

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program:

Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor:

Molekulární biologie a biochemie organismů



Vendula Václavková

Genetická a molekulární podstata Meckel-Gruberova syndromu
Genetic and molecular basis of Meckel-Gruber syndrome

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.

Praha, 2020

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Ing. Vladimíru Krylovi, Ph.D. za cenné rady a vstřícný pedagogický přístup. Poděkování patří i mé rodině, zejména mému bratranci a jeho manželce, kteří mi byli inspirací pro napsání této práce a udělili mi souhlas práci zpracovat.

Prohlášení

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

V Praze,

Podpis

Abstrakt:

Meckel-Gruberův syndrom (MKS) je vzácné, multisystémové autozomálně recesivně dědičné onemocnění, které se vyskytuje v různých koutech světa. MKS řadíme mezi ciliopatie. Tato onemocnění vznikají defektem signální buněčné organely, primární řasinky, během embryogeneze. Meckel-Gruberův syndrom reprezentuje nejzávažnější ciliopatii v lidské populaci. MKS je způsoben mutacemi v několika genech, které se podílejí na správném formování primárních řasinek. Do dnešního dne bylo potvrzeno 13 genů, jež zapříčiňují MKS, a na základě čehož bylo klasifikováno 13 typů nemoci. Další geny se také podílejí na vzniku syndromu, nebyl jim však přidělen vlastní typ a nesou označení MKS podobné geny. Syndrom byl rozpoznán zejména na základě klinických případů. Velká část případů byla popsána u jedinců s pokrevně příbuznými rodiči. Hlavními třemi příznaky doprovázející MKS patří týlní encefaloce, cystická nemoc ledvin a polydaktylie na ruce i nohou. Tyto příznaky nalezneme u všech 13 typů. Dále syndrom doprovází poruchy nervové a vylučovací soustavy, různé defekty obličeje nebo nerozlišitelnost genitálií.

Klíčová slova: Meckel-Gruberův syndrom, ciliopatie, primární řasinky, autozomálně recesivní, dědičné onemocnění, pokrevně příbuzenský původ, týlní encefaloce, cystická nemoc ledvin, polydaktylie

Abstract:

Meckel-Gruber syndrome (MKS) is rare multisystemic, autosomal recessive hereditary disorder, which appears in different places around the world. MKS is classified as a ciliopathy. These disorders are caused by defects of primary cilium, cell's signaling organelle, during embryogenesis. Meckel-Gruber syndrome represents the most severe form of ciliopathy in human population. MKS is caused by mutation in several genes, involved in correct formation of primary cilium. Until this day, 13 genes have been confirmed. As a result we distinguish 13 types of MKS. More genes are also included in MKS origin, but they do not define solo type of MKS. They are called MKS-related genes. The syndrome was recognized mainly on the basis of clinical cases. A big amount of cases was described in consanguineous families. The MKS is characterized by occipital encephaloce, polycystic kidney disease and polydactyly of hands and feet. These symptoms are common with all 13 types. Syndrome also goes with disorder of nervous and renal system, face defects or undefined genitals.

Key words: Meckel-Gruber syndrome, ciliopathy, primary cilium, autosomal recessive, hereditary disease, consanguineous origin, occipital encephaloce, polycystic kidney disease, polydactyly

Seznam zkratk:

ALMS	Alstronův syndrom
B9D1/2	B9 domain-containing protein 1/2
BBS	Bardet-Biedlův syndrom
BPKK	myši s bilaterálně polycystickými ledvinami (Bilateral polycystic kidney)
CC2D2A	Coiled-coil and C2 domain-containing protein 2A
CEP	Centrozomální protein
ESRD	Fatálnímu onemocnění ledvin (End-stage renal disease)
HH	Hedgehog
JBS	Joubertův syndrom
KIF	Kinesin-like protein
LCA	Onemocnění oka (Leber congenital amaurosis)
MKS	Meckel-Gruberův syndrom
MKSr	protein podobné MKS (MKS-related)
NPHP	Nephrocystin, nefronofthysis
OFD	Syndrom úst, tváře a prstů (Orofaciodigital syndrome)
PKD	Polycystická nemoc ledvin (Polycystic kidney disease)
PTCH	Patched
RPGRIP1	X-linked retinitis pigmentosa GTPase regulator-interacting protein 1
SHH	Sonic hedgehog
SMO	Smoothened
SRTD	Syndrom krátkých žeber (Short-rib thoracic dysplasia)
TCTN	Tektonický protein
TMEM	Transmembránový protein
WNT	Wingless/Int-1

1	Úvod	1
2	Molekulárně-genetická podstata.....	1
2.1	MKS komplex a přechodová zóna primárních řasinek.....	2
3	Ciliopatie	3
3.1	Primární řasinky.....	5
3.2	Signální dráhy spojené s primárními řasinkami.....	7
4	Klinické projevy.....	8
4.1	Klinická diagnostika	9
4.2	Výskyt ve světové populaci	10
5	Typy Meckel-Gruberova syndromu	10
5.1	Meckel-Gruberův syndrom typu 1	10
5.2	Meckel-Gruberův syndrom typu 2	11
5.3	Meckel-Gruberův syndrom typu 3	12
5.4	Meckel-Gruberův syndrom typu 4	14
5.5	Meckel-Gruberův syndrom typu 5	15
5.6	Meckel-Gruberův syndrom typu 6	15
5.7	Meckel-Gruberův syndrom typu 7	17
5.8	Meckel-Gruberův syndrom typu 8	17
5.9	Meckel-Gruberův syndrom typu 9	18
5.10	Meckel-Gruberův syndrom typu 10	19
5.11	Meckel-Gruberův syndrom typu 11	19
5.12	Meckel-Gruberův syndrom typu 12	20
5.13	Meckel-Gruberův syndrom typu 13	21
6	Ciliopatie podobné Meckel-Gruberovu syndromu.....	22
6.1	Joubertův syndrom.....	23
6.2	Bardet-Biedlův syndrom	23
6.3	Nefronofthisis	24
7	Zvířecí modely	25
8	Závěr.....	26
9	Seznam použité literatury.....	27

1 Úvod

Meckel-Gruberův syndrom jinak označován Meckelův syndrom, Gruberův syndrom, MKS anebo dysencephalia splanchnocystica patří mezi ciliopatie s nejzávažnějším důsledkem. Jedná se o autozomálně recesivní dědičné onemocnění. U postižených partnerů, u nichž se syndrom neprojevil, mluvíme tudíž o nich pouze jako o přenašečích, je šance 25 % u každého jejich očekávaného potomka, že se u něj nemoc projeví. Syndrom vede bezpodmínečně k letalitě tohoto jedince, ve velké většině popsáných případů ještě během prenatálního období nebo těsně po narození. Velmi často je těhotenství přerušeno lékaři, dochází také ke spontánním potratům. Charakteristickými klinickými projevy zapříčiněny Meckel-Gruberovým syndromem jsou polycystická nemoc ledvin, týlní encefalocela a axiální polydaktylie rukou i nohou. V oblasti mozku a obecně centrální nervové soustavy včetně neurální trubice jsou patologie nejrozmanitější. Vedle těchto tří malformací a jejich variant syndrom postihuje také játra, srdce, genitálie a obličej.

Tento syndrom byl poprvé popsán v roce 1822 německým doktorem působícím na poli anatomie Johannem Friedrichem Meckelem. J. F. Meckel nesl jméno svého dědečka, který rovněž pracoval jako profesor anatomie, stejně tak i Meckelův otec. On sám se stal profesorem patologické anatomie v roce 1802. Vedle anatomie byla jeho další velkou činností teratologie, stal se průkopníkem této vědy, někdy je uváděn i jako její zakladatel v moderní době (Gluecklich, 1976). Prvním jeho záznamem o tomto syndromu bylo popsání případu narození dvou dětí, bratr a sestra, kteří oba zemřeli na následky patologií syndromu, u obou zaznamenal tři typické znaky MKS. Meckel doslova uvedl, že k úmrtí došlo minutu po narození. O více než sto let později, v roce 1934, zaznamenal německý lékař George B. Gruber případy u několika rodin, kdy došlo ke stejným patologiím, které popsal jeho předchůdce Meckel. Gruber toto syndromové onemocnění označil jako dysencefalické splanchnocystia. Jednoznačné vymezení syndromu, zvláště jeho příznaků, bylo provedeno v roce 1960 pány Opitz a Howe (Hartill *et al.*, 2017)

Do dnešní doby bylo definováno celkem 13 typů Meckel-Gruberova syndromu. Fenotypové projevy a klinické příznaky se ve značné míře překrývají, v širším pohledu je lze označit za totožné. Zejména se typy shodují v základní charakteristické triádě znaků, viz výše. Rozdíl mezi těmito typy tkví v genetické podstatě. Pro každý typ byl identifikován vlastní gen, všechny tyto definované geny se vyskytují dohromady na 9 chromozomech. (Assi & Al-Imam, 2019). Kromě těchto genů přímo přiřazených k vlastnímu typu existují další geny asociované s MKS. Geny jsou přiřazeny k některému z 13 typů nebo jejich fenotyp nese označení „podobné Meckel-Gruberovu syndromu“ (Shaheen *et al.*, 2012)

2 Molekulárně-genetická podstata

Do současné doby bylo identifikováno 13 genů, které svou malformací způsobují MKS. Další nejméně tři geny jsou zvažovány. Postupným objevováním lokusů dostával Meckel-Gruberův syndrom označení typ 1 až 13. Geny byly odhaleny až zpětně, a ne ve stejném pořadí jako lokusy. Ze začátku tedy bylo jasné, kde má MKS svůj původ, nikoli však jeho genetická příčina. Prvními dvěma objevenými geny v roce 2006 byly *MKS1* asociovaný s typem 1 a *TMEM67* řazený k typu 3 (Hopp *et al.*, 2011).

Tyto geny kódují proteiny patřící do proteinových rodin, které se podílejí na vývinu a funkci primárních řasinek (cilií). Každá rodina zaciluje své působení na jinou část řasinek,

kteře se celkově skládají z axonemy, přechodné zóny a bazálního těliska. Mimo to také hrají roli ve funkci centrozomu (Bruel *et al.*, 2017).

Mezi tyto proteinové rodiny patří TMEM (transmembránové proteiny), CEP (centrozomální proteiny), TCTN (tektonické proteiny sídlící v přechodné zóně primárních řasinek), dále proteinové skupiny podobné tektonickým proteinům, a to CC2D2A (coiled-coil and C2 domain containing 2A) a B9D1 a B9D2 (B9 protein domain 1 a B9 protein domain 2). Do skupiny proteinů podílející se také na vzniku MKS spadají RPGRIP1, jinak označované jako X-Linked Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator-Interacting, dále NPHP3 (Nephronophthisis) a protein KIF14 (kinesin family member).

