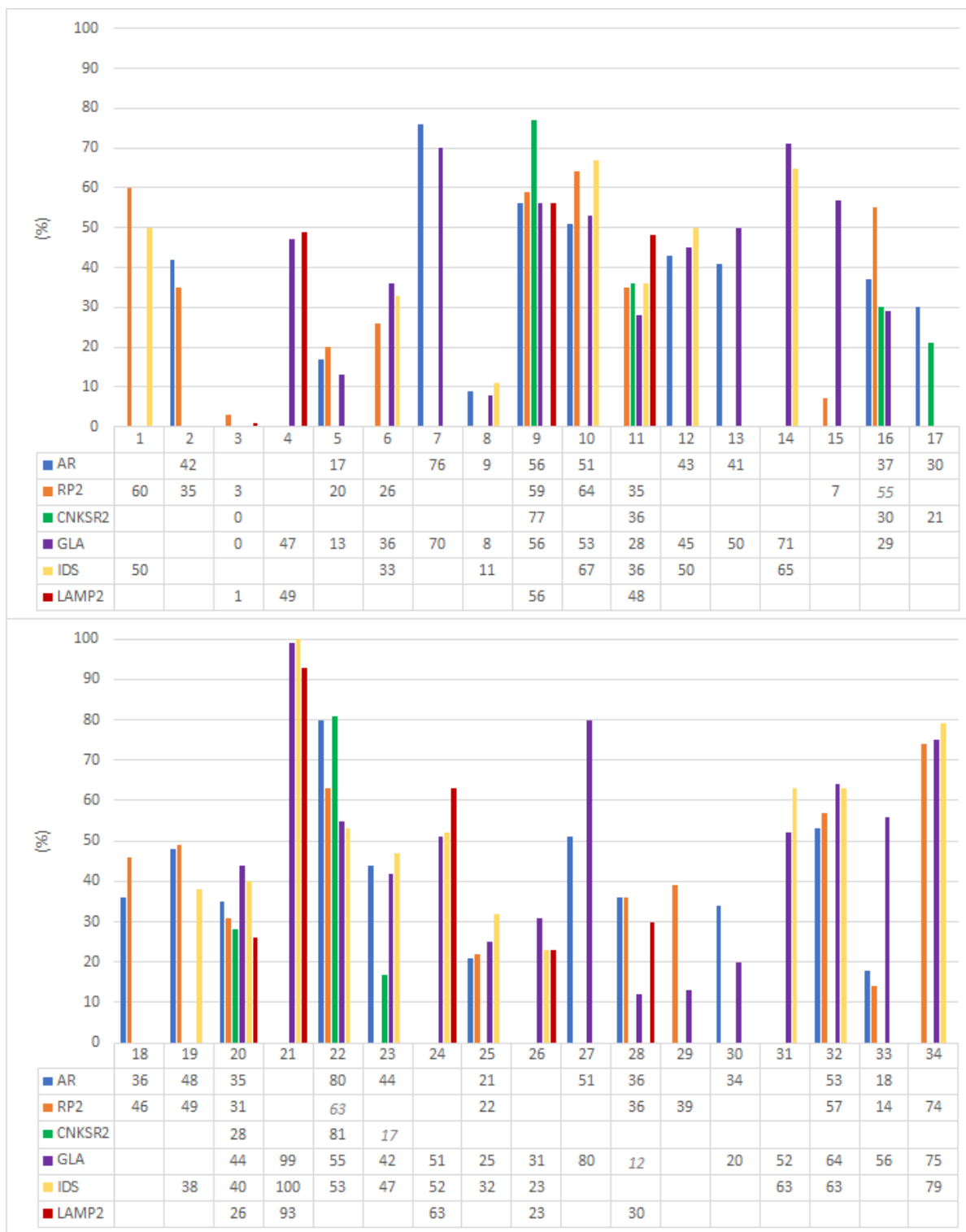
5.3 Korelace stavu XCI určené relativní kvantifikací transkriptu a MSRA

Zastoupení mutované alely u vzorků DNA izolované z krve jsme porovnali s jednotlivými metodami stanovení XCI. Výsledky jsou uvedeny na obr. 25.

U 12 vzorků byla detekována náhodná XCI u všech sond, které byly pro příslušné vzorky informativní, přičemž rozdíl mezi jednotlivými výsledky nepřesahoval 10 %. Čtyři vzorky vykazovaly nevyvážený poměr XCI pro všechny informativní sondy, rozdíl mezi výsledky rovněž nepřesahoval 10 %. Vzorky č. 15 a 29 jsou informativní pouze pro sondu RP2.

U 12 pacientek činil rozdíl mezi hodnotami informativních sond více než 10%, i přes tento rozdíl ukazovaly všechny sondy náhodnou XCI.

U zbývajících 4 vzorků nalézáme odlišné hodnoty procentuálního zastoupení mutované alely přesahující rozdíl 20 % získané jednotlivými sondami.



Obr. 25 Porovnání výsledků methyl-senzitivních restrikčních analýz a masivně paralelního sekvenování ze vzorků DNA izolovaných z krve. Výsledky jsou zaznamenány jako procentuální zastoupení mutované alely. Čísla 1-34 odpovídají číslům analyzovaných vzorků.

5.4 Závislost fenotypových příznaků FD na nevyvážené XCI

U 11 vybraných pacientek s různým stupněm fenotypových příznaků FD jsme provedli porovnání závažnosti těchto příznaků s výsledky stanovení XCI. K orgánům postiženým FD byly přiřazeny body, 2 body v případě důležitého orgánu, 1 bod v případě méně důležitého orgánu a 0 bodů, pokud orgán onemocněním poškozený nebyl. Součet těchto bodů z šesti pozorovaných orgánů představoval závažnost fenotypových příznaků a byl porovnán s výsledky stanovení XCI získanými MSRA a analýzou transkriptu. V tab. 14 jsou znázorněny výsledky metod studia XCI a závažnosti fenotypu FD u vybraných pacientek.

Tab. 14 Závažnost fenotypových příznaků u vybraných pacientek s FD.

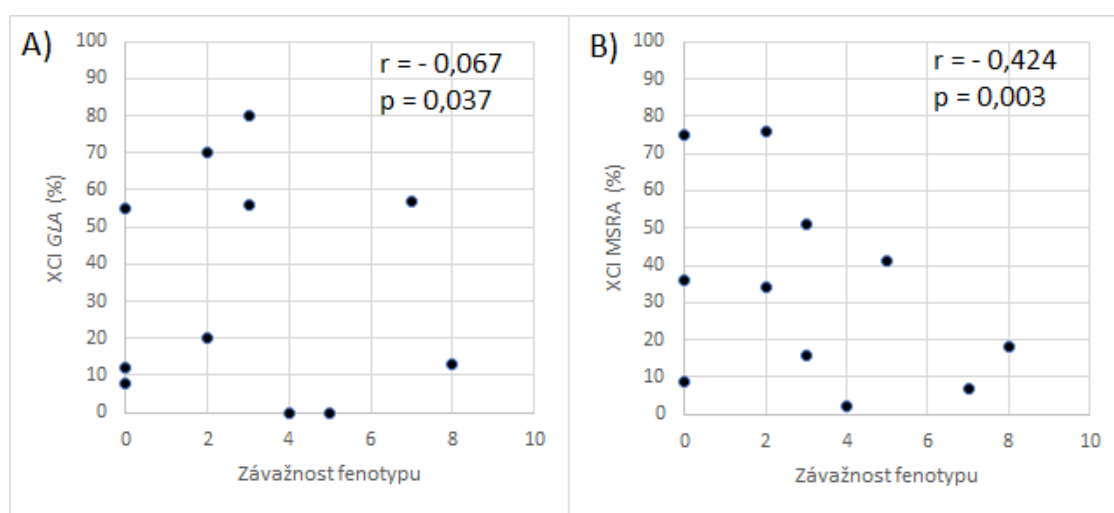
Č.	Věk	Mutace	Protein	Enzym	KS	GLA	Ø ASE	Ø MSRA
8	24	c.902G>A	p.Arg301Gln	32,1	0	8	11(1)	9(1)
22	45	c.277G>A	p.Asp93Asn	19	0	55	53(1)	81(2)
28	33	c. 881T>G	p.Leu294Ter	32,5	0	12	30(1)	36(2)
7	71	c.902G>A	p.Arg301Gln	13,9	2	70	*	76(1)
30	25	c.1025G>A	p.Arg342Gln	26,6	2	20	*	66(1)
27	58	c.511G>C	p.Gly171Arg	17,9	3	80	*	51(1)
33	67	c.1034dupT	p.Ser345Phefs*30	20,6	3	56	*	16(2)
3	68	c.1025G>A	p.Arg342Gln	57,4	4	0	1(1)	2(2)
18	61	c.559_560delAT	p.Met187Valfs*6	39,8	5	*	*	81(2)
15	54	c.801+3A>G	*	8,6	7	*	*	7(1)
5	54	c. 950T>C	p.Ile317Thr	32,2	8	13	*	18(2)

Enzym – enzymová aktivita (nmol/mg/h), KS – klinické skóre fenotypu (0 – bez postižení, 8 – max postižení), GLA – hodnoty získané analýzou mutace v genu GLA, Ø ASE – průměrná hodnota získaná analýzou alelově specifické exprese, analýzou polymorfismů genů IDS a LAMP2, ØMSRA – průměrná hodnota získaná methyl-senzitivními restrikčními metodami, (1) – počet informativních sond. Všechny mutace uvedené v tabulce jsou závažné, výjimkou je c.902G>A, která vykazuje reziduální aktivitu enzymu GLA.

U pacientky 8, která je bez klinických příznaků byla v periferní krvi exprimována převážně normální alela GLA, čemuž odpovídá i nevyvážená XCI a aktivita enzymu v oblasti kontrolních hodnot (32 – 89 nmol/mg/h). U této pacientky laboratorní nálezy z periferní krve korelují s fenotypem. U ostatních pacientek taková korelace z tabulky 14 nevyplývá. Navíc na druhém

konci klinického spektra - pacientka 5 s klinickým skóre 8, má laboratorní nálezy velmi obdobné jako asymptomatická pacientka 8.