V následujících oddílech bude popsáno zatím 13 definovaných typů Meckel-Gruberova syndromu se zaměřením na jejich odlišný genetický původ.

Na projevu konkrétních příznaků syndromu má také velký podíl alelismus. Je například možné, že mutantní projev různých alel tak vede k rozdílným intenzitám závažnosti postižení centrální nervové soustavy (Consugar *et al.*, 2007)

2.1 MKS komplex a přechodová zóna primárních řasinek

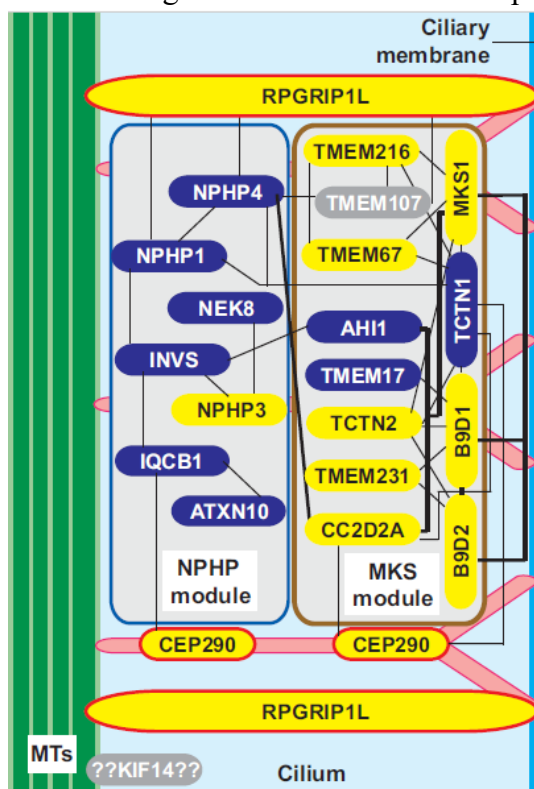
Meckel-Gruberův syndrom je pro svůj vznik zařazen mezi onemocnění, které nesou název ciliopatie. Tyto poruchy způsobuje disfunkce nepohyblivých cílů, které jsou také označovány jako primární řasinky. Řasinky se vyskytují na buňkách všech buněčných typů a jejich hlavní úlohou je zejména přenos signálu z prostředí do jádra.

MKS je syndrom s heterogenním původem, do dnešního dne bylo potvrzeno celkem 13 genů, které stojí v pozadí vzniku syndromu. Pro každý gen existuje vlastní typ MKS. Konkrétně se jedná o geny MKS1 (typ 1), TMEM216 (typ 2), TMEM67 (typ 3), CEP290 (typ 4), RPGRIP1L (typ 5), CC2D2A (typ 6), NPHP3 (typ 7), TCTN2 (typ 8), B9D1 (typ 9), B9D2 (typ 10), TMEM231 (typ 11), KIF14 (typ 12), TMEM107 (typ 13) (Assi *et al.*, 2019). Kromě těchto genů existují minimálně další tři geny, jež také vedou k MKS, a to geny C5orf42, EVC2 a EXOC4. Jejich role je spíše zvažována, nezpůsobují tedy samostatné typy (Shaheen *et al.*, 2013; Shaheen *et al.*, 2015). A právě produkty těchto genů mají své cílové působíště v části primární řasinky, které se říká přechodová zóna, transition zone. Zde tvoří proteinový komplex, jenž nese označení MKS komplex nebo také MKS modul (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2011). Postupně dochází k potvrzení, že se proteiny dokonce ani nevyskytují na jiných místech v buňce, než právě v přechodové zóně (Barker *et al.*, 2014). Neplatí to pro všechny proteiny komplexu, Tmem216 nebo Tmem67 byly také lokalizované na endoplazmatickém retikulu, Golgiho aparátu nebo buněčných vehiklech (Lee *et al.*, 2012). Přechodová zóna odděluje bazální tělisko řasinky od axonemy, viz níže. (Gong *et al.*, 2018)

Správné fungování tohoto komplexu je nezbytné pro řádný vývoj primárních řasinek. Mutace kteréhokoli kompartmentu komplexu je příčinou nesprávného formování primární řasinky a následně její degradace, což je bazální příčinou vzniku kterékoli ciliopatie. Efekt mutace jednotlivých proteinů je rozdílný v jednotlivých tkáních, neboť se proteiny exprimují s různou frekvencí v odlišných buňkách (Lewis *et al.*, 2019). Kromě toho každý z těchto proteinů má svoji vlastní roli zejména v signalizačních drahách. Fungují také vzájemně mezi sebou, vznikají zde vztahy s větší či menší preferencí pro interagujícího partnera (Logan *et al.*, 2011).

Je také možné, že některé z proteinů MKS komplexu se uplatňují pouze při ciliogenezi, formování primárních řasinek. Jakmile je proces řádně dokončen, jejich působení není nadále nezbytné. Po dokončeném vývoji řasinky jejich funkci dokonce může převzít některý jiný protein komplexu. (Lewis *et al.*, 2019)

Genetické a biochemické analýzy nejen modelů myši, *C. elegans*, ale i člověka identifikovaly, že v přechodové zóně jsou lokalizovány dva hlavní proteinové moduly, které interagují nejen v rámci sebe sama, ale také mezi sebou. Jedním je právě MKS komplex, druhým NPHP. Obecně, MKS komplex převážně působí a ovlivňuje membránu řasinek, NPHP komplex poté spíše interaguje s mikrotubuly axonemy řasinky. Proteiny MKS komplexu mají pravděpodobně větší vliv na zformování řasinky. RPGRIP1L dokonce významně ovlivňuje uspořádání MKS komplexu, CEP290 poté ovlivňuje správné ukotvení flagel na vnější membráně přechodové zóny (Blacque & Sanders, 2014). To, že vývoj řasinek ovlivňuje takto široká plejáda genů je důvodem pro vysokou variaci mezi jednotlivými ciliopatiemi. Jedná se o složitou a propletenou skládku, kde porušení jednoho dílku může znamenat přímo vyřazení funkce nebo negativní ovlivnění ostatních proteinů modulu.



Obr. 1 Znárodnění MKS komplexu v přechodové zóně řasinek. Žlutě jsou označeny proteiny vedoucí k MKS, je zde znázorněno jejich přibližné uspořádání a zejména naznačená interakce mezi nimi. Mimo MKS modulu se v zóně nachází také modul proteinu NPHP, mutace těchto proteinů jsou spojené s ciliopatií Nefronofthisis. Převzato z McIntosh K., 2015

3 Ciliopatie

Označení ciliopatie nesou vývojové syndromové choroby, odvozené od abnormální tvorby nebo funkce primárních řasinek – cilií. Jedná se o geneticky dědičná autozomálně recesivní onemocnění. V menší frekvenci se onemocnění vyskytují také ve formě autozomálně dominantní (Waters & Beales, 2011). Představují různorodou skupinu, neboť do nich spadají poruchy zakládání a vývoje několika typů tkání i orgánových soustav během embryogeneze.

Řasinky jsou mikrotubulární útvary na povrchu buněk. Mohou být označeny za centrální signalizační organelu buňky, neboť fungují jako chemoreceptory a mechanoreceptory. Na sítnici byly dokonce objeveny velmi specifické řasinky s funkcí fotoreceptorů (Wheway *et al.*, 2019). Nacházejí se na apikální straně většiny epiteliálních buněk. Plní tedy významnou roli při fyziologii a normálním vývoji. Původně se řasinkám nepřisuzoval velký vývojový význam, jejich fungování a působení nebylo dostatečně ověřené (Shaheen *et al.*, 2016). Nyní na základě klinických poznatků s jistotou můžeme říci, že defekty ve vývoji řasinek mají pleiotropní negativní efekt na vývoj orgánových soustav. Jejich role je spřažena se signálními drahami diferenciací buněk. (Sreekumar & Norris, 2019)

Ciliopatie rozdělujeme do dvou typů na základě pohyblivosti řasinek, a to na pohyblivé a nepohyblivé (motile a non-motile). Nepohyblivé řasinky se vyskytují na většině buněk. Pohyblivé se nacházejí v oblasti uzlu embrya. Zde pohyblivé řasinky také stanovují pravo-levé asymetrické uspořádání těla. V uzlu kmitají řasinky doleva, napomáhají tak nárůstu koncentrace proteinu Nodal vlevo. Nodal hraje roli právě při tvorbě pravo-levé asymetrie a aktivně se podílí na vývoji levostranných struktur (Nozawa *et al.*, 2013).

Většina ciliopatií je zapříčiněna nesprávným fungováním nepohyblivých řasinek, které ovlivňují celou škálu tkání právě kvůli jejich rozšířenému výskytu. Společnými znaky pozorovanými napříč ciliopatiemi jsou poruchy vývoje nervové soustavy, opěrné soustavy, vývoje ledvin (cystic kidney disease), vedou ale i k obezitě nebo ke špatnému vývoji vnitřního ucha, což může vést až k hluchotě. Také se částečně podílejí na defektech sítnice nebo vzniku polydaktylií.

Na základě fenotypů lze ciliopatie klasifikovat do několika tříd: ciliopatie způsobující defekt vývoje nervového systému, sem patří Meckel-Gruber syndrom a Joubertův syndrom; ciliopatie ledvin, například již výše zmíněná polycystická nemoc ledvin (PKD) nebo nefronofthisis (NPHP); ciliopatie opěrného systému jako jsou syndrom krátkých žeber (SRTD) a syndromy úst, tváře a prstů (OFD); ciliopatie způsobující obezitu, to jsou Bardl-Biedlův syndrom (BBS) a Alstromův syndrom (ALMS); poruchy sítnice, jako Laberova vrozená slepota nebo retinitis pigmentosa. Jedná se o hrubý výčet syndromů. Je třeba zdůraznit, že patologie se v určité míře překrývají mezi jednotlivými ciliopatiemi, žádná z ciliopatií není charakterizována jediným znakem.

Ciliopatie ale nejsou výlučnou záležitostí nepohyblivých řasinek. Kromě uzlu embrya se také v dýchacím systému vyskytují buňky s pohyblivými řasinkami. Zde je jejich úlohou posouvat mukus trubicí. Defekty v těchto řasinkách tedy vedou k syndromovým onemocněním dýchací soustavy, které vedou k bronchitidě, častým respiračním a ušním infekcím apod. (Wheway *et al.*, 2019).

Do nedávna byly ciliopatie spojeny s defekty přibližně ve čtyřiceti genech. Nicméně je v současné době známo okolo tisíce polypeptidů proteomu řasinek. Různé poruchy spojené s tímto velkým souborem polypeptidů, které vedou ke klinickému projevu můžeme s největší pravděpodobností připisovat mutacím dalších genů. (Waters & Beales, 2011) Nejzávažnější jsou ciliopatie v prenatálním období nebo v době těsně po narození jedince. Většinou vedou k letalitě, ke které může dojít ještě před narozením. Zatím není zcela jasná korelace mezi genotypem a fenotypem, je ale pravděpodobné, že ztráta alely nesoucí defektní gen, vede k mírnějšímu projevu syndromu (Barker *et al.*, 2014).

Fenotypový projev mutantních genů je způsoben poruchou v signální dráze růstových faktorů z rodin Hedgehog a Wnt. Tyto proteiny jsou mimo jiné zapojeny do indukce a

histogeneze nervové trubice a rozvoje středního mozku (Waters & Beales, 2011). Byl proveden pokus, jímž byla potvrzena role Wnt dráhy při vzniku ciliopatií. U Dania pruhovaného byl knockoutován gen *DCDC2*, vyřazením tohoto genu došlo z narušení ciliogeneze. Nadměrná exprese *DCDC2* inhibovala β -katenin, který je součástí Wnt signální dráhy. Výsledkem pokusu byl fenotypový projev ciliopathie nefronofthisis (NPHP), který zahrnoval cysty na ledvinách a hydrocefalus. Poruchy vývoje ledvin jsou společným znakem pro mnohé ciliopatie. (Schueler *et al.*, 2015)

3.1 Primární řasinky

Řasinky neboli cilie, můžeme rozdělit na pohyblivé a nepohyblivé. Označení primární řasinky nesou pouze nepohyblivé, non-motile. Analogicky bývají pohyblivá označována jako sekundární. Každá buňka nese vždy pouze jednu primární řasinku, sekundárních může být více na jedné buňce (Beckers *et al.* 2018).

Nepohyblivé řasinky se nejprve dostaly do pozadí, neboť jejich funkce se nezdála tak důležitá vedle řasinek pohyblivých. Na první pohled nezajímavá vlastnost řasinek má ovšem překvapivě daleko větší pole působnosti. Je to dáno hlavně tím, že pohyblivé řasinky se vyskytují pouze na malém počtu typů buněk. Nepohyblivé pak nalezneme na všech ostatních buněčných typech (Adams, 2010). Převažující množství ciliopatií je tedy způsobeno mutacemi vedoucími k disfunkci nepohyblivých, primárních řasinek. Patří sem i Meckel-Gruberův syndrom. Nepohyblivé řasinky totiž přijímají signály z okolního prostředí a předávají ho vlastní buňce. Několik signálních drah podstatných pro správný embryonální vývoj je významně ovlivněno správně vyvinutými primárními řasinkami. Jmenovitě se jedná o signální dráhu Sonic Hedgehog, Wnt, Notch, Hippo (Gong *et al.*, 2018).

Pohyblivé řasinky jsou často srovnávány s bičíky buněk, flagely. Při prvních studiích byly dokonce s nimi zaměňovány, neboť mají prakticky stejnou strukturu i funkci. Při podrobnějším zkoumání je ale patrné, že bičíky jsou delší než pohyblivé řasinky a jejich počet na buňku je zpravidla menší.

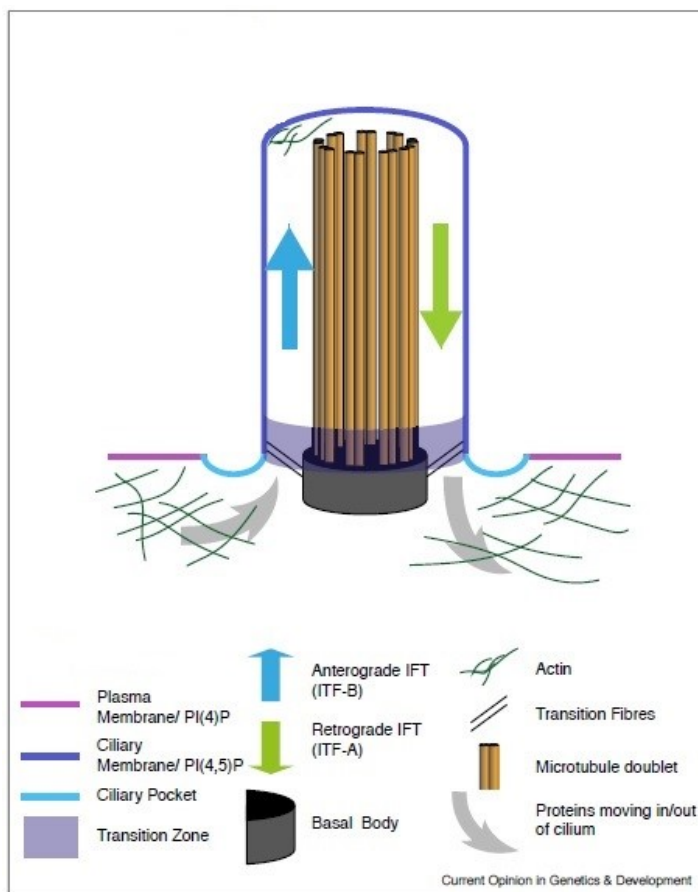
Obecně svoji nejdůležitější roli plní řasinky při embryonálním vývoji, zejména jako příjemci signálních molekul. Svoji funkci neztrácejí na některých epiteliálních buňkách ani u dospělého jedince. Takové buňky se nacházejí například v dýchací trubici, kde řasinky neustále posunují mukos směřem z dýchacího traktu, u samic tvoří sliznici vejcovodu, řasinky zde plní alternativní roli v dopravování oocyty do dělohy. Nalezneme je i na ependymálních buňkách vystýlajících mozkové komory a centrální míšní kanál. Právě epitel dýchací soustavy může sloužit jako příklad pro buněčný typ, na kterém se řasinky nacházejí až v několika kopiích. (Adams, 2010)

Vedle diskutovaných ciliopatií může defekt pohyblivých řasinek zapříčinit také stav zvaný situs inversus. Při této poruše se některé orgány symetricky převrátí a vyvíjejí se na špatné straně těla (srdce se nachází na pravé straně apod.) To způsobuje velmi těžké patologie. Rozšířenější verzí je poté situs inversus totalis, kdy dojde k pravolevému převrácení všech orgánových soustav. Tento jev nečekaně nemá tak zásadní negativní dopad na fungování ani na životaschopnost jedince. (Beckers *et al.* 2018)

Jak již bylo zmíněno, řasinky se nacházejí na povrchu buněk. Vyrůstají z bazálního tělíska (basal body), které je zanořeno pod plasmatickou membránou buňky. Basální tělísko je tvořeno devíti tripletovými centriolami, na kterých je navíc zavěšen distální přívěšek. Těmto

přívěškům se také říká přechodová vlákna (transition fibres), která jsou spojena s vlastní membránou řasinek. Nad basálním tělískem již v oblasti samotné řasinky se nachází přechodová zóna (transition zone). Jedná se o elegantní přemostění mezi bazálním tělískem, axonemy prostupující celou řasinkou a vlastní membránou řasinky. Axonemy jsou mikrotubulární svazky, zde konkrétně tvořeny devíti dvojicemi mikrotubulů uspořádaných do pravidelného kruhu.

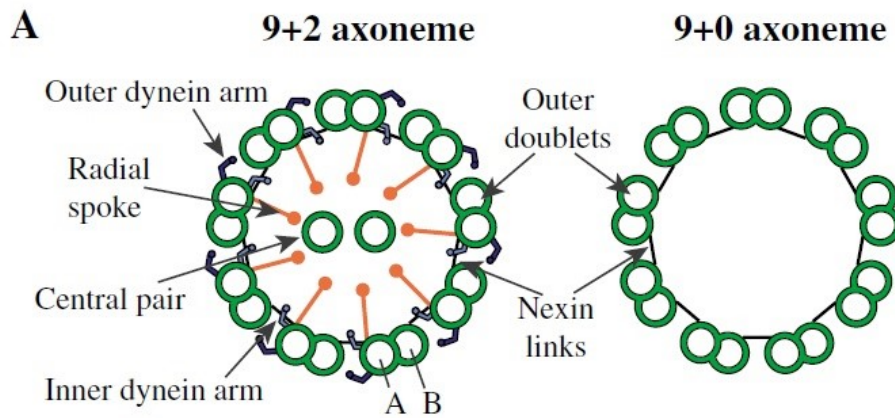
Přechodová zóna je také zdrojem proteinů z rodiny TCTN, takzvané tektonické proteiny. Některé sídlí výhradně v přechodné zóně, jiné se dostávají i do těla řasinky. Tyto proteiny hrají významnou roli jako regulátoři signální dráhy Hedgehog. Několik případů ciliopatií vyvolaných poruchou nepohyblivých řasinek je spojených s mutacemi právě v tektonických proteinech (Gong *et al.*, 2018).



Obr. 2 Obecná struktura řasinky znázorňující vnitřní uspořádání včetně umístění bazálního tělíska, přechodové zóny, přechodových vláken a axonemů. Upraveno podle Sreekumar & Norris, 2019

Přes basální tělísko řasinky kooperují také s aktinovými vlákny buňky. Aktin se podílí na samotné ciliogenezi. Při analýze proteomu řasinek bylo odhaleno dokonce několik proteinů vázících aktin. (Sreekumar & Norris, 2019)

Rozdíly mezi oběma typy řasinek se nacházejí ve struktuře. Pohyblivé řasinky ve svém středu ukrývají pár samostatných centrálních mikrotubulů, které nepohyblivým chybí. Pravděpodobně se jedná o hlavní příčinu rozdílu pohyblivosti. Dokazuje to i fakt, že mutace vedoucí k absenci tohoto středového páru mikrotubulů v bičíku vyvolaná u pláštěnek vede k paralýze těchto pláštěnek (Adams *et al.* 1981). Další vlastností, kterou se řasinky liší, je přítomnost molekulárního motoru dyneinu, který se řadí mezi faktory determinující pohyblivost. V nepohyblivých řasinkách se proto nenachází.



Obr. 3 Rozdíl ve struktuře mezi pohyblivými a nepohyblivými řasinkami. Pohyblivé řasinky (vlevo) se skládají podle obecného vzorce 9 + 2 axonemy, což popisuje 9 párů mikrotubulů uspořádaných v kruhu kolem páru dvou samostatných centrálních mikrotubulů. Struktura je také obohacena o protein Dynein. Nepohyblivé řasinky (vpravo) prezentují obecný vzorec 9+0 axonemů, protože se skládají pouze z devíti dvojic mikrotubulů uspořádaných do kruhu. Převzato z Dawe *et al.* 2006

3.2 Signální dráhy spojené s primárními řasinkami

MKS pacienti vykazují fenotypové znaky, které jasně dokazují změny ve vývoji signálních drah, zejména signálních drah Hedgehog a Wnt (Wingless / Int-1) (Dawe *et al.*, 2006). Role primárních řasinek v Hh dráze je jasně prokázána, zatímco u Wnt signalizace je jejich role u kanonických a planárních (nekanonických) buněk spíše předmětem diskuze. Je ovšem známo, že komponenty jedné ze signálních drah Wnt určující polaritu planárních buněk (PCP – planar cell polarity), modulují správnou lokalizaci a napětí v řasinkách. Právě tyto procesy jsou spojené s vývojovými vadami. Příkladem patologie může být mimo jiné porucha vývoje nervové trubice (Park *et al.*, 2006).