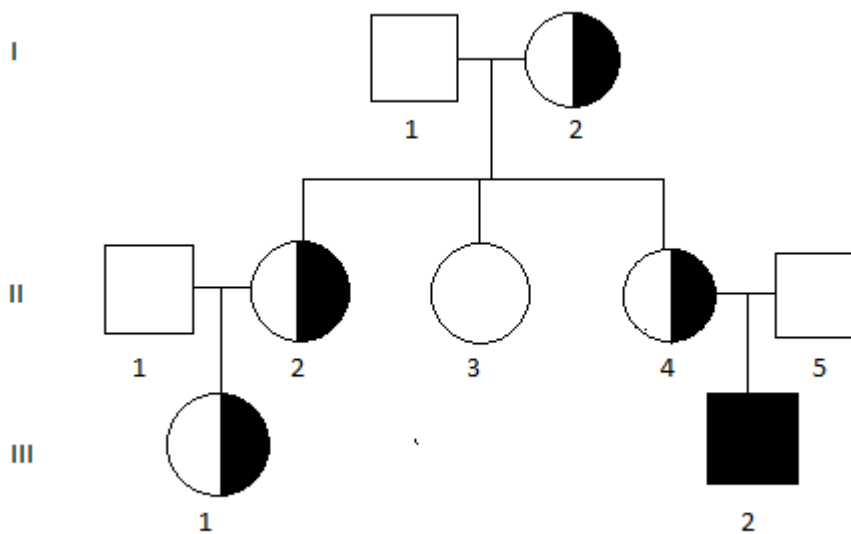
Fenotypové skóre jednotlivých pacientek jsme porovnali s výsledky analýzy genu *GLA* a MSRA pomocí PCC (obr. 30). V případě porovnání fenotypové závažnosti a přímé analýzy genu *GLA* (obr. 30a) pozorujeme hodnotu korelačního koeficientu $r = -0,067$ a hodnotu $p = 0,037$. Tento výsledek značí, že mezi sledovanými veličinami nebyl nalezen žádný vztah. U výsledků získanými MSRA je korelační koeficient $r = -0,424$ a hodnota $p = 0,003$.



Obr. 26 Korelace závažnosti fenotypu a XCI. A) Porovnání fenotypu a procentuálního zastoupení mutované alely získané přímou analýzou genu *GLA*. B)

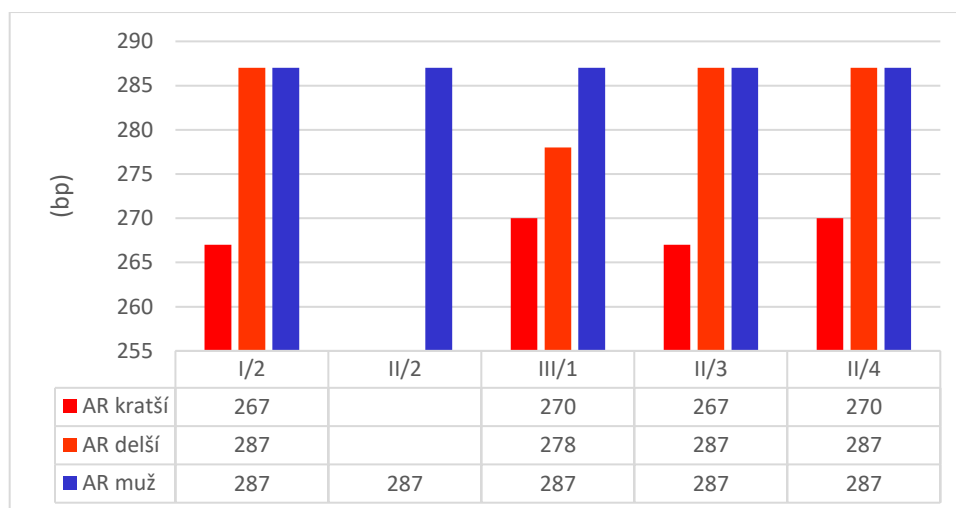
5.5 Studium XCI u rodiny s X-vázanou agamaglobulinémií

Stavu XCI byl sledován u pacientek s XLA z jedné rodiny (obr. 27). Proband III/2 je hemizygotem pro rozsáhlou delecí zasahující část genu *BTK*. Vzorky krve a bukalní stěrů byly neinvazivně odebrány širší rodině. Žena II/3 mutaci nese, III/1 je asymptomatická, pacientky I/2, II/2 a II/4 vykazují mírnější nebo závažnější symptomy XLA.

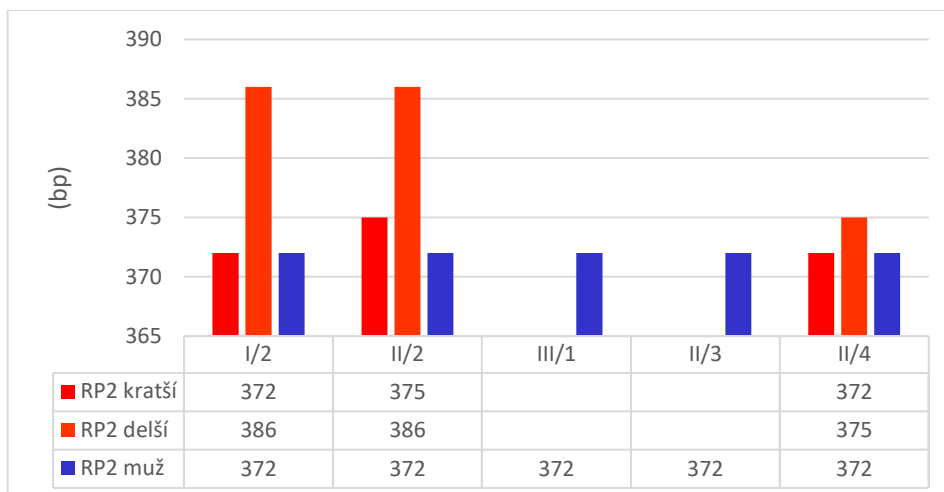


Obr. 27 Rodokmen sledované rodiny s XLA.

Vzhledem k povaze mutace (rozsáhlá delece) nebylo možné provést přímou analýzu transkriptu. U vzorků krve a bukalních stěrů byla provedena methyl-senzitivní restriční analýza v lokusech *AR* a *RP2*. Následně byly identifikovány mutantní alely pomocí vyšetření probanda (obr. 28 a obr. 29).



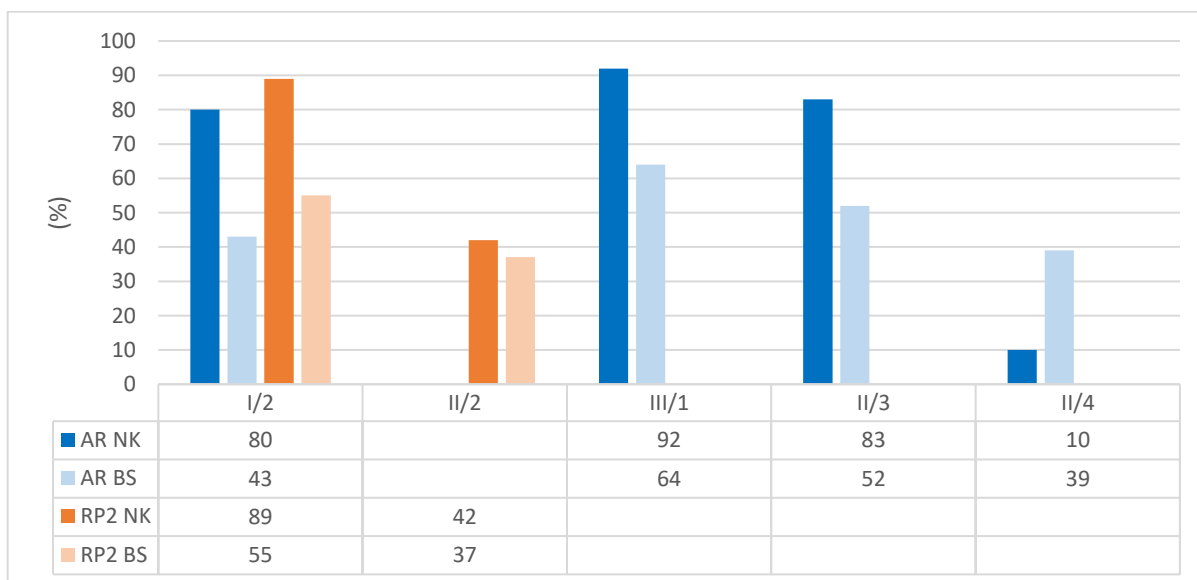
Obr. 28 Identifikace mutovaných alel pomocí vyšetření probanda u methyl-senzitivní restriční analýzy v lokusu *AR*. Červeně jsou značeny alely pacientek, modře alela probanda. Pacientka II/2 je pro *AR* neinformativní.



Obr. 29 Identifikace mutovaných alel pomocí vyšetření probanda u methyl-senzitivní restriční analýzy v lokusu *RP2*. Červeně jsou značeny alely pacientek, modře alela probanda. Pacientky III/1 a II/3 jsou pro *RP2* neinformativní.

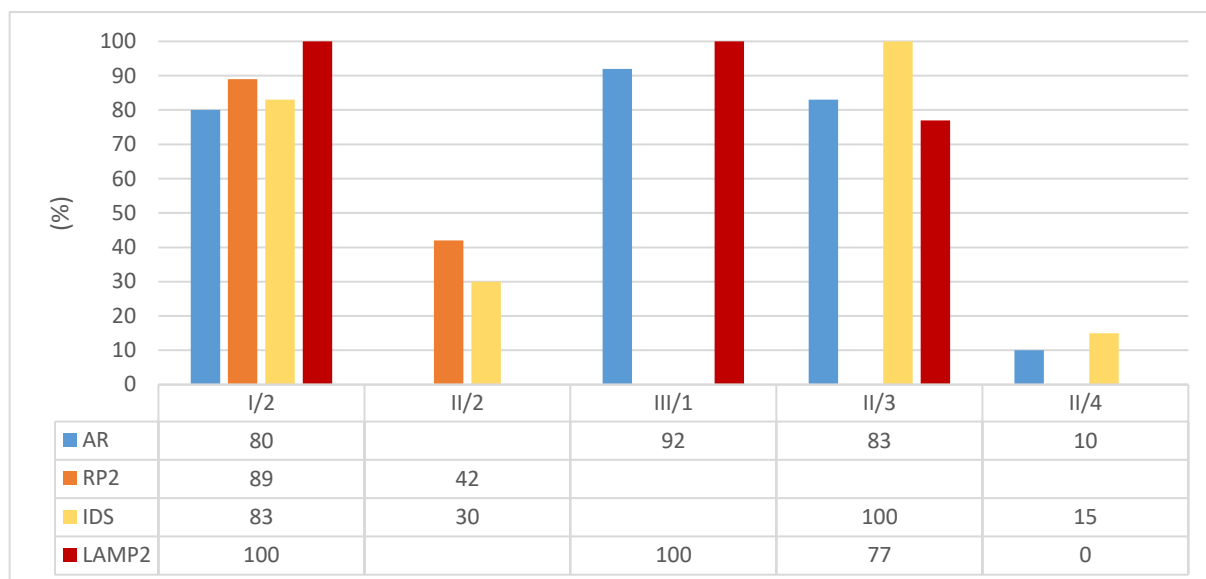
Analýzou pomocí methyl-senzitivních restričních sond jsme získali procentuální zastoupení mutovaných alel u pacientek studované rodiny s XLA (obr. 30).

V krvi pozorujeme nenáhodnou XCI ve prospěch mutované alely u pacientek I/2 a III/1, nevyváženou XCI pozorujeme i u ženy II/3, která mutaci nese. Pacientka II/4 naopak preferenčně využívá normální (divokou alelu), u pacientky II/2 je XCI náhodná. Procentuální zastoupení mutovaných alel získané ze vzorků DNA izolovaných z BS vykazují náhodnou XCI.



Obr. 30 Procentuální zastoupení mutované alely získané pomocí methyl-senzitivních restričních metod. Modrá a světle modrá barva odpovídá sondě AR v krvi a bukalním stěru, oranžová a světle oranžová značí sondu RP2 v krvi a bukalním stěru.

Vedle MSRA byla u těchto vzorků provedena nepřímá analýza poměru XCI s využitím polymorfismů genů *IDS* a *LAMP2* (obr. 31), výsledky ukazují dobrou shodu mezi metodami MSRA a ASE.



Obr. 31 Procentuální zastoupení mutované alely získané pomocí methyl-senzitivních restričních metod (*AR* a *RP2*) a pomocí masivně paralelního sekvenování transkriptu (*IDS* a *LAMP2*) u vzorků DNA izolovaných z krve.

6 Diskuze

Pomocí Sangerova sekvenování jsme detekovali heterozygotní mutace v genu *GLA* u 34 pacientek z 25 nepříbuzných rodin s Fabryho chorobou. Tento soubor vzorků jsme využili ke studiu exprese mutantních alel a stavu XCI.

Porovnávali jsme výsledky XCI získané dvěma metodickými přístupy (analýza transkriptu ve dvou polymorfních lokusech a methyl senzitivní analýza) a sledovali jejich korelaci s expresí mutované alely genu *GLA*.

Analýzu transkriptu pro gen *GLA* jsme provedli u 32 vzorků ze studovaného souboru pacientek s FD. Tento soubor jsme následně podrobili nepřímé analýze využívající polymorfismu v genu *IDS* (c.438C>T), pro který bylo heterozygotních 56 % pacientek. Tento výsledek odpovídá i frekvenci polymorfismu (rs1141608) v evropské populaci – 58 % (The 1000 Genomes Project Consortium et al., 2015). Stejný zdroj uvádí pro evropskou populaci téměř shodnou frekvenci polymorfismu v genu *LAMP2* (c.156A>T, rs12097) – 46%, v našem souboru pacientek jsme však detekovali informativnost pouze u 28 % vzorků. Nižší hodnota informativnosti může být ovlivněna malým počtem studovaných vzorků, který je dále snížen příbuzenskými vztahy mezi pacientkami nebo populační specifikou.

Ze souboru 32 vzorků cDNA analyzovaných masivně paralelním sekvenováním bylo 5 vzorků informativních pro oba polymorfismy, přičemž maximální rozdíl mezi oběma byl 14 %. Shodu do 10% jsme našli mezi výsledky u 14 pacientek (70 %). U pacientky č. 28 lze rozdíl 18 % mezi sondami *GLA* a *LAMP2* vysvětlit typem mutace, která způsobuje předčasné ukončení translace, a tedy pravděpodobně nonsense mediated decay (NMD).

Mezi výsledky přímé analýzy heterozygotní mutace v genu *GLA* a nepřímými analýzami SNP v genech *IDS* a *LAMP2* jsme vypočítali PCC. Korelační koeficienty mezi sondami *GLA/IDS* a *GLA/LAMP2* odpovídaly velmi silnému stupni lineární závislosti (0,96 a 0,90). Výsledek lze interpretovat tak, že u sledovaných genů nejsou žádné vlivy, které by podstatně ovlivňovaly transkripci (např. funkční polymorfismy v promotorech nebo NMD u mutované alely genu *GLA*). U dvojice nepřímých sond *IDS/LAMP2* dosahoval korelační koeficient rovněž vysoké hodnoty (0,93). Statistické výsledky korelačních koeficientů podporují teorii zaměnitelnosti

sond, avšak pro každý konkrétní případ je třeba zahrnout i hledisko biologické, jak bylo zmíněno výše. Z toho vyplývá, že výsledek z jedné sondy nemusí být dostačující.

Hodnoty enzymové aktivity α -gal A v leukocytech poskytnuté pracovníky Enzymologické laboratoře Diagnostických laboratoří DMP KDDL jsme porovnali s výsledky XCI získané přímou analýzou transkriptu *GLA*. U pacientek, které podle výsledků XCI vykazovaly preferenční expresi normální alely, byla naměřena fyziologická hodnota enzymové aktivity. Pacientka, u které byla normální alela výrazně preferenčně inaktivována, vykazovala velmi nízkou hodnotu enzymové aktivity. U pacientek s náhodnou XCI byl zaznamenán velký rozptyl hodnot enzymových aktivit od velmi nízkých po fyziologické. Srovnatelné výsledky publikovali Echevarria a kolektiv ve své studii v roce 2016 u 54 pacientek s FD (Echevarria et al., 2016). Korelační koeficient mezi hodnotami aktivity enzymu a poměrem XCI jsme vypočítali na 0,70 značící střední míru korelace (Chráška, 2000). Tato hodnota může být vysvětlena širokým rozptylem hodnot enzymové aktivity u zdravých osob (32–89 nmol/h/mg).

Vedle analýzy transkriptu byla část této práce věnována methyl-senzitivním restričními metodám. Nejprve jsme stanovili informativnost sond, přičemž sonda MSRA je hodnocena jako informativní, pokud se alely obsahující vysoce repetitivní motivy liší o alespoň dvě opakování motivu CAG pro lokus *AR* (Allen et al., 1992), jedno opakování motivu GAAA v lokusu *RP2* (Machado et al., 2014) a dvě opakování repetitivního motivu GCA v lokusu *CNKSR2* (Musalkova et al., 2015).

V lokusu *AR* jsme detekovali informativnost 62 %. Ve studii z roku 2006 ve studii testovaných 1284 pacientek vykazovalo informativnost pro metodu HUMARA 78 % (Amos-Landgraf et al., 2006). Z našeho souboru studovaných vzorků bylo pro lokus *RP2* informativních 59 %. Machado a kolektiv ve své studii detekovali informativnost tohoto lokusu u 73 % zdravých holandských žen (Machado et al., 2014). Hodnoty informativnosti v lokusu *AR* a *RP2* získané v průběhu naší studie jsou nižší než hodnoty nalezené v literatuře, což je, stejně jako v případě polymorfismů v *IDS* a *LAMP2*, pravděpodobně způsobeno nižším počtem testovaných vzorků, příbuzenskými vztahy mezi pacientkami nebo populační specifitou. Informativnost v lokusu *CNKSR2* byla mnohem nižší než u přechozích dvou sond (24 %). Podobné hodnoty (18 %) dosáhli Mušalková a kolektiv při testování využití tohoto lokusu při stanovení XCI u sta pacientek (Musalkova et al., 2015).

Při použití všech tří sond ke stanovení poměru XCI jsme získali 82 % vzorků informativních pro alespoň jednu ze sledovaných metod. Z těchto výsledků je patrné, že použití více methyl-senzitivních sond pro stanovení stavu XCI zvyšuje pravděpodobnost záchytu informativního výsledku.

Pro identifikaci mutovaných alel v metodě MSRA jsme použili vyšetření probandů – hemizygotů. Porovnáním délky alely probanda s délkami alel heterozygotní ženy jsme identifikovali mutované alely u 17 vzorků pro lokus *AR* a 7 vzorků pro lokus *RP2*. U 2 vzorků pro lokus *AR* a 4 vzorků lokusu *RP2* jsme zjistili stav, kdy žádná z alel heterozygotní pacientky neodpovídala mutované alele probanda. Odlišné délky alel mohly být způsobeny sklouznutím DNA polymerázy při replikaci během meiotického dělení (McMurray, 2010). Dalším možným vysvětlením je vzdálený příbuzenský vztah mezi heterozygotní ženou a probandem.

Pro methyl-senzitivní analýzu bylo možné z hlediska informativnosti použít 28 z celkového souboru 34 vzorků krve pacientek s Fabryho chorobou. MSRA v krvi odhalila nevyváženou XCI u 25 % pacientek. Podobných výsledků dosáhli i další autoři při studiu XCI v krvi ve větších souborech pacientek s FD (Elstein et al., 2012; Echevarria et al., 2016). Ze 17 vzorků, které byly informativní pro ≥ 2 metody, jsme u 5 odhalili menší či větší odchylky ve výsledných poměrech získaných různými metodami. Dva vzorky vykazovaly rozdíl 13 % a 20 % jedné ze sond. U dalších třech vzorků jsme rovněž detekovali odchylku jedné ze stanovovaných sond, avšak tato sonda byla hodnocena jako částečně informativní a poměr XCI byl vypočítán pouze z plochy nejvyššího píku.