U savců existují tři signální dráhy Hedgehoge (Hh) řízené různými ligandy. Tyto ligandy zde fungují jako morfogeny, které zodpovídají za diferenciaci buněk a jejich formování do různých tkání. Nejlépe studovaným morfogenem Hh signální dráhy je Sonic Hedgehog. Nefunkčnost této signální dráhy negativně ovlivňuje formování řasinek a vede ke špatnému vývoji pupenů končetin, k čemuž může být přiřazen vznik polydaktylie, jeden z dominantních znaků MKS. Dalším výsledkem defektu Hh dráhy je chybné zformování neurální trubice. U obratlovců se Sonic Hedgehog lokalizuje přímo do oblasti řasinek. V jeho přítomnosti je vyvazován receptor Patched (Ptch), který inhibuje transmembránový protein Smoothed (Smo). Bez svého inhibitoru se Smo naváže do membrány řasinek. Aktivovaný Smo brání proteolytickému štěpení transkripčního faktoru Gli, který se následně dostává do jádra, kde funguje jako aktivátor transkripce cílových genů Hh signální dráhy (Bangs & Anderson, 2017).

Při růstu buněk a determinování jejich polarity se uplatňuje signální dráha Wnt. Definovány byly tři Wnt signální dráhy, a to kanonická dráha, nekanonická dráha určující planární polaritu buněk a která je β -catenin nezávislá, a nekanonická dráha zodpovědná za aktivaci Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní protein kinázy II. Nejvýraznější patologii při defektu této signální dráhy můžeme pozorovat při vývoji ledvin. Nesprávný vývoj ledvin je další typický znak pro MKS. U první zmíněné dráhy ze skupiny Wnt dochází k aktivaci transmembránového proteinu Fizzled, který inhibuje cytoplazmatický komplex degradující

transkripční faktor β -catenin. β -catenin je tak dopraven do jádra, kde aktivuje transkripci genů regulovaných Wnt signalizací (Schueler *et al.*, 2015). PCP dráha kontroluje správnou migraci buněk a jejich polaritu v kontextu tkáně. Není aktivován žádný transkripční receptor (Leightner *et al.*, 2013). Ca^{2+} /kalmoldulin dráha se účastní různých procesů, včetně buněčné migrace a polarity, uspořádání cytoskeletu buňky a regulace kanonické signální dráhy Wnt (Kukichi *et al.*, 2009). Kromě toho, tato dráha také zahrnuje několik proteinů, které interagují s proteinem meckelin, produktem exprese genu TMEM67, jedním z charakteristických genů pro MKS (Leightner *et al.*, 2013).

Do skupiny signálních drah ovlivňující vývoj a funkci primárních řasinek dále patří dráha GTPázy Rho z proteinové super rodiny Ras, dráha proteinu PDGF (platelet-derived growth factor), protein FGF (fibroblast growth factor), receptor tyrosinkinázy nebo dráha transmembránového proteinu Notch a jeho ligandu Delta. Nicméně nebyla prokázána významná role těchto drah při patologiích spojených s MKS (Wheway *et al.*, 2018).

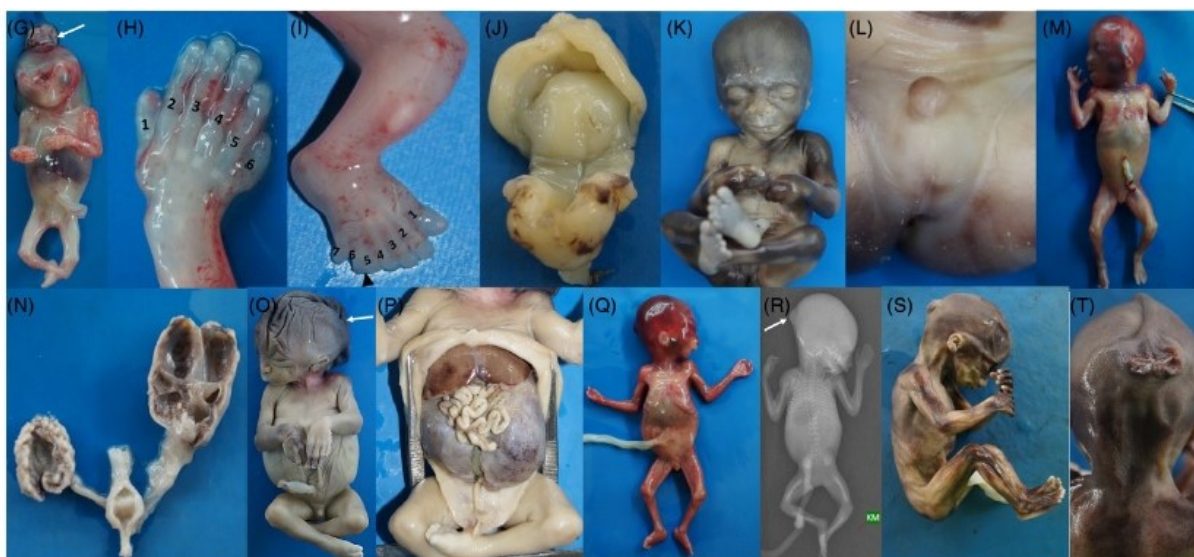
4 Klinické projevy

Meckel-Gruberův syndrom prezentuje nejhorší formu z ciliopatií v lidské populaci (Shaheen *et al.*, 2011). K typické triádě fenotypového projevu mutace vedoucí k MKS patří bilaterální polycystická nemoc ledvin, defekty centrální nervové soustavy, zvláště pak týlní encefalocela, a postaxiální polydaktylie rukou, respektive nohou. S poruchou vývoje vylučovací soustavy jsou následně spojeny fibrocystické změny jater, pankreatu a nadvarlat. U plodů mužského pohlaví někdy také bývají nejednoznačné genitálie (Auber *et al.*, 2007).

K dalším konkrétnějším projevům patří defekty neurální trubice a jiné malformace centrálního nervového systému. Ke změně také dochází ve vývoji plic a thoraxu celkově. Kvůli enormnímu nárůstu ledvin nebývá prakticky vyvinut žaludek (Tallila *et al.*, 2008).

Široká plejáda klinických projevů MKS je dána právě jeho genovou různorodostí. Stejně tak frekvence výskytu tří typických znaků je odlišná pro různé typy syndromu. Na vybrané kohortě případů byla pozorována frekvence výskytu tří výše zmíněných příznaků. Cystická nemoc ledvin je nejčastějším projevem, vyskytla se u 97.7 % případů, dále encephalocela u 83.8 % případů a polydaktylie by naměřena s frekvencí 87.3 % (Barisic *et al.*, 2015). Například polydaktylie je jasným znakem pro typ 1, ale pro typ 3 je vzácnější (Consugar *et al.*, 2007).

Přestože je MKS označován za jednu z nejzávažnějších ciliopatií, svými klinickými projevy se překrývá i s dalšími syndromy této skupiny. Největší podobnosti nabývá s Joubertovým syndromem, dále se syndromem Bardet-Biedlovým a nefronofthisis. Podobné znaky sdílí i dalšími ciliopatiemi, například Leber congenital amaurosis, Senior-Loken syndrom a syndrom Coach (Wheway *et al.*, 2019).



Obr. 4 Znázornění klinických dopadů Meckel-Gruberova syndromu. Féty vykazují klasické příklady symptomů a to týlní encefaloce (G, O, R, T), postaxiální polydaktylii rukou nebo nohou (H, I) a polycystické ledviny (N, P). Dále je znázorněna holoprosencefalie (J) nebo nedovyvinuté genitálie (L). Snímky také nabízejí celkový pohled na individuuum (K, M, O, Q, S). převzato z Radhakrishnan et al., 2019

4.1 Klinická diagnostika

První prenatální diagnostika Meckel-Gruberova syndromu pochází z roku 1975, kdy byla zjištěna zvýšená hladina α -fetoproteinu v amniové tekutině a těhotenství bylo následně přerušeno. K potvrzení patologie MKS došlo až po přerušení těhotenství. Kromě α -fetoproteinu byl také popsán případ, ve kterém MKS predikoval β -trace protein přítomný v amniové tekutině (Chemke *et al.*, 1977). β -trace protein je mikroprotein, jež se tvoří v mozkomíšním moku ve velmi malé koncentraci. Při defektu vývoje mozku dochází ke zvýšení jeho koncentrace především v séru (Reiber *et al.*, 2003).

Pomocí ultrazvuku lze MKS diagnostikovat mezi 11 – 14 týdnem těhotenství. Jako nositel syndromu je plod vyhodnocen v okamžiku, kdy vykazuje dva ze tří hlavních příznaků MKS. Jako první lze pozorovat změny vývoje ledvin, kdy dochází ke kortikomedulární diferenciaci a také se začínají objevovat malé cysty pyramidového tvaru. V následném průběhu těhotenství dochází k poklesu plodové vody, oligohydramnion, což zhoršuje podmínky diagnózy, nicméně oligohydramnion je také jedním z ukazatelů pozitivních pro syndrom. Pokud výsledky nejsou jednoznačné, využívá se fetální magnetické rezonance (Barisic *et al.*, 2015).

K mortalitě dochází ve 100 % případů. Nemoc postihuje stejnou měrou chlapce i dívky. U pozitivní diagnostiky MKS bývá těhotenství ukončeno lékaři. Děti narozené klasicky na konci třetího trimestru umírají nanejvýše pár hodin po narození, ojediněle týden. Od prvního klinického popsání nemoci byly zaznamenány pouze tři případy, kdy postižené dítě přežilo novorozenecké období. Jeden případ z roku 1995, pacient přežil 18 měsíců. Ještě kurióznější záznam pochází již z roku 1969, postižené dítě zemřelo po 28 měsících. (Parelkar *et al.*, 2013). Vyskytl se také případ, kdy postižené dítě žilo pět měsíců (Ozturk *et al.*, 2018).

4.2 Výskyt ve světové populaci

Neopomíjeným přívlastkem pro Meckel-Gruberův syndrom je, že se jedná o vzácné onemocnění. Frekvence celosvětového výskytu udává, že na každých 10 000 až 140 000 narozených dětí připadá jedno dítě se syndromem (Hopp *et al.*, 2011). Nejvyšší četnost narozených dětí s MKS byla zaznamenána mezi lety 1976 a 1982, kdy poměr mezi nemocnými a zdravými novorozenci byl 1:1 300 a tato data se výhradně týkají populace Gudžarátských Indů (Parelkar *et al.*, 2013).

U velké většiny případů došlo k projevu Meckel-Gruberova syndromu v pokrevně příbuzných rodinách. Velká část klinických reportů tak pochází ze zemí předního východu, kde jsou příbuzenské svazky stále zvyklostí. Historicky nejvyšší četnost případů byla zaznamenána u již zmíněné populace Gudžarátských Indů. Vysokého čísla výskytu poté dosahují území na předním východě (Hartil *et al.*, 2017). Další případy byly zaznamenány na severu Afriky. Mezi Evropany se MKS vyskytuje zejména ve Finsku. Zde byl také identifikován první gen vedoucí k MKS, jenž dostal označení MKS1 (Kyttälä *et al.*, 2006). Další populace s četností narození pacientů s MKS jsou zaznamenány v Tabulce 1.

Populace, národnosti/oblast	Četnost výskytu
Gudžarátsští Indové	1 : 1 300
Belgie	1 : 3 408
Saúdská Arábie	1 : 3 500
Kuvajtsští Beduini	1 : 3 530
Švýcarsko	1 : 15 177
Izrael	1 : 50 000
Německo	1 : 135 000
Velká Británie	1 : 140 000

Tabulka 1 Frekvence výskytu Meckel-Gruberova syndromu na vybraných územích. Kyttälä *et al.*, 2006; Auber *et al.*, 2007; Frank *et al.*, 2008; Barisic *et al.*, 2015; Hartil *et al.*, 2017; Assi & Al-Iman, 2019

Na základě dat získaných z EUROCAT (European Surveillance of Congenital Anomalies) byla stanovena četnost výskytu MKS v Evropě mezi lety 1990 a 2011. Ta čítala 2,6 pacienta na každých 100 000 zdravých narozených dětí. Celkově bylo porovnáno 191 případů. U 75,9 % případů bylo těhotenství předčasně ukončeno, u 6,8 % případů došlo k úmrtí fétu a u zbylých 17,3% případů došlo až k porodu živého dítěte, následně však všechny tyto děti zemřely. Tato data také přinesla procentuální zastoupení jednotlivých příznaků z triády klinických příznaků MKS. Cystické ledviny se vyskytly v 95–100 % případů, týlní encefaloce v 60–80%, a postaxiální polydaktylie u 55–75% pacientů (Barisic *et al.*, 2015).

5 Typy Meckel-Gruberova syndromu

5.1 Meckel-Gruberův syndrom typu 1

První potvrzený gen, jehož mutace vede k MKS, je lokalizován na chromozomu 17 (17q22) a nese příhodné označení MKS1. Gen byl objeven u pacientů ve Finsku, kdy u 70 % tanních pacientů byla potvrzena homozygotní mutace toho samého haplotytu. Skenovány byly vzorky 26 rodin vykazující příznaky MKS (Kyttälä *et al.*, 2006). Mutantní alela tak

dostala přízvisko Finn_{major} a je způsobena delecí 29 párů bazí v intronu 15 genu MKS1. Nositelé stejné mutace byli odhaleni také v Německu (Auber *et al.*, 2007).

MKS typu 1 vykazuje všechny klasické příznaky inklinující k syndromu, nejtypičtějším znakem je přesto polydaktylie. Mutace v genu MKS1 byla zkoumána také u nepříbuzných rodin původem ze Spojených států Amerických a Holandska. Z pěti potvrzených případů mutace MKS1 byli dva homozygoti a tři heterozygoti v mutaci. Jednalo se o složené heterozygoty, jejich fenotypový projev byl stejný jako u homozygotů (Consugar *et al.*, 2007). Postupem času se tento jev prokázal jako typický u postižených jedinců, jejichž rodiče pocházeli z odlišných míst a nebyli pokrevně příbuzní. Projev alely Finn_{major} je společnou mutací pro nepříbuzenské rodiny v evropské populaci (Consugar *et al.*, 2007).

Mks1 protein je součástí MKS komplexu v přechodové zóně, je tak lokalizován v bazálním tělísku řasinek a jeho přítomnost je zejména důležitá v epitelu ledvin. To bylo i oddemonstrováno na modelové buněčné linii (Dawe *et al.*, 2007). V ledvinové tkáni dohlíží na správné větvení mikrotubulů nebo určuje apikální a basální polaritu buněk epitelu.

Nejtypičtější mutací pro MKS1 je missense mutace, kdy je kyselina asparagová nahrazena kyselinou glutamovou. Tato mutace je konzervovaná napříč savčími druhy (Consugar *et al.*, 2007).

Exprimovaný protein obsahuje proteinovou doménu B9. Funkce této domény nebyla v okamžiku rozpoznání MKS1 známá (Logan *et al.*, 2011), další výzkumy a klinická sledování následně přinesla souvislosti s touto doménou. Doména B9 se také vyskytuje u proteinů B9d1 a B9d2, které se později prokázaly jako další proteiny vedoucí k MKS, disfunkce každého z nich je příčinou jednoho z typu MKS (viz níže). Do té doby byly tyto dva proteiny označovány pouze za „související“ s MKS, nesly označení mksr1 a mksr2 (MKS-related). Nicméně bylo jisté, že jakákoli porucha proteinů B9 vedla k některé z ciliopatií. Proteiny Mks1 a doposud označované proteiny mksr1 mksr2 jsou lokalizovány na rozhraní přechodové zóny a bazálního tělíska primárních řasinek a jejich správné umístění souvisí s jejich mutantní interakcí (Bialas *et al.*, 2009).

Mks1 je důležitý pro funkci primárních řasinek, je přiřazen k výčtu genetických poruch spojených s disfunkcí bazálního tělíska (Dawe *et al.*, 2007). Vyřazení z funkce tohoto proteinu u savců ovlivní pozici bazálního tělíska, což má za následek defekt v ciliogenezi. Nejočividněji se tento úkaz projevil na již zmíněné ledvinové tkáni (Bialas *et al.*, 2009).

Mimo bazálního tělíska je Mks1 lokalizován také v centrozomu během buněčného dělení. Navíc také může být potřebný jako strukturní protein při ciliogenezi nebo zahrnut v některé ze signálních drah (Dawe *et al.*, 2007).

5.2 Meckel-Gruberův syndrom typu 2

Při odhalování mutace vedoucí ke vzniku Meckel-Gruberova syndromu typu 2 je velmi zajímavé, že lokus se podařilo identifikovat již v roce 1998. Posloužila k tomu studie, ve které došlo k homozygotnímu mapování u pokrevně příbuzných rodin původem ze severní Afriky a Středního východu. Rodiny vykazovaly téměř identické malformace CNS. Tyto rodiny nevykázaly propojení s již známým lokusem 17q22 (MKS1). V rámci této studie se jako kandidát pro MKS gen zvažoval PHOX2A, který leží v blízkosti potvrzeného lokusu (Roume *et al.*, 1998). Gen TMEM216 se podařilo identifikovat o více než dekádu později. Pro potvrzení sloužil model Dania pruhovaného, kdy dysfunkce proteinu tmem216 vedla k

defektům již v průběhu gastrulace (Valente *et al.*, 2010). Přestože typ nese pořadové číslo 2, gen byl v pořadí objeven až jako šestý (Shaheen *et al.*, 2011)

Nonsense a sestřihové mutace jasně vedou k MKS, zatímco missence mutace v genu TMEM216 způsobují jiné ciliopatie. Vedle klasických projevů se typ dva prezentuje také ohybem dlouhých kostí.

Při klinické analýze postižení jedinci měli vždy pokrevně příbuzné předky a byla tak vždy potvrzena homozygotní mutace. Z kohorty rodin byly odhaleny čtyři alely, které nesou mutaci (Roume *et al.*, 1998).

Tmem216 patří do komplexu proteinů MKS modulu lokalizovaného v přechodové zóně primárních řasinek, nachází se na jejich membráně. Prokázalo se, že je mimo to lokalizován také v bazálním tělísku řasinek, ale také v dalších mikrotubulových strukturách, což dokazují jak myší, tak lidské vzorky tkání.

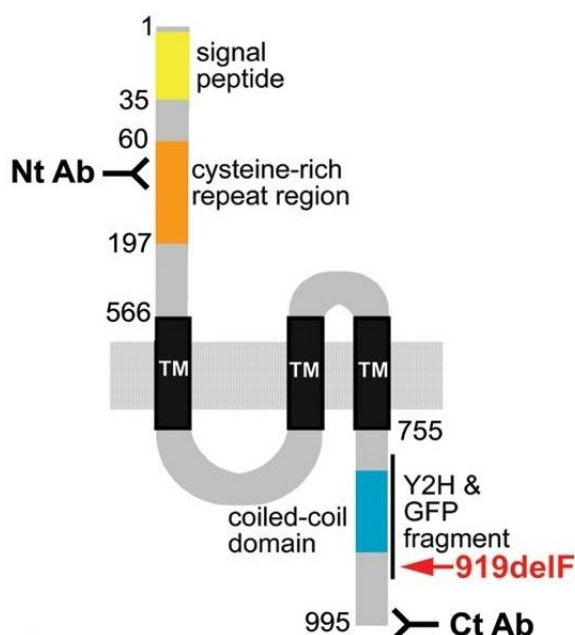
Svoji roli sehrává protein Tmem216 hned v několika signálních drahách. Bylo již předem potvrzeno, že bazální tělísko primárních řasinek je chráněno proti remodelování cytoskeletu, konkrétně aktinových vláken. Tento jev mají na starost protein PhoA a protein Desheveld z nekanonické signální Wnt dráhy určující planární polaritu buněk. Mutantní protein Tmem216 zvyšuje aktinový stres, což vede k vyšší aktivitě RhoA proteinu a také rozrušení PCP signální dráhy. Protein Tmem216 tedy zastává důležitou roli během PCP signalizace, kdy k sobě přivádí různé komponenty této signální dráhy a zefektivňuje tak Wnt signalizaci (Valente *et al.*, 2010).

5.3 Meckel-Gruberův syndrom typu 3

Ve stejném roce, kdy byl odhalen gen zapříčiňující vznik MKS typu 1, byl také objeven další gen, jež vede k MKS, a to konkrétně k typu 3. Gen TMEM67 se tak stal prvním z několika genů kódující transmembránové proteiny, jejichž mutace způsobuje MKS. TMEM67 se nachází na chromozomu 8 (8q22.1). Popsán byl nejprve u pokrevně příbuzných rodin původem z jižní Asie a Předního východu. Protein kódovaný genem TMEM67 nese původní označení Meckelin (Consugar *et al.*, 2007).