Analýza stavu XCI u vzorků DNA izolovaných z BS odhalila pouze jeden nevyvážený poměr, paradoxně u vzorku, který byl ve vzorku krve hodnocen jako náhodný stav XCI. Odchylky ve výsledcích získaných různými sondami jsme pozorovali u 2 vzorků, v jednoho z nich lze odchylka vysvětlit částečnou informativností, u druhého i přes rozdíl 14 % vykazují sondy náhodný stav XCI.

Lze tedy shrnout, že mezi výsledky XCI u vzorků krve jsme získali 71 % případů, kdy se stanovení různými sondami lišilo maximálně o 10 %. Pokud bychom z analýzy vyřadili vzorky, které jsou částečně informativní, našli bychom shodné výsledky u 88 % vzorků. V případě vzorků BS byly tyto hodnoty vyšší, rozdíl hodnot XCI zjištěné několika sondami do 10 % byl stanoven u 87 % vzorků a v případě vyřazení částečně informativních výsledků 93 %.

V literatuře jsou však hodnoceny vzorky lišící se o 1 nebo 2 opakování CAG motivu pro metodu HUMARA využívány k detekci stavu XCI (Swierczek et al., 2012). Z našich výsledků MSRA vyplývá, že při interpretaci částečně informativních vzorků je třeba brát v úvahu jejich omezenou vypovídající hodnotu.

HUMARA je nejlépe charakterizovanou a nejvíce používanou methyl-senzitivní restriční metodou (Chen and Prchal, 2007), není však informativní pro celé spektrum pacientek (Allen et al., 1992). V této práci jsme kromě MSRA v genu *AR* využili i dalších polymorfismů, a to v genech *RP2* a *CNKSR2* a následně jsme sledovali zaměnitelnost sond v krvi a bukálních stěrech. Přestože byl PCC počítán i včetně částečně informativních vzorků, jsou výsledné hodnoty uspokojivé. Mezi hodnotami získanými sondami *AR* a *RP2* činila hodnota PCC 0,89 u vzorků NK a 0,84 u vzorků BS. Pokud bychom vyřadili částečně informativní data, hodnota PCC mezi sondami *AR* a *RP2* u vzorků krve by se zvýšila na 0,93, naopak mezi těmito sondami ve vzorcích BS by se hodnota PCC snížila na 0,83. Zaměnitelnost sond *AR* a *RP2* byla měřena i ve studii z roku 2014, kde korelační koeficient mezi sondami *AR* a *RP2* odpovídá našemu výsledku (Machado et al., 2014).

PCC počítaný u sond *AR* a *CNKSR2* činil 0,87 u vzorků krve a 0,92 u vzorků bukálních stěrů. Z důvodu nízkého počtu vzorků informativních současně pro tyto dvě sondy nebylo možné vypočítat PCC při vyřazení částečně informativních vzorků. Zaměnitelnost těchto sond byla měřena ve studii Mušálkové a kolektivu v roce 2015, PCC byl vypočten na 0,87 ze vzorků DNA izolovaných z periferní krve (Musalkova et al., 2015). PCC u sond *RP2/CNKSR2* vykazoval hodnoty 0,94 u vzorků krve a 0,76 u vzorků BS. U těchto sond rovněž nebylo možné vypočítat PCC bez částečně informativních výsledků. Nižší hodnota r u vzorků BS může souviset s nízkým počtem stanovovaných vzorků nebo zde svou roli hraje i částečná informativnost.

U sond *AR*, *RP2* a *CNKSR2* byla testována i tkáňová specifita. U metody HUMARA se vzorky NK a BS shodují v 9 případech (47 %). Methyl-senzitivní analýzou byla detekována shoda do 10 % v genu *RP2* u 5 vzorků (27 %) a v genu *CNKSR2* u 1 pacientky (14 %). V jiných studiích, ve kterých byla metodou HUMARA testována tkáňová specifita mezi krví a bukálními stěry, vykazoval PCC střední až vysoký stupeň korelace 0,60 – 0,80 (Knudsen et al., 2007; Bolduc et al., 2008; de Hoon et al., 2015) Korelační koeficient mezi vzorky krve a bukálních stěrů pro metodu HUMARA nevykazoval u našich pacientek téměř žádnou korelaci (0,08).

Liší se hodnoty XCI získané z krve a bukalních stěrů popisuje i Sharp a kolektiv, kde je vysvětlení pozorovaného jevu zvyšování nevyváženého poměru XCI v krvi způsobeno vlivem sekundární XCI s rostoucím věkem (Sharp et al., 2000).

Výsledné poměry XCI získané pomocí metod masivně paralelního sekvenování jsme porovnávali s výsledky methyl-senzitivních restrikčních analýz. Na základě uvedených výsledků lze konstatovat, že jednotlivé sody jsou vzájemně zastupitelné. U většiny případů, které vykazovaly větší odchylky lze najít vysvětlení – NMD u mutované alely genu *GLA*, částečnou informativností sondy, chybou metody.

U 11 vybraných pacientek, u kterých byl detekován posun v XCI v krvi nebo BS, bylo stanoveno klinické skóre fenotypu Fabryho choroby. Celkové skóre jsme porovnali s výsledky získanými kvantifikací transkriptu genu *GLA*, průměrnou hodnotou XCI stanovenou MSRA a průměrnou hodnotou ASE. V našem souboru pacientek byl bezpříznakový fenotyp hodnocen jako 0, nejzávažnější pozorovaný fenotyp byl hodnocen číslem 8. Lineární vztah mezi fenotypem a transkriptem genu *GLA* byl téměř nulový. Preferenčně exprimovanou divokou alelu vykazovaly pacientky s celým spektrem fenotypů (hodnoty skóre 0, 4, 5, 7 a 8). Obdobné výsledky jsme získali při vyhodnocení MSRA sond.

V literatuře je popisována korelace mezi fenotypovým skóre onemocnění a stavem XCI u pacientek s FD (Dobrovolný et al., 2005; Echevarria et al., 2016). Tato korelace u našich výsledků nebyla prokázána. Naše výsledky jsou naopak v souladu s publikací (Maier et al., 2006). Manifestaci choroby vedle aktivity enzymu a inaktivace chromozomu X ovlivňují i další faktory, jako typ konkrétní mutace v genu *GLA*, věk pacientky, studovaná tkáň či sociální a environmentální prostředí.

Kromě pacientek s Fabryho chorobou jsme studovali inaktivaci chromozomu X u pěti pacientek z jedné rodiny s X-vázanou agamaglobulinémií způsobenou mutací v genu *BTK*. Přímá analýza genu *BTK* nebyla provedena, neboť se jedná o mutaci v genu *BTK* způsobenou delecí 25kbp zasahující 18. a 19. exon. Kvůli takto velké delecí nelze pomocí masivně paralelního sekvenování hodnotit stav XCI v tomto lokusu.

Informativnost MSRA u vzorků pacientek s XLA činila 80 % pro lokus *AR* a 60 % pro lokus *RP2*. Použití těchto dvou sond však ukázalo 100 % informativnost alespoň pro 1 metodu.

Hodnoty informativnosti MSRA u této rodiny nejsou statisticky signifikantní vzhledem k příbuzenskému vztahu studovaných pacientek a nízkého počtu analyzovaných vzorků.

Analýza BS ukázala u všech pacientek bez ohledu na jejich fenotypové projevy náhodnou XCI, tento materiál není vhodný pro vysvětlení klinických příznaků pacientek s XLA. U pacientky I/2 s nejvyšší mírou postižení byla v krvi preferenčně inaktivovaná divoká alela, u pacientek s mírnými projevy onemocnění byla zjištěná náhodná XCI (II/2) nebo byla preferenčně inaktivovaná mutovaná alela. Nejmladší pacientka je asymptomatická, U pacientky III/1 byla preferenčně je inaktivovaná divoká alela, pacientka je asymptomatická, je otázkou, zda se fenotyp projeví s rostoucím věkem. Uvedené výsledky ukazují určitou korelaci mezi tíží klinického postižení XLA a XCI, soubor pacientek je však malý. Navíc hodnota XCI měřená v krvi může být u tohoto onemocnění ovlivněna sekundární XCI (Takada et al., 2004).

7 Závěr

V rámci této práce jsme studovali expresi mutantních alel a stav X inaktivace u 34 pacientek s FD a 5 pacientek s XLA. Poprvé jsme použili analýzu transkriptu v místě mutace genu *GLA* ke stanovení poměru alel a odhalili vysokou zastupitelnost s metodami založenými na relativní kvantifikaci transkriptu využívající SNP v genech *IDS* a *LAMP2* a methyl-senzitivními restričními analýzami v lokusech *AR*, *RP2* a *CNKSR2*. I přes vysoký stupeň zaměnitelnosti doporučujeme ke stanovení poměru XCI využití alespoň 3 různých sond, neboť v některých případech sondy vykazují hodnoty poměru alel, které nemusí odpovídat skutečnému stavu XCI. Detekovali jsme tkáňovou specifitu u vzorků krve a bukálních stěrů, výsledné poměry XCI získané z obou tkání vykazovaly jen velmi nízký stupeň korelace.

Míra exprese genu *GLA* v krvi odpovídala hodnotám aktivity enzymu α -gal A.

Výsledky ukazují, že relativní exprese mutované alely *GLA* ani stav XCI v krvi a bukálních stěrech nejsou vhodnými biomarkery, které by mohly přispět k objasnění rozdílné manifestace klinických příznaků u pacientek s Fabryho chorobou nebo k predikci vývoje onemocnění. Roli zde hrají další faktory, jako je typ mutace, věk pacientky, sociální a environmentální prostředí. U pacientek s X-vázanou agamaglobulinémií jsme pozorovali určitou korelaci mezi klinickými příznaky pacientek a stavem XCI, soubor vyšetřených vzorků však byl malý a k významu XCI jako prediktivnímu markeru se nelze vyjádřit.

8 Seznam zkratek

α -gal A	enzym α -galakatosidáza A
AR	androgenový receptor
ASE	alelově specifická exprese
BTK	Brutonova tyrosinkináza
cDNA	komplementární DNA
CNKS2	connector enhancer of kinase supressor of Ras 2
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ERT	enzymová substituční terapie (enzyme replacement therapy)
Gb3	globotriaosylceramid
GLA	galaktosidáza alfa
HUMARA	human androgen receptor assay
IDS	iduronát-2-sulfatáza
LAMP2	lyzozomální membránový protein 2
MPS	masivně paralelní sekvenování
MSRA	methyl-senzitivní restrikční analýza
NMD	nonsense mediated mRNA decay, pretranslační proces zabraňující tvorbě zkrácených proteinů
PAR	pseudoautozomální oblast
PCC	Pearsonův korelační koeficient
PCR	polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
RP2	retinitis pigmentosa 2
RT-PCR	PCR následující po reversní transkripci, využívá cDNA jako templát
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
Xa	aktivní chromozom X
XCI	inaktivace chromozomu X
Xi	inaktivovaný chromozom X
XIC	x inaktivační centrum

XIST	x inaktivační specifický transkript
XLA	X-vázaná agamaglobulinémie
Xp	krátké raménko chromozomu X
Xq	dlouhé raménko chromozomu X

9 Seznam literatury

- Abdelkrim, J., Robertson, B.C., Stanton, J.-A.L., and Gemmell, N.J. (2009). Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *BioTechniques* 46, 185–192.
- Allen, R.C., Zoghbi, H.Y., Moseley, A.B., Rosenblatt, H.M., and Belmont, J.W. (1992). Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am. J. Hum. Genet.* 51, 1229–1239.
- Amos-Landgraf, J.M., Cottle, A., Plenge, R.M., Friez, M., Schwartz, C.E., Longshore, J., and Willard, H.F. (2006). X Chromosome–Inactivation Patterns of 1,005 Phenotypically Unaffected Females. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 493–499.
- Anderson, C.L., and Brown, C.J. (1999). Polymorphic X-chromosome inactivation of the human TIMP1 gene. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 699–708.
- Arends, M., Wanner, C., Hughes, D., Mehta, A., Oder, D., Watkinson, O.T., Elliott, P.M., Linthorst, G.E., Wijburg, F.A., Biegstraaten, M., et al. (2017). Characterization of Classical and Nonclassical Fabry Disease: A Multicenter Study. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 28, 1631–1641.
- Bach, I., Rodriguez-Esteban, C., Carrière, C., Bhushan, A., Krones, A., Rose, D.W., Glass, C.K., Andersen, B., Belmonte, J.C.I., and Rosenfeld, M.G. (1999). RLIM inhibits functional activity of LIM homeodomain transcription factors via recruitment of the histone deacetylase complex. *Nat. Genet.* 22, 394–399.
- Bachtrog, D., Mank, J.E., Peichel, C.L., Kirkpatrick, M., Otto, S.P., Ashman, T.-L., Hahn, M.W., Kitano, J., Mayrose, I., Ming, R., et al. (2014). Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It? *PLoS Biol.* 12, e1001899.
- Bailey, J.A., Carrel, L., Chakravarti, A., and Eichler, E.E. (2000). Molecular evidence for a relationship between LINE-1 elements and X chromosome inactivation: The Lyon repeat hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6634–6639.
- Barakat, T.S., Gunhanlar, N., Gontan Pardo, C., Achame, E.M., Ghazvini, M., Boers, R., Kenter, A., Rentmeester, E., Grootegoed, J.A., and Gribnau, J. (2011). RNF12 Activates Xist and Is Essential for X Chromosome Inactivation. *PLoS Genet.* 7, e1002001.
- Berletch, J.B., Yang, F., Xu, J., Carrel, L., and Disteche, C.M. (2011). Genes that escape from X inactivation. *Hum. Genet.* 130, 237–245.
- Bird, A.P. (1980). DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res.* 8, 1499–1504.
- Bird, S., Hadjimichael, E., Mehta, A., Ramaswami, U., and Hughes, D. (2017). Fabry disease and incidence of cancer. *Orphanet J. Rare Dis.* 12, 150.

- Bolduc, V., Chagnon, P., Provost, S., Dubé, M.-P., Belisle, C., Gingras, M., Mollica, L., and Busque, L. (2008). No evidence that skewing of X chromosome inactivation patterns is transmitted to offspring in humans. *J. Clin. Invest.* *118*, 333–341.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., and Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* *32*, 314–331.
- Branton, M.H., Schiffmann, R., Sabnis, S.G., Murray, G.J., Quirk, J.M., Altarescu, G., Goldfarb, L., Brady, R.O., Balow, J.E., Austin, H.A., et al. (2002). Natural History of Fabry Renal Disease: Influence of α -Galactosidase A Activity and Genetic Mutations on Clinical Course. *Medicine (Baltimore)* *81*, 122–138.
- Brenet, F., Moh, M., Funk, P., Feierstein, E., Viale, A.J., Socci, N.D., and Scandura, J.M. (2011). DNA Methylation of the First Exon Is Tightly Linked to Transcriptional Silencing. *PLoS ONE* *6*, e14524.
- Brown, C.J., Ballabio, A., Rupert, J.L., Lafreniere, R.G., Grompe, M., Tonlorenzi, R., and Willard, H.F. (1991). A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* *349*, 38–44.
- Brown, C.J., Hendrich, B.D., Rupert, J.L., Lafrenière, R.G., Xing, Y., Lawrence, J., and Willard, H.F. (1992). 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* *71*, 527–542.
- Burlina, A.P., Sims, K.B., Politei, J.M., Bennett, G.J., Baron, R., Sommer, C., Møller, A.T., and Hilz, M.J. (2011). Early diagnosis of peripheral nervous system involvement in Fabry disease and treatment of neuropathic pain: the report of an expert panel. *BMC Neurol.* *11*, 61.
- Busque, L., Zhu, J., DeHart, D., Griffith, B., Willman, C., Carroll, R., Black, P.M., and Gilliland, D.G. (1994). An expression based clonality assay at the human androgen receptor locus (HUMARA) on chromosome X. *Nucleic Acids Res.* *22*, 697–698.
- Calaway, J.D., Lenarcic, A.B., Didion, J.P., Wang, J.R., Searle, J.B., McMillan, L., Valdar, W., and Villena, F.P.-M. de (2013). Genetic Architecture of Skewed X Inactivation in the Laboratory Mouse. *PLOS Genet.* *9*, e1003853.
- Carrel, L., and Willard, H.F. (1999). Heterogeneous gene expression from the inactive X chromosome: An X-linked gene that escapes X inactivation in some human cell lines but is inactivated in others. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 7364–7369.
- Carrel, L., and Willard, H.F. (2005). X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* *434*, 400–404.
- Chabchoub, G. (2013). X chromosome inactivation and autoimmune diseases. *World J. Rheumatol.* *3*, 12–15.

- Chen, G.L., and Prchal, J.T. (2007). X-linked clonality testing: interpretation and limitations. *Blood* 110, 1411–1419.
- Chen, P.Y., and Popovich, P.M. (2002). *Correlation: parametric and nonparametric measures* (Sage Publications).
- Chitnis, S., Monteiro, J., Glass, D., Apatoff, B., Salmon, J., Concannon, P., and Gregersen, P.K. (2000). The role of X-chromosome inactivation in female predisposition to autoimmunity. *Arthritis Res.* 2, 399–406.
- Chow, J.C., Hall, L.L., Clemson, C.M., Lawrence, J.B., and Brown, C.J. (2003). Characterization of expression at the human XIST locus in somatic, embryonal carcinoma, and transgenic cell lines. *Genomics* 82, 309–322.
- Chráska, M. (2000). *Základy výzkumu v pedagogice* (Olomouc: Univerzita Palackého).
- Chureau, C., Prissette, M., Bourdet, A., Barbe, V., Cattolico, L., Jones, L., Eggen, A., Avner, P., and Duret, L. (2002). Comparative Sequence Analysis of the X-Inactivation Center Region in Mouse, Human, and Bovine. *Genome Res.* 12, 894–908.
- Clemson, C.M., McNeil, J.A., Willard, H.F., and Lawrence, J.B. (1996). XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J. Cell Biol.* 132, 259–275.
- Clemson, C.M., Chow, J.C., Brown, C.J., and Lawrence, J.B. (1998). Stabilization and Localization of Xist RNA are Controlled by Separate Mechanisms and are Not Sufficient for X Inactivation. *J. Cell Biol.* 142, 13–23.
- Cotton, A.M., Ge, B., Light, N., Adoue, V., Pastinen, T., and Brown, C.J. (2013). Analysis of expressed SNPs identifies variable extents of expression from the human inactive X chromosome. *Genome Biol.* 14, R122.
- Deng, X., Berletch, J.B., Nguyen, D.K., and Disteche, C.M. (2014). X chromosome regulation: diverse patterns in development, tissues and disease. *Nat. Rev. Genet.* 15, 367–378.
- Desai, V., Donsante, A., Swoboda, K., Martensen, M., Thompson, J., and Kaler, S. (2011). Favorably skewed X-inactivation accounts for neurological sparing in female carriers of Menkes disease. *Clin. Genet.* 79, 176–182.
- Desnick, R.J., Banikazemi, M., and Wasserstein, M. (2002). Enzyme replacement therapy for Fabry disease, an inherited nephropathy. *Clin. Nephrol.* 57, 1–8.
- Desnick, R.J., Brady, R., Barranger, J., Collins, A.J., Germain, D.P., Goldman, M., Grabowski, G., Packman, S., and Wilcox, W.R. (2003). Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder: expert recommendations for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy. *Ann. Intern. Med.* 138, 338–346.