Objevení genu TMEM67 je spojeno se studii Wpk myších modelů (Wistar polycystic kidney). Model byl speciálně připraven pro sledování polycystické nemoci ledvin, nicméně fenotypovým projevem byly také rozsáhlé malformace CNS včetně hydrocefalu. Bylo prokázáno, že TMEM67 je ortologem genu Wpk. Analýza RNA prokázala mutantní mRNA v ledvinách i mozku. Wpk myši jsou tak dokonalými modely pro MKS3 (Smith *et al.*, 2006).

Protein Meckelin sdílí topologickou homologii s receptorem Frizzled (Fzd), jedním z nezbytných proteinů signálních drah Wnt (Dawe *et al.*, 2007). Mutace se nacházejí v těch částech genu, které kódují transmembránové a extracelulární domény proteinu. Konkrétně se jedná o mutace nonsense, sestřihové, posun v čtecím rámci a missence mutace. Meckelin je lokalizován na apikální membráně primárních řasinek epitelálních buněk. Mimo to se jeho přítomnost prokázala také u aktinových vláken v buňce. Knockdown genu TMEM67 vedlo v epitelu buněk ledvinové tkáně ke vzniku mnohočetných cyst (Smith *et al.*, 2006).



Obr. 5 Znárodnění struktury proteinu Meckelin. Doménová struktura prezentuje signální peptid, oblast bohatou na cystein, oblast zahrnující transmembránové části, kterých bývá od tří do sedmi, a coiled-coil doménu naznačeny jsou také dva epitopy pro dvě různé protilátky proti Meckelinu. Popsána také patologická delece proteinu, 919delF na C-konci proteinu. Převzato z Adams *et al.*, 2012.

Disheveled. Díky tomu, že Meckelin je analogem pro protein Fzd, sdílí s ním společné ligandy nekanonické dráhy determinující planární polaritu buněk. Interakce mezi Meckelinem a proteinem wnt5a byla prokázána u *Dania* pruhovaného cytoskeletu (Logan *et al.*, 2011).

Protein Nesprin 2, jež se nachází výhradně na vnější jaderné membráně, váže aktin a napomáhá správnému umístění organel. V závislosti na kooperaci Nesprin 2 s Meckelinem dopravují bazální tělísko primárních řasinek na povrch apikální strany buňky pomocí aktinového cytoskeletu (Logan *et al.*, 2011).

Protein Meckelin byl často studován a srovnáván s proteinem Mks1, pravděpodobně pro současné odhalení genů kódující tyto proteiny (Hopp *et al.*, 2011). Bylo jasně prokázáno, že pokud se projeví nulová alela u každého genu, výsledkem je omezená až žádná exprese jejich genů, zejména pak ve tkáni ledvin. Mutantní proteiny nejsou schopné se dopravit na povrch apikální strany buňky a zůstávají v endoplazmatickém retikulu. Je jisté, že oba proteiny spolu přímo interagují a ovlivňují správný vývoj řasinek. Vedle toho se také podílejí na větvení cytoskeletu v buňce. Není zatím zcela objasněno, jestli tyto dvě funkce na sebe navazují, popřípadě zda-li je špatná ciliogeneze efektem nesprávného větvení vláken v buňce (Dawe *et al.*, 2007).

Mutace v genech MKS1 a TMEM67 byly také sledovány u 17 pokrevně nepříbuzných rodin původem ze Spojených států amerických a Holandska. Bylo potvrzeno, že u pokrevně nepříbuzných rodin jsou nejčastější příčinou vzniku Meckel-Gruberova syndromu mutace právě v těchto dvou genech. Byl popsán případ jedince s pokrevně příbuzenským původem, u

Společně, protein Mks1 a meckelin regulují během ciliogeneze délku primárních řasinek a také jejich přibližný počet. Přestože proces není zcela objasněn, má se za to, že počet řasinek na buňce ovlivňují tyto dva proteiny prostřednictvím centrozomální duplikace. Vyřazení genu také zabraňuje správné migraci bazálního tělíska, což opět vede k ciliopatii (Dawe *et al.*, 2007). Celkově, při vyřazení genu byl zaznamenán jasný patogenní fenotyp jak u řasinek, tak centrozomu, což dokazuje nezbytnost proteinu meckelin při procesu diferenciaci buňky (Tammachote *et al.*, 2009).

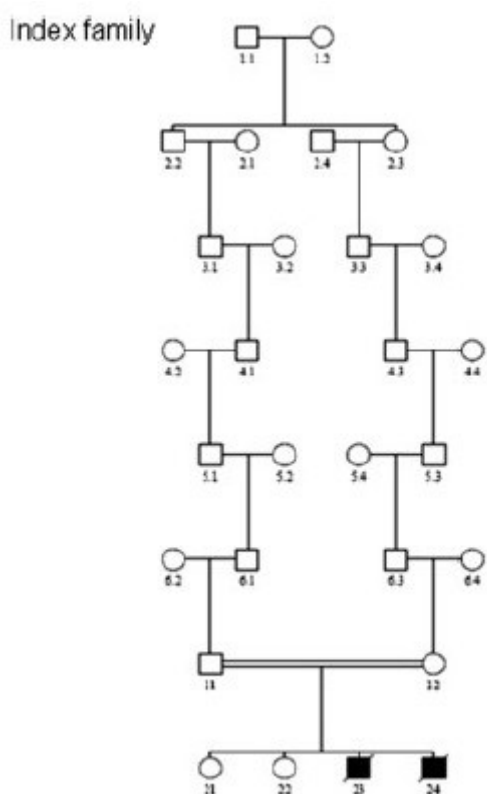
Vedle Mks1 interaguje protein meckelin také s Tmem216, kolegou ze skupiny transmembránových proteinů kódovaný genem, jež stojí v pozadí MKS typu 2 (Valente *et al.*, 2010). To inklinuje k potvrzení, že tyto dva transmembránové proteiny jsou součástí signální dráhy Wnt, fungují jako koreceptory komplexu signální kaskády a interagují s ostatními mediátory této dráhy, jež bylo potvrzeno u proteinu

něhož se vyskytla heterozygotní jev, což je jev téměř očekávaný u jedince s nepříbuznými předky. Heterozygotní mutace je pro MKS3 běžnější. (Consugar *et al.*, 2007)

5.4 Meckel-Gruberův syndrom typu 4

Byla odhalena homozygotní delece v genu CEP290 jež vedla k nefunkčnímu proteinu Cep290, Centrosomal protein of 290 kDa, protein nese také označení NPHP6, Nephrocystin-6. Gen leží na chromozomu 12 (12q21.32).

Protein se účastní centrozomální segregace, dále se nachází v primárních řasinkách, centrozomu a také v jádru. V primárních řasinkách je lokalizován v přechodové zóně, kde se součástí MKS komplexu interaguje zejména s proteiny Tctn1, Rpgp, Cc2d2a (Coppieters *et al.* 2010). Gen CEP290 má na svědomí širokou škálu syndromů i izolovaných onemocnění. Mutace v tomto genu zapříčiňují mimo MKS a již známých Joubertova a Bardet-Biedlova



Obr. 6 Znárodnění příkladu pokrevně příbuzné rodiny. Rodokmen Kosovo-Albánské rodiny s několika stupňovou příbuzností, kde došlo k opakovanému projevu Meckel-Gruberova syndromu. Převzato z Frank *et al.*, 2008

mikrotubulů (MTOC) a tudíž ke špatnému dělení buněk. Také bylo zjištěno, že mohou vést ke špatnému vedení v axonech, což může vysvětlit malformaci mozku při MKS. Všechny známé mutace v CEP290 jsou nonsense, posunové nebo sestřihové mutace. Samozřejmě platí, že kromě typu a lokalizace mutace vedou také další faktory ke konkrétnímu fenotypu (Baala *et al.*, 2007).

Podnět pro studování genomu a odhalení nového genu vedoucího k MKS bylo tvrzení, že MKS1 a MK3 jsou majoritními geny vedoucí k syndromu u pokrevně nepříbuzných rodin

pocházejících z Evropy. Screening těchto genů u 120 pacientů však mutaci potvrdil pouze v 7% případů (Frank *et al.*, 2008).

Analýza genomu pokrevně příbuzné rodiny odhalila tu samou děděnou mutaci, homozygotní haplotyp. Studie popisovala případ rodiny s Kosovo-Albánským původem. U rodiny došlo dvakrát k přerušení těhotenství na základě ultrazvuku, který prokázal příznaky vedoucí k MKS. Po získání dat a ověření výsledků byl gen CEP290 stanoven jako výborný kandidát pro nový gen zapříčiňující MKS. Další rodina pocházela z Kosova a oba postižené plody vykazovaly mutantní homozygotní haplotyp pro CEP 290.

Také byl proveden sken u osmi rodin, které nebyly přiřazeny ani k jednomu z doposud potvrzených genů spojených s MKS. Čtyři rodiny byly pokrevně příbuzné. U pěti postižených dětí z těchto rodin byly odhaleny dva homozygotní po sobě jdoucí mikrosatelity lokalizované na chromozomu 12. Další analýzou byl pozorován pouze jediný úsek se společnou homozygotní oblastí, konkrétně na 12q21. Mikrosatelitové markery při následném zkoumání obklopovaly gen CEP290. Tato analýza potvrdila homozygotitu u plodů, nikoli však u nepostižených dětí (Frank *et al.*, 2008).

Jiná studie analyzovala vzorky čtyř postižených rodin. Identifikováni byli homozygoti mutace, ale i složení heterozygoti v rámci genu Cep290 (Baala *et al.*, 2007).

5.5 Meckel-Gruberův syndrom typu 5

Díky skenovací metodě genome-wide linkage scan se podařilo identifikovat pátý lokus a v pořadí čtvrtý gen, který stojí v pozadí Meckelova syndromu. Typ 5 způsobuje mutace v genu RPGRIP1L nacházející se na chromozomu 16 (16q12.2). Protein nese vedle Nephrocystin-8 a RPGRIP1-like protein označení protein fantom a v buňkách se vyskytuje v centrozomu a také v bazálním tělísku primárních řasinek. Striktně není spojen s ciliogenezí, zato sehraává roli při určování planární buněčné polariry (Roepman *et al.*, 2005). Existuje i hypotéza, že je gen zahrnut v mechanismu programované buněčné smrti (Roepman *et al.*, 2000).

Zajímavostí je, že různý projev alel genu způsobí dokonce odlišný syndrom. Pro tento gen bylo odhaleno několik typů mutací, které všechny vedly k projevu MKS (Khanna *et al.*, 2009).

Nové místo v genomu bylo rozeznáno u dvou rodin již dříve prokázaných jako nositelé MKS syndromu a dvou dalších rodin s Joubertovým syndromem. V případě MKS způsobuje typ 5, pro JBS zapříčiňuje typ 7. Gen byl uznán za jeden z MKS genů také pro svou již dříve zaznamenanou interakci s s proteinem NPHP4 (rodina proteinů, kde NPHP6 je jiné označení pro CEP290 a NPHP3 vede k MKS7) (Delous *et al.*, 2007).

Mutace v genu jsou buď nonsese nebo v posunu čtecího rámce. Jako nejvýraznější fenotyp se projevují enormní ledvinové cysty a závažné abnormality mozku, zejména encefaloce a anencefalie. Určitý alelismus vede k degradaci sítnice u jiných ciliopatií, například u Bardet-Biedlova syndromu (Khanna *et al.*, 2009).

5.6 Meckel-Gruberův syndrom typu 6

Gen CC22D2A byl objeven v pořadí jako pátý gen, který stojí v pozadí MKS. Podařilo se jej odhalit díky přezkoumání 10 případů postižených plodů, které vykazovaly homozygotní mutaci a nebyl k nim přiřazen doposud žádný známý gen spojený s MKS. U šesti z těchto

deseti případů byla odhalena přesahující homozygotní oblast na chromozomu 4 (4p15.32). První studovanou tkání postižených plodů byly fibroblastové buňky (Tallila *et al.*, 2008).

Cc2d2a (Coiled-coil and C2 domain-containing protein 2A) je jeden z komponentů MKS komplexu lokalizovaného v přechodové zóně a slouží jako bariera zabraňující difúzi transmembránovým proteinům mezi primární řasinkou a cytoplazmou.

Ve Finsku se poprvé vyskytl případ, kdy plod vykazoval homozygotní mutaci v sestřihu a příčina byla objevena v genu CC2D2A. Plod byl na základě klinických příznaků vyhodnocen jako nositel Meckel-Gruberova syndromu. Byla provedena studie, kdy se zkoumaly vzorky pacientů s MKS a zaměřilo se právě na gen CC2D2A. V rámci několika dalších pozorování se odhalilo 14 nových sestřihových mutací v 11 případech. Toto jasně prokázalo vznik MKS v genu CC2D2A (Tallila *et al.*, 2008).

Po odhalení genu CC2D2A jakožto dalšího činitele MKS byly přezkoumány doposud popsáné případy ve Finsku a došlo se k novým závěrům. Do této doby bylo genu MKS1 90 % případů ve Finsku, následně bylo prokázáno, že MKS1 může pouze za 68 % případů a 21 % má na svědomí právě CC2D2A. Zbylým 11 % zatím nebyl přiřazen žádný gen (Tallila *et al.*, 2008).

Pozorovány byly i případy 120 plodů pocházejících z 28 pokrevně příbuzných rodin nebo rodin, jež vykazovali mutace v některých z doposud známých genech. 7 plodů bylo shledáno jako nositeli homozygotní mutace v CC2D2A, kdežto plody nepříbuzných rodin vykazovaly jen určitou spojitost s tímto genem. Dále v 9 z 12 případů, kdy nebylo možné přiřadit doposud známé geny, se také potvrdila mutace právě v tomto genu. Z doposud zaznamenaných případů Meckel-Gruberova syndromu bylo celkově k CC2D2A přisouzeno 10 % (Mougou-Zerelli *et al.*, 2009).

Pro sledování MKS typu 6 byly užity myší modely, některé byly přirozené, jiné připravené. Stejně jako v lidské populaci, přirozená ztráta funkce proteinu vede k embryonální letalitě kvůli ztrátě primárních řasinek a pozměněné mikrotubulární stavbě ve zbytku buňky. Nicméně platilo to pouze pro určité buněčné typy. U uměle připravených myších mutantů se vyskytly fenotypové varianty ledvin nebo velmi vážné degenerace sítnice. Bylo tím prokázáno, že přestože protein CC2D2A je esenciální komponentou MKS komplexu v každé primární řasince, jeho disfunkce se projeví jen v některých tkáních. Kromě ciliogeneze je také důležitý pro udržování primárních řasinek po jejich vyvinutí. To stále platí jen pro některé buněčné linie. V okamžiku, kdy ciliogeneze již proběhla a primární řasinky jsou zformované a odstraní se MKS6 faktor, dochází k redukci počtu řasinek u oněch tkání. Konkrétně tento jev byl zaznamenán u sítnice a ledvin (Lewis *et al.*, 2019)

CC2D2A se speciálně podílí na signalizační aktivitě, má významnou roli v nekanonické Wnt signální dráze, neboť protein obsahuje C2 doménu, která přímo interaguje s ionty Ca²⁺. Navíc bylo prokázáno, že tyto ionty samotné mají významnou roli v embryonálním vývoji, jejich působení je mimo jiné spojeno s levo-pravou asymetrií a formování cyst v ledvinách. Byla také provedena studie, kdy se hledal ligand pro kalmodulin, receptor pro vápenaté ionty, a CC2D2A byl určen jako vhodný kandidát pro tuto roli. Další zkoumání odkrylo fungování centriol v buňkách pacientů. U postižených tkání migrovaly centrioly nesprávně, byly lokalizované v apikální oblasti buněk a nebyly tak schopné správně zformovat řasinky (Mougou-Zerelli *et al.*, 2009).

Celkově se přisuzují CC2D2A dvě funkce ve spojení s funkcí řasinek. Molekulární funkcí je správné uspořádání a formování řasinky a druhou funkcí je jeho role jako

kompartmentu signální nekanonické dráhy Ca^{2+} dependentní. Příkladem pro nesprávné vedení Ca^{2+} je vznik polycystické nemoci ledvin.

5.7 Meckel-Gruberův syndrom typu 7

7. typ Meckel-Gruberova syndromu vzniká mutací v genu NPHP3, lokalizován na chromozomu 3 (3q22.1). Tento gen je jedním ze dvou genů z řady genů, který vedle MKS nevede i k Joubertovu syndromu. Namísto toho má velmi blízko k jiné ciliopatii, nefronofthisis.

U homozygotních mutantů, jak lidských, tak i myších, byla prokázána nezbytnost NPHP3 při časném vývoji. Jeho disfunkce vede k nepravidelnosti v levo-pravé asymetrii těla, potažmo až k embryonální letalitě. Právě objevené případy, které vedly k letalitě, přiřadily tento gen k MKS (Bergmann *et al.*, 2008).

Nejsilnějším klinickým projevem tohoto typu je cystická nemoc ledvin, jež sama o sobě nese vlastnost heterogenního onemocnění (Torres & Harris, 2006).

Klinický případ sledoval tureckou pokrevně příbuznou rodinu, která před studií spadala do kategorie Meckel-Gruber podobný syndrom. Příčina vzniku multicystické nemoci ledvin a malformaci jater byla lokalizována na chromozom 3. Sekvenování podezřelých genů odhalilo homozygoty v NPHP3. Vzorky pro zkoumání byly odebrány z fétů. Graviditu mimo zmíněných příznaků doprovázel také snížený objem plodové vody, oligohydramnion, což pro plod nebylo slučitelné se životem. Letalita rozhodla při diagnostice ve prospěch 7. typu Meckelova syndromu. Dalšími případy byly dvě rodiny z Afriky, kdy plody vykazovaly kromě již zmíněných příznaků také nefunkčnost vylučovací soustavy, rozsáhlé cysty na játrech a pankreatu, malformaci srdce a lebku se zvětšenými fontanelami. Obě děti zemřely krátce po narození, obě byly homozygotní mutanti v NPHP3 (Bergmann *et al.*, 2008).

Studie při, které byla demonstrována mutace na myších modelech s mutantním proteinem Nphp3, prokázala, že tato mutace vede k plejádě defektů, jakými jsou polydaktylie, malformace centrální nervové soustavy, různorodé anomálie vylučovací soustavy spojené s defekty pohlavní soustavy, poruchy ve vývoji srdce (Olbrich *et al.*, 2003).

5.8 Meckel-Gruberův syndrom typu 8

Typ 8 je způsoben mutací v genu TCTN2 lokalizovaném na chromozomu 12 (12q24.31). Tento gen patří do rodiny Tectonic proteins, kde byly popsány celkem tři geny, TCTN1, TCTN2, TCTN3 (Huppke *et al.*, 2015). Tato rodina proteinů se vyskytuje v komplexu spolu s dalšími proteiny v přechodné zóně primárních řasinek. TCTN1 reguluje signalizační dráhu Sonic hedgehog. Na myším modelu však bylo zjištěno, že nemá klíčovou roli ve všech tkáních (Garcia-Gonzalo *et al.* 2012). TCTN2 se z celé rodiny tektonických proteinů vyskytuje nejbližší membráně řasinek, což může být příčinou patologie v případě mutace tohoto proteinu. Obecně role tohoto proteinu ve struktuře není zcela jasná (Weng *et al.*, 2018).

Poprvé byl identifikován nový MKS lokus týmem vědců v Saudské Arábii a bylo mu přiřazeno označení MKS8. Tento lokus byl potvrzen ve třech arabských rodinách, ve kterých již byly dříve doložené případy MKS, v předešlých případech se jednalo o jiné mutace. Rodiče postižených jedinců byli pokrevně příbuzní. Ve dvou rodinách došlo ke sňatku mezi bratřenci a sestřenicemi, ve třetí rodině mezi dětmi dvou bratřenců. Všechny postižené děti

těchto rodin zemřely do dvou hodin po narození, ve dvou případech byla těhotenství ukončena předčasně, v 15. a 36. týdnu gravidity.

Výsledkem zkoumání vědeckého týmu bylo odhalení, že mutace je způsobena homozygotitou v genu pro TCTN2, což vede k úplnému přerušení normálního sestřihu a vznikly dva aberantní transkripty.

Výzkum probíhal na myších modelech. K pozorování byly použity různé tkáně z dospělé myši. Protein *Tctn2* byl exprimován ve všech typech tkání, nicméně prokazatelný efekt mutace se vyskytl v mozku, ledvinách a očích, orgánech defektních při prokázání MKS. Kromě toho proběhla také in situ hybridizace na myším embryu, čímž byl také detekován efekt mutantního proteinu *Tctn2* v mozku, ledvinách, ale i neurální trubici, končetinách a srdci (Shaheen *et al.*, 2011).

5.9 Meckel-Gruberův syndrom typu 9

Gen pro MKS9 byl objeven v pořadí jako sedmý a nachází se na chromozomu 17 (17p11.2). Pro zjištění genu bylo použito sekvenování nové generace, metody RainDance microdroplet-PCR a IlluminaGAIIx sekvenování. Při screenování doposud známých šesti genů byly potvrzeny dvě mutantní alely pouze u 52 % ze 46 rodin. To vedlo k jasnému závěru, že genová heterogenita syndromu je rozsáhlejší a dalo tak podnět k využití next-generation sekvenování příslušné kohorty pacientů. Osekvenováno bylo 31 ciliopatických genů u 12 pokrevně příbuzných MKS rodin. Vedle triády klinických projevů pro MKS se vyskytla také zkrácená žebra a nejednoznačné genitálie (Hopp *et al.*, 2011).