- Desnick, R.J., Ioannou, Y.A., and Eng, C.M. (2014). α -Galactosidase A Deficiency: Fabry Disease. In *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, (New York), pp. 419–430.
- Disteche, C.M. (1997). The great escape. *Am. J. Hum. Genet.* *60*, 1312–1315.
- Disteche, C., and Berletch, J.B. (2015). X-chromosome inactivation and escape. *J. Genet.* *94*, 591–599.
- Dobrovolný, R., Dvorakova, L., Ledvinová, J., Magage, S., Bultas, J., Lubanda, J.-C., Elleder, M., Karetová, D., Pavlikova, M., and Hrebicek, M. (2005). Relationship between X-inactivation and clinical involvement in Fabry heterozygotes. Eleven novel mutations in the α -galactosidase A gene in the Czech and Slovak population. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *83*, 647–654.
- Dobyns, W.B., Filauro, A., Tomson, B.N., Chan, A.S., Ho, A.W., Ting, N.T., Oosterwijk, J.C., and Ober, C. (2004). Inheritance of most X-linked traits is not dominant or recessive, just X-linked. *Am. J. Med. Genet.* *129A*, 136–143.
- Duro, G., Zizzo, C., Cammarata, G., Burlina, A., Burlina, A., Polo, G., Scalia, S., Oliveri, R., Sciarrino, S., Francofonte, D., et al. (2018). Mutations in the GLA Gene and LysoGb3: Is It Really Anderson-Fabry Disease? *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 3726.
- Echevarria, L., Benistan, K., Toussaint, A., Dubourg, O., Hagege, A. a., Eladari, D., Jabbour, F., Beldjord, C., De Mazancourt, P., and Germain, D. p. (2016). X-chromosome inactivation in female patients with Fabry disease. *Clin. Genet.* *89*, 44–54.
- Elleder, M., Bradová, V., Smíd, F., Buděšínský, M., Harzer, K., Kustermann-Kuhn, B., Ledvinová, J., Bělohávek, null, Král, V., and Dorazilová, V. (1990). Cardiocyte storage and hypertrophy as a sole manifestation of Fabry's disease. Report on a case simulating hypertrophic non-obstructive cardiomyopathy. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* *417*, 449–455.
- Elstein, D., Schachamorov, E., Beeri, R., and Altarescu, G. (2012). X-inactivation in Fabry disease. *Gene* *505*, 266–268.
- Eng, C.M., Guffon, N., Wilcox, W.R., Germain, D.P., Lee, P., Waldek, S., Caplan, L., Linthorst, G.E., and Desnick, R.J. (2001). Safety and Efficacy of Recombinant Human α -Galactosidase A Replacement Therapy in Fabry's Disease. *N. Engl. J. Med.* *345*, 9–16.
- Eng, C.M., Germain, D.P., Banikazemi, M., Warnock, D.G., Wanner, C., Hopkin, R.J., Bultas, J., Lee, P., Sims, K., Brodie, S.E., et al. (2006). Fabry disease: guidelines for the evaluation and management of multi-organ system involvement. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* *8*, 539–548.
- Eng, C.M., Fletcher, J., Wilcox, W.R., Waldek, S., Scott, C.R., Sillence, D.O., Breunig, F., Charrow, J., Germain, D.P., Nicholls, K., et al. (2007). Fabry disease: baseline medical characteristics of a cohort of 1765 males and females in the Fabry Registry. *J. Inherit. Metab. Dis.* *30*, 184–192.

- Ercan, S. (2015). Mechanisms of X Chromosome Dosage Compensation. *J. Genomics* 3, 1–19.
- Escamilla-Del-Arenal, M., da Rocha, S.T., and Heard, E. (2011). Evolutionary diversity and developmental regulation of X-chromosome inactivation. *Hum. Genet.* 130, 307–327.
- Fieremans, N., Van Esch, H., Holvoet, M., Van Goethem, G., Devriendt, K., Rosello, M., Mayo, S., Martinez, F., Jhangiani, S., Muzny, D.M., et al. (2016). Identification of intellectual disability genes in female patients with a skewed X inactivation pattern. *Hum. Mutat.* 37, 804–811.
- Fogo, A.B., Bostad, L., Svarstad, E., Cook, W.J., Moll, S., Barbey, F., Geldenhuys, L., West, M., Ferluga, D., Vujkovic, B., et al. (2010). Scoring system for renal pathology in Fabry disease: report of the International Study Group of Fabry Nephropathy (ISGFN). *Nephrol. Dial. Transplant.* 25, 2168–2177.
- Gelbart, M.E., and Kuroda, M.I. (2009). *Drosophila* dosage compensation: a complex voyage to the X chromosome. *Dev. Camb. Engl.* 136, 1399–1410.
- Germain, D.P. (2006). General aspects of X-linked diseases. In *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*, A. Mehta, M. Beck, and G. Sunder-Plassmann, eds. (Oxford: Oxford PharmaGenesis), p.
- Gibas, A.L., Klatt, R., Johnson, J., Clarke, J.T., and Katz, J. (2006). A survey of the pain experienced by males and females with Fabry disease. *Pain Res. Manag. J. Can. Pain Soc.* 11, 185–192.
- Haliem, E.A., and Al-Huqail, A.A. (2013). Comparative sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and restricted fragment length polymorphism among fenugreek accessions. *Genet. Mol. Res.* 12, 6284–6298.
- Hall, E., Volkov, P., Dayeh, T., Esguerra, J.L.S., Salö, S., Eliasson, L., Rönn, T., Bacos, K., and Ling, C. (2014). Sex differences in the genome-wide DNA methylation pattern and impact on gene expression, microRNA levels and insulin secretion in human pancreatic islets. *Genome Biol.* 15, 522.
- de Hoon, B., Monkhorst, K., Riegman, P., Laven, J.S.E., and Gribnau, J. (2015). Buccal swab as a reliable predictor for X inactivation ratio in inaccessible tissues. *J. Med. Genet.* 52, 784–790.
- de Hoon, B., Splinter, E., Eussen, B., Douben, J.C.W., Rentmeester, E., van de Heijning, M., Laven, J.S.E., de Klein, J.E.M.M., Liebelt, J., and Gribnau, J. (2017). X chromosome inactivation in a female carrier of a 1.28 Mb deletion encompassing the human X inactivation centre. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372, e20160359.
- Hopkin, R.J., Bissler, J., Banikazemi, M., Clarke, L., Eng, C.M., Germain, D.P., Lemay, R., Tytki-Szymanska, A., and Wilcox, W.R. (2008). Characterization of Fabry disease in 352 pediatric patients in the Fabry Registry. *Pediatr. Res.* 64, 550–555.

- Houge, G., Rasmussen, I.H., and Hovland, R. (2012). Loss-of-Function CNKSR2 Mutation Is a Likely Cause of Non-Syndromic X-Linked Intellectual Disability. *Mol. Syndromol.* 2, 60–63.
- Ishii, S., Nakao, S., Minamikawa-Tachino, R., Desnick, R.J., and Fan, J.-Q. (2002). Alternative Splicing in the α -Galactosidase A Gene: Increased Exon Inclusion Results in the Fabry Cardiac Phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 994–1002.
- Jäger, N., Schlesner, M., Jones, D.T.W., Raffel, S., Mallm, J.-P., Junge, K.M., Weichenhan, D., Bauer, T., Ishaque, N., Kool, M., et al. (2013). Hypermethylation of the Inactive X Chromosome Is a Frequent Event in Cancer. *Cell* 155, 567–581.
- Jonkers, I., Barakat, T.S., Achame, E.M., Monkhorst, K., Kenter, A., Rentmeester, E., Grosveld, F., Grootegoed, J.A., and Gribnau, J. (2009). RNF12 Is an X-Encoded Dose-Dependent Activator of X Chromosome Inactivation. *Cell* 139, 999–1011.
- Kampmann, C., Linhart, A., Baehner, F., Palecek, T., Wiethoff, C.M., Miebach, E., Whybra, C., Gal, A., Bultas, J., and Beck, M. (2008). Onset and progression of the Anderson-Fabry disease related cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.* 130, 367–373.
- Knudsen, G.P.S., Pedersen, J., Klingenberg, O., Lygren, I., and Ørstavik, K.H. (2007). Increased skewing of X chromosome inactivation with age in both blood and buccal cells. *Cytogenet. Genome Res.* 116, 24–28.
- Kramer, M., Kranz, A.-L., Su, A., Winterkorn, L.H., Albritton, S.E., and Ercan, S. (2015). Developmental Dynamics of X-Chromosome Dosage Compensation by the DCC and H4K20me1 in *C. elegans*. *PLoS Genet.* 11, e1005698.
- Kramer, M., Rao, P., and Ercan, S. (2016). Untangling the Contributions of Sex-Specific Gene Regulation and X-Chromosome Dosage to Sex-Biased Gene Expression in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 204, 355–369.
- Lee, J.T. (2000). Disruption of imprinted X inactivation by parent-of-origin effects at Tsix. *Cell* 103, 17–27.
- Lee, K. (2003). A biochemical and pharmacological comparison of enzyme replacement therapies for the glycolipid storage disorder Fabry disease. *Glycobiology* 13, 305–313.
- Lee, J., Rhee, M., Min, T.K., Bang, H.I., Jang, M.-A., Kang, E.-S., Kim, H.-J., Yang, H.-J., and Pyun, B.Y. (2016). A novel BTK gene mutation, c.82delC (p.Arg28 Alafs*5), in a Korean family with X-linked agammaglobulinemia. *Korean J. Pediatr.* 59, S49–S52.
- Lee, J.T., Davidow, L.S., and Warshawsky, D. (1999). Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nat. Genet.* 21, 400–404.
- Leppig, K.A., Brown, C.J., Bressler, S.L., Gustashaw, K., Pagon, R.A., Willard, H.F., and Disteche, C.M. (1993). Mapping of the distal boundary of the X-inactivation center in a rearranged X chromosome from a female expressing XIST. *Hum. Mol. Genet.* 2, 883–887.

- Li, E., and Zhang, Y. (2014). DNA Methylation in Mammals. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a019133.
- Lim, L.-M., Chang, J.-M., Wang, I.-F., Chang, W.-C., Hwang, D.-Y., and Chen, H.-C. (2013). Atypical X-linked agammaglobulinaemia caused by a novel BTK mutation in a selective immunoglobulin M deficiency patient. *BMC Pediatr.* 13, 150.
- Linhart, A., and Elliott, P.M. (2007). The heart in Anderson-Fabry disease and other lysosomal storage disorders. *Heart* 93, 528–535.
- Linhart, A., Palecek, T., Bultas, J., Ferguson, J.J., Hrudová, J., Karetová, D., Zeman, J., Ledvinová, J., Poupetová, H., Elleder, M., et al. (2000). New insights in cardiac structural changes in patients with Fabry's disease. *Am. Heart J.* 139, 1101–1108.
- Lister, R., Mukamel, E.A., Nery, J.R., Urich, M., Puddifoot, C.A., Johnson, N.D., Lucero, J., Huang, Y., Dwork, A.J., Schultz, M.D., et al. (2013). Global Epigenomic Reconfiguration During Mammalian Brain Development. *Science* 341, 1237905.
- Liu, F., Qin, Y., Yu, S., Soares, D.C., Yang, L., Weng, J., Li, C., Gao, M., Lu, Z., Hu, X., et al. (2017). Pathogenic mutations in retinitis pigmentosa 2 predominantly result in loss of RP2 protein stability in humans and zebrafish. *J. Biol. Chem.* 292, 6225–6239.
- Liu, J., Zhang, Z., Bando, M., Itoh, T., Deardorff, M.A., Li, J.R., Clark, D., Kaur, M., Tatsuro, K., Kline, A.D., et al. (2010). Genome-wide DNA methylation analysis in cohesin mutant human cell lines. *Nucleic Acids Res.* 38, 5657–5671.
- Lonergan, P.E., and Tindall, D.J. (2011). Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *J. Carcinog.* 10, 20.
- Lubahn, D., Joseph, D., Sullivan, P., Willard, H., French, F., and Wilson, E. (1988). Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* 240, 327–330.
- Lucchesi, J.C., and Kuroda, M.I. (2015). Dosage Compensation in *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a019398.
- Lyon, M.F. (1961). Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190, 372–373.
- Lyon, M.F. (1962). Sex Chromatin and Gene Action in the Mammalian X-Chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 14, 135–148.
- MacDermot, K., Holmes, A., and Miners, A. (2001a). Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate carrier females. *J. Med. Genet.* 38, 769–775.

- MacDermot, K.D., Holmes, A., and Miners, A.H. (2001b). Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 98 hemizygous males. *J. Med. Genet.* *38*, 750–760.
- Machado, F.B., Machado, F.B., Faria, M.A., Lovatel, V.L., Alves da Silva, A.F., Radic, C.P., De Brasi, C.D., Rios, Á.F.L., de Sousa Lopes, S.M.C., da Silveira, L.S., et al. (2014). 5mCpG Epigenetic Marks Neighboring a Primate-Conserved Core Promoter Short Tandem Repeat Indicate X-Chromosome Inactivation. *PLoS ONE* *9*, e103714.
- Maier, E.M., Osterrieder, S., Whybra, C., Ries, M., Gal, A., Beck, M., Roscher, A.A., and Muntau, A.C. (2006). Disease manifestations and X inactivation in heterozygous females with Fabry disease. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* *1992 Suppl.* *95*, 30–38.
- Mauer, M., Glynn, E., Svarstad, E., Tøndel, C., Gubler, M.-C., West, M., Sokolovskiy, A., Whitley, C., and Najafian, B. (2014). Mosaicism of Podocyte Involvement Is Related to Podocyte Injury in Females with Fabry Disease. *PLoS ONE* *9*, e112188.
- McMurray, C.T. (2010). Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 786–799.
- Migeon, B.R., Chowdhury, A.K., Dunston, J.A., and McIntosh, I. (2001). Identification of TSIX, Encoding an RNA Antisense to Human XIST, Reveals Differences from its Murine Counterpart: Implications for X Inactivation. *Am. J. Hum. Genet.* *69*, 951–960.
- Morey, C., and Avner, P. (2011). The Demoiselle of X-Inactivation: 50 Years Old and As Trendy and Mesmerising As Ever. *PLoS Genet.* *7*.
- Morgan, T.H. (1915). *The Mechanism of Mendelian heredity* (New York: H. Holt and company).
- Mossner, M., Nolte, F., Hütter, G., Reins, J., Klaumünzer, M., Nowak, V., Obländer, J., Ackermann, K., Will, S., Roehl, H., et al. (2013). Skewed X-inactivation patterns in ageing healthy and myelodysplastic haematopoiesis determined by a pyrosequencing based transcriptional clonality assay. *J. Med. Genet.* *50*, 108–117.
- Musalkova, D., Minks, J., Storkanova, G., Dvorakova, L., and Hrebicek, M. (2015). Identification of novel informative loci for DNA-based X-inactivation analysis. *Blood Cells. Mol. Dis.* *54*, 210–216.
- Musalkova, D., Sticova, E., Reboun, M., Sokolova, J., Krijt, J., Honzikova, J., Gurka, J., Neroldova, M., Honzik, T., Zeman, J., et al. (2018). Variable X-chromosome inactivation and enlargement of pericentral glutamine synthetase zones in the liver of heterozygous females with OTC deficiency. *Virchows Arch.* *472*, 1029–1039.
- Muyle, A., Shearn, R., and Marais, G.A. (2017). The Evolution of Sex Chromosomes and Dosage Compensation in Plants. *Genome Biol. Evol.* *9*, 627–645.

- Nakao, S., Takenaka, T., Maeda, M., Kodama, C., Tanaka, A., Tahara, M., Yoshida, A., Kuriyama, M., Hayashibe, H., and Sakuraba, H. (1995). An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy. *N. Engl. J. Med.* *333*, 288–293.
- Nakao, S., Kodama, C., Takenaka, T., Tanaka, A., Yasumoto, Y., Yoshida, A., Kanzaki, T., Enriquez, A.L.D., Eng, C.M., Tanaka, H., et al. (2003). Fabry disease: Detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a “renal variant” phenotype1. *Kidney Int.* *64*, 801–807.
- Nathans, D., and Smith, H.O. (1975). Restriction Endonucleases in the Analysis and Restructuring of DNA Molecules. *Annu. Rev. Biochem.* *44*, 273–293.
- Ohno, S., and Hauschka, T.S. (1960). Allocyclus of the X-chromosome in tumors and normal tissues. *Cancer Res.* *20*, 541–545.
- Pérez de Diego, R., López-Granados, E., Rivera, J., Ferreira, A., Fontán, G., Bravo, J., García Rodríguez, M., and Bolland, S. (2008). Naturally occurring Bruton's tyrosine kinase mutations have no dominant negative effect in an X-linked agammaglobulinemia cellular model. *Clin. Exp. Immunol.* *152*, 33–38.
- Politei, J.M., Bouhassira, D., Germain, D.P., Goizet, C., Guerrero-Sola, A., Hilz, M.J., Hutton, E.J., Karaa, A., Liguori, R., Üçeyler, N., et al. (2016). Pain in Fabry Disease: Practical Recommendations for Diagnosis and Treatment. *CNS Neurosci. Ther.* *22*, 568–576.
- Ponader, S., and Burger, J.A. (2014). Bruton's Tyrosine Kinase: From X-Linked Agammaglobulinemia Toward Targeted Therapy for B-Cell Malignancies. *J. Clin. Oncol.* *32*, 1830–1839.
- Řeboun, M., Rybova, J., Dobrovolný, R., Včelák, J., T, V., G, S., Musalkova, D., M, H., Ledvinová, J., M, M., et al. (2016). X-Chromosome Inactivation Analysis in Different Cell Types and Induced Pluripotent Stem Cells Elucidates the Disease Mechanism in a Rare Case of Mucopolysaccharidosis Type II in a Female. *Folia Biol. (Praha)* *62*, 82–89.
- Ries, M., Gupta, S., Moore, D.F., Sachdev, V., Quirk, J.M., Murray, G.J., Rosing, D.R., Robinson, C., Schaefer, E., Gal, A., et al. (2005). Pediatric Fabry Disease. *Pediatrics* *115*, e344–e355.
- Ries, M., Moore, D.F., Robinson, C.J., Tifft, C.J., Rosenbaum, K.N., Brady, R.O., Schiffmann, R., and Krasnewich, D. (2006). Quantitative dysmorphology assessment in Fabry disease. *Genet. Med.* *8*, 96–101.
- Roy, F., Laberge, G., Douziech, M., Ferland-McCollough, D., and Therrien, M. (2002). KSR is a scaffold required for activation of the ERK/MAPK module. *Genes Dev.* *16*, 427–438.
- Sabath, N., Itescu, Y., Feldman, A., Meiri, S., Mayrose, I., and Valenzuela, N. (2016). Sex determination, longevity, and the birth and death of reptilian species. *Ecol. Evol.* *6*, 5207–5220.

- Sado, T., Wang, Z., Sasaki, H., and Li, E. (2001). Regulation of imprinted X-chromosome inactivation in mice by Tsix. *Dev. Camb. Engl.* *128*, 1275–1286.
- Sambrook, J., Williams, J., Sharp, P.A., and Grodzicker, T. (1975). Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *J. Mol. Biol.* *97*, 369–390.
- Sander van Doorn, G. (2014). Patterns and Mechanisms of Evolutionary Transitions between Genetic Sex-Determining Systems. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *6*, a017681.
- Schiffmann, R. (2015). Fabry disease. In *Handbook of Clinical Neurology*, (Elsevier), pp. 231–248.
- Schiffmann, R., Murray, G.J., Treco, D., Daniel, P., Selloso-Moura, M., Myers, M., Quirk, J.M., Zirzow, G.C., Borowski, M., Loveday, K., et al. (2000). Infusion of α -galactosidase A reduces tissue globotriaosylceramide storage in patients with Fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 365–370.
- Schiffmann, R., Hughes, D.A., Linthorst, G.E., Ortiz, A., Svarstad, E., Warnock, D.G., West, M.L., Wanner, C., Bichet, D.G., Christensen, E.I., et al. (2017). Screening, diagnosis, and management of patients with Fabry disease: conclusions from a “Kidney Disease: Improving Global Outcomes” (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int.* *91*, 284–293.
- Schoeftner, S., Blanco, R., de Silanes, I.L., Muñoz, P., Gómez-López, G., Flores, J.M., and Blasco, M.A. (2009). Telomere shortening relaxes X chromosome inactivation and forces global transcriptome alterations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 19393–19398.
- Schoonjans, F. (2018). Correlation coefficient.
- Schwahn, U., Lenzner, S., Dong, J., Feil, S., Hinzmann, B., van Duijnhoven, G., Kirschner, R., Hemberger, M., Bergen, A.A.B., Rosenberg, T., et al. (1998). Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2. *Nat. Genet.* *19*, 327–332.
- Segundo, G.R.S., Nguyen, A.T.V., Thuc, H.T., Nguyen, L.N.Q., Kobayashi, R.H., Le, H.T., Le, H.T.M., Torgerson, T.R., and Ochs, H.D. (2018). Dried Blood Spots, an Affordable Tool to Collect, Ship, and Sequence gDNA from Patients with an X-Linked Agammaglobulinemia Phenotype Residing in a Developing Country. *Front. Immunol.* *9*, 289.
- Semagn, K., Bjørnstad, Å., and Ndjiondjop, M.N. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. *Afr. J. Biotechnol.* *5*, 2540–2568.
- Sharp, A., Robinson, D., and Jacobs, P. (2000). Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Hum. Genet.* *107*, 343–349.
- Shen, Z.-G., and Wang, H.-P. (2014). Molecular players involved in temperature-dependent sex determination and sex differentiation in Teleost fish. *Genet. Sel. Evol. GSE* *46*, 26.

- Smid, B.E., van der Tol, L., Biegstraaten, M., Linthorst, G.E., Hollak, C.E.M., and Poorthuis, B.J.H.M. (2015). Plasma globotriaosylsphingosine in relation to phenotypes of Fabry disease. *J. Med. Genet.* *52*, 262–268.
- Swierczek, S.I., Piterkova, L., Jelinek, J., Agarwal, N., Hammoud, S., Wilson, A., Hickman, K., Parker, C.J., Cairns, B., and Prchal, J.T. (2012). Methylation of AR locus does not always reflect X chromosome inactivation state. *Blood* *119*, e100–e109.
- Takada, H., Kanegane, H., Nomura, A., Yamamoto, K., Ihara, K., Takahashi, Y., Tsukada, S., Miyawaki, T., and Hara, T. (2004). Female agammaglobulinemia due to the Bruton tyrosine kinase deficiency caused by extremely skewed X-chromosome inactivation. *Blood* *103*, 185–187.
- Taketo, T. (2015). The role of sex chromosomes in mammalian germ cell differentiation: can the germ cells carrying X and Y chromosomes differentiate into fertile oocytes? *Asian J. Androl.* *17*, 360–366.
- Tan, M.E., Li, J., Xu, H.E., Melcher, K., and Yong, E. (2015). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* *36*, 3–23.
- The 1000 Genomes Project Consortium, Gibbs, R.A., Boerwinkle, E., Doddapaneni, H., Han, Y., Korchina, V., Kovar, C., Lee, S., Muzny, D., Reid, J.G., et al. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature* *526*, 68–74.
- Topaloglu, A.K., Ashley, G.A., Tong, B., Shabbeer, J., Astrin, K.H., Eng, C.M., and Desnick, R.J. (1999). Twenty novel mutations in the alpha-galactosidase A gene causing Fabry disease. *Mol. Med.* *5*, 806–811.
- Treangen, T.J., and Salzberg, S.L. (2011). Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Nat. Rev. Genet.* *13*, 36–46.
- Tuttolomondo, A., Pecoraro, R., Simonetta, I., Miceli, S., Pinto, A., and Licata, G. (2013). Anderson-Fabry disease: a multiorgan disease. *Curr. Pharm. Des.* *19*, 5974–5996.
- Üçeyler, N., Ganendiran, S., Kramer, D., and Sommer, C. (2014). Characterization of Pain in Fabry Disease. *Clin. J. Pain* *30*, 915–920.
- Vedder, A.C., Linthorst, G.E., Breemen, M.J. van, Groener, J.E.M., Bemelman, F.J., Strijland, A., Mannens, M.M. a. M., Aerts, J.M.F.G., and Hollak, C.E.M. (2007a). The Dutch Fabry cohort: Diversity of clinical manifestations and Gb₃ levels. *J. Inherit. Metab. Dis.* *30*, 68–78.
- Vedder, A.C., Linthorst, G.E., Houge, G., Groener, J.E.M., Ormel, E.E., Bouma, B.J., Aerts, J.M.F.G., Hirth, A., and Hollak, C.E.M. (2007b). Treatment of Fabry Disease: Outcome of a Comparative Trial with Agalsidase Alfa or Beta at a Dose of 0.2 mg/kg. *PLoS ONE* *2*, e598.

- Vu, Q.V., Wada, T., Le, H.T.M., Le, H.T., Van Nguyen, A.T., Osamu, O., Yachie, A., and Nguyen, S.N. (2014). Clinical and mutational features of Vietnamese children with X-linked agammaglobulinemia. *BMC Pediatr.* *14*, 129.
- Warnock, D.G., Daina, E., Remuzzi, G., and West, M. (2010). Enzyme Replacement Therapy and Fabry Nephropathy. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* *5*, 371–378.
- Wei, K.H.-C., and Barbash, D.A. (2015). Never Settling Down: Frequent Changes in Sex Chromosomes. *PLoS Biol.* *13*, e1002077.
- Yamada, Y., Watanabe, H., Miura, F., Soejima, H., Uchiyama, M., Iwasaka, T., Mukai, T., Sakaki, Y., and Ito, T. (2004). A Comprehensive Analysis of Allelic Methylation Status of CpG Islands on Human Chromosome 21q. *Genome Res.* *14*, 247–266.
- Yang, F., Babak, T., Shendure, J., and Disteche, C.M. (2010). Global survey of escape from X inactivation by RNA-sequencing in mouse. *Genome Res.* *20*, 614–622.
- Zarate, Y.A., and Hopkin, R.J. (2008). Fabry's disease. *The Lancet* *372*, 1427–1435.
- Zavodna, M., Bagshaw, A., Brauning, R., and Gemmell, N.J. (2014). The Accuracy, Feasibility and Challenges of Sequencing Short Tandem Repeats Using Next-Generation Sequencing Platforms. *PLoS ONE* *9*, e113862.
- Zhang, Y., Castillo-Morales, A., Jiang, M., Zhu, Y., Hu, L., Urrutia, A.O., Kong, X., and Hurst, L.D. (2013). Genes That Escape X-Inactivation in Humans Have High Intraspecific Variability in Expression, Are Associated with Mental Impairment but Are Not Slow Evolving. *Mol. Biol. Evol.* *30*, 2588–2601.
- Zheng, B., Zhang, Y., Jin, Y., and Yu, H. (2014). A novel Bruton's tyrosine kinase gene (BTK) missense mutation in a Chinese family with X-linked agammaglobulinemia. *BMC Pediatr.* *14*, 265.

10 Přílohy

Příloha 1: Tabulka výsledků MSRA v lokusech *AR*, *RP2* a *CNKSR2* a relativní kvantifikace transkriptu pomocí masivně paralelního sekvenování v genech *GLA*, *IDS* a *LAMP2*. Výsledky zobrazují procentuální zastoupení divoké alely daného lokusu. V této tabulce jsou zachyceny výsledky analýz DNA izolované z NK.

Č. PACIENTKY	<i>AR</i>	<i>RP2</i>	<i>D17</i>	<i>GLA</i>	<i>IDS</i>	<i>LAMP2</i>
1	*	60 %	*	*	50 %	*
2	42 %	35%	*	*	*	*
3	*	3 %	0 %	0 %	*	1 %
4	*	*	*	47 %	*	49 %
5	17 %	20 %	*	13 %	*	*
6	*	26 %	*	36 %	33 %	*
7	76 %	*	*	70 %	*	*
8	9 %	*	*	8 %	11 %	*
9	56 %	59 %	77 %	56 %	*	56 %
10	51 %	64 %	*	53 %	67 %	*
11	*	35 %	36 %	28 %	36 %	48 %
12	43 %	*	*	45 %	50 %	*
13	41 %	*	*	50 %	*	*
14	*	*	*	71 %	65 %	*
15	*	93 %	*	*	*	*
16	37 %	55 %	30 %	29 %	*	*
17	30 %	*	21 %	*	*	*
18	36 %	46 %	*	*	*	*
19	48 %	49 %	*	*	38%	*
20	35 %	31 %	28 %	44 %	40 %	26 %
21	*	*	*	99 %	100 %	93 %
22	80 %	63 %	81 %	55 %	53 %	*
23	44 %	*	17 %	42 %	47 %	*
24	*	*	*	51 %	52 %	63 %
25	21 %	22 %	*	25 %	32 %	*

26	*	*	*	31 %	23 %	23 %
27	51 %	*	*	80 %	*	*
28	36 %	36 %	*	12 %	*	30 %
29	*	39 %	*	*	*	*
30	34 %	*	*	20 %	*	*
31	*	*	*	52 %	63 %	*
32	53 %	57 %	*	64 %	63 %	*
33	18 %	14 %	*	56 %	*	*
34	*	74 %	*	75 %	79 %	*

Příloha 2: Tabulka výsledků MSRA v lokusech *AR*, *RP2* a *CNKS2*. Výsledky zobrazují procentuální zastoupení divoké alely daného lokusu. V této tabulce jsou zachyceny výsledky analýz DNA izolované z BS.

Č. PACIENTKY	<i>AR</i>	<i>RP2</i>	<i>D17</i>
1	*	35 %	*
2	*	*	*
3	*	46 %	32 %
4	*	*	*
5	53 %	56 %	*
6	*	33%	*
7	79 %	*	*
8	56 %	*	*
9	56 %	55 %	58 %
10	41 %	34 %	*
11	*	34 %	37 %
12	68 %	*	*
13	50 %	*	*
14	*	*	*
15	*	23 %	*
16	53 %	56 %	58 %

17	*	*	*
18	82 %	80 %	*
19	48 %	44 %	*
20	59 %	55 %	81 %
21	*	*	*
22	43 %	45 %	47 %
23	38 %	*	33 %
24	*	*	*
25	30 %	50 %	*
26	*	*	*
27	35 %	*	*
28	59 %	57 %	*
29	*	31 %	*
30	41 %	*	*
31	*	*	*
32	56 %	55 %	*
33	58 %	54 %	*
34	*	*	*