Struktura proteinu B9d1 je velmi podobná proteinu *Mks1* a stejně tak hraje významnou úlohu při ciliogenezi. Jejich podobnost je založena zejména na přítomnosti domény B9 u obou proteinů. Stejná doména se nachází také u proteinu B9D2 (Hopp *et al.*, 2011). Pro B9D1 a stejně tak i pro MKS1 platilo, že jsou mutantní pouze pro MKS. Odhalení odlišných mutací v těchto genech prokázalo, že geny vedou také k ciliopatii JBS (Romani *et al.*, 2014).

Genem kódovaný protein nese jméno B9 domain-containing protein 1 nebo také *Mks1*-related 1 a nachází se v bazálním tělísku primárních řasinek u savců a tvoří bariéru, která brání samovolné difúzi transmembránových proteinů mezi primární řasinkou a cytoplazmatickou membránou (Hopp *et al.*, 2011).

Esenciálním partnerem pro B9d1 je transmembránový protein *Tmem231* (viz dále). Společně dbají na správné formování přechodové zóny řasinek, lokalizaci a správném uspořádání MKS komplexu v přechodové zóně. Jsou důležití pro vzájemnou lokalizaci, ale i společně pro uspořádání ostatních proteinů. Přítomnost této dvojice byla potvrzena v mnoha typech tkání. Při ztrátě funkce B9d1 dochází k absenci proteinů *Mks1* a Meckelin v komplexu MKS. Naopak protein *Rpgrip11* funkci B9d1 nevyžaduje pro své správné umístění v komplexu v přechodové zóně (Roberson *et al.*, 2015).

Tato dvojice je stejně tak typická pro MKS jako pro syndrom JBS. Myší model, který postrádal funkci proteinu B9d1 vykazoval fenotyp typický pro MKS. Pro ciliogenezi je proteinová rodina zahrnující doménu B9 evolučně konzervovaná.

Na uspořádání membrány primárních řasinek se B9d1 podílí spolu s proteinem *Tctn1*, jenž patří do stejné rodiny jako protein *Tctn2* (Meckel-Gruberův syndrom typu 8). Tyto dva

proteiny jsou důležitými faktory pro protein Smo signální dráhy Hedgehog (Roberson *et al.*, 2015).

5.10 Meckel-Gruberův syndrom typu 10

Gen pro 10. typ MKS se nachází na chromozomu 19 (19q13.2). Kódovaný protein B9D2 Protein B9 domain-containing protein 2 spolu s Mks1 a B9 domain-containing protein 1 tvoří třílístek proteinů MKS komplexu, které obsahují doménu B9. Vzájemně podporují svou funkci při ciliogenezi u savců a lokalizaci proteinů komplexu MKS. Pro všechny tři proteiny bylo potvrzeno, že jejich B9 doména se nachází v bazálním tělísku u savců, nicméně v přechodové zóně u Hád'átka obecného. U B9d2 také platí, že se nachází i v axonemě řasinky (Dowdle *et al.*, 2011).

Přítomnost komplexu trojice proteinů není esenciální pro všechny organismy oplývající řasinkami, a tudíž nejsou nepostradatelné pro zformování řasinek, jak nepohyblivých, tak pohyblivých (Bailas *et al.*, 2009).

Oproti B9D1 není B9D2 evolučně konzervovaný. Byla detekována homozygotní missense mutace Proteiny B9d2, B9d1 a Mks1 mezi sebou interagují přímým kontaktem, tato missense mutace způsobí změnu formy proteinu B9D2 a přeruší tak interakci s proteinem Mks1.

Myší mutanti pro každý z B9 proteinů však nevykazují naprosto identický fenotyp. Delece B9d2 způsobuje cysty ledvin, hydrocefalus a změnu formy řasinek v CNS.

Zaznamenán byl jeden klinický případ spojen s mutací v B9D2. Pětistupňová rodina původem ze Surinamu s indicko-pákistánskými kořeny, u které došlo k projevu cystické nemoci ledvin, malformace duktů jater, polydaktylie a týlní encefaloce u dvou postižených jedinců. Sekvenování odhalilo homozygotní missense mutaci, kdy došlo k náhradě serinu (Ser101) za arginin, a to u obou postižených jedinců ve stejném místě genu. Tato mutace není nikterak evolučně zachována, jedná se o mutaci *de novo* (Dowdle *et al.*, 2011).

Protein je také vyžadován pro signální dráhu Shh v neurálních kmenových buňkách. Mutace rozruší pevnou fyzickou interakci a proteiny nejsou pevně asociované s přechodovou zónou. Nicméně, ani jeden z mutantních proteinů nemá kritický dopad na uspořádání přechodové zóny, strukturu řasinky nebo chemo a osmosenzorickou signalizaci (Bailas *et al.*, 2009).

5.11 Meckel-Gruberův syndrom typu 11

Jako gen způsobující typ 11 Meckel-Gruberova syndrom byl stanoven další gen kódující transmembránový protein, gen TMEM231. Leží na chromozomu 16 (16q23.1). Protein Tmem231 patří s dalšími komponenty do komplexu MKS ležící v přechodové zóně primárních řasinek. Hlavní rolí proteinu je správné formování a fungování přechodové zóny. Bývá také označován jako kritický pro ciliogenezi a správné formování komplexu. Tmem231 spolu s B9d1 (defekt tohoto proteinu je příčinou MKS typu 9, viz výše) tvoří pro sebe vzájemně nezbytnou dvojici a spolu se podílejí na správné lokalizaci dalších komponentů MKS komplexu v přechodové zóně. Mimo to tyto partneři také kontrolují správnou kompozici membrány primární řasinky. Tato dvojice dále interaguje s proteiny Tmem67 a Mks1, důkaz přinesla studie provedená u myší. U *C. elegans* je situace obdobná, funkce Tmem67 prakticky stejná (Roberson *et al.*, 2015). Oba tyto proteiny také zahrnuje komplex MKS (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2011).

Bylo odhaleno celkem osm mutací pouze v TMEM231 které vedou k MKS. Mutace v tomto genu nicméně nevede pouze k typu 11 MKS, ale způsobuje také syndrom úst, tváře a prstů typ 3 (OFD3) (Roberson *et al.*, 2015).

Studie u myši a *Caenorhabditis elegans* prokázaly evoluční zachovalost proteinu Tmem231. Myší embryo mutantní v TMEM231 vykazovalo typické znaky pro ciliopatie. Myší embryo se ztrátou funkce Tmem231 vykazovalo obdobný fenotyp jako myši s mutací v kterémkoli jiném komponentu z komplexu MKS přechodové zóny, a navíc tento fenotyp odpovídal i lidským příznakům (Roberson *et al.*, 2015).

V saudské Arábii byl prozkoumán klinický případ dvou rodin, které byly vždy v rámci vlastního rodokmenu pokrevně příbuzné. Tyto rodiny byly poté označeny jako první, u kterých byla prokázána příčina syndromu mutace v genu TMEM231. Obě rodiny byly klasifikovány jako nositelky MKS syndromu, nepotvrdila se ovšem žádná z dosud známých mutací. Bylo proto využito exomové sekvenování, následované autozygomatickou filtrací. Tyto metody odhalily gen TMEM231 jako nové místo zapříčiňující MKS. Kromě toho bylo uznáno, že tento gen je také příčinou pro vznik již tak velmi překrývající se ciliopatie, Joubertova syndromu. V první rodině došlo ke sňatku mezi bratrancem a sestřenicí. Manželé přišli o dvě těhotenství, první byl spontánní potrat, při druhém plod jasně vykazoval tři charakteristické znaky pro MKS a těhotenství bylo přerušeno. Při analýze vzorků odebraných od obou rodičů a nenarozeného dítěte byla potvrzená jediná mutace, homozygotní varianta genu TMEM231, která vedla k aberantnímu sestřihu. V předchozích studiích byla již objevena missence mutace v genu TMEM231, mutace se však nepřisoudila k MKS, neboť se jednalo o heterozygotní variantu. Opětovné prozkoumání této sekvence pomocí exonového sekvenování prokázalo, že se jedná o homozygotní mutaci a byla tedy uznána za právoplatnou mutaci genu TMEM231 vedoucí k MKS. Na druhou stranu, heterozygotní mutace v genu TMEM231 byly prokázány jako příčiny Joubertova syndromu. Homozygoti vedou ke klasickému MKS, heterozygoti k JBS (Shaheen *et al.*, 2013).

Kromě toho, mutace v TMEM231 byla také odhalena u čtyř rodin, z kterých se již dříve potvrdil syndrom MKS. U dvou rodin se jednalo také o homozygota, u dalších dvou postižení jedinci byli složeni heterozygoti (Shaheen *et al.*, 2013).

5.12 Meckel-Gruberův syndrom typu 12

Tento typ syndromu byl přiřazen k mutaci vzniklé v genu Kif14 lokalizovaného na chromozomu 1 (1q31) (Filges *et al.*, 2014). Tento protein, kinesine-like protein 14, patří do skupiny proteinů mající funkci mikrotubulárních motorů a podílejí se na intracelulárním transportu (Miki *et al.*, 2015). Protein Kif14 se v lidské populaci exprimuje zejména v embryonální tkáni, v dospělosti poté v ledvinách, játrech, plicích, vaječnících, thymu a děloze (Filges *et al.*, 2014).

Pro tento typ MKS byla vyšetřována Kavkazská rodina vykazující klasické příznaky pro MKS. Rodiče postiženého dítěte nebyli pokrevně příbuzní. Rodina byla zkoumána na základě příznaků, které vykazoval postižený plod na začátku druhého trimestru, jednalo se již o druhé těhotenství ženy. Tyto projevy byly téměř identické s příznaky projevujícími se během prvního těhotenství. Příznaky byly odhaleny pomocí ultrazvuku a obě těhotenství byla předčasně ukončena. V obou případech se jednalo o abnormální malformace mozku, nevyvinutými ledvinami, respektive abnormální vývoj, a nedostatek plodové vody.

Vzorky pro výzkum byly odebrány od obou rodičů a dítěte z druhého těhotenství. Při zkoumání byla odhalena heterozygotní mutace v exonu 9, u matky se jednalo o delecii dvou párů bází, u otce o substituci jednoho páru bází. Obě mutace nebyly předtím známy. Pro vyšetření byla použita metoda WES – whole exome sequencing. Rodiče byli nositelé mutace vždy v jiném místě genu. Potomek tedy byl složený heterozygot, jeho fenotypový projev se projevil stejně jako u klasického homozygota (Filges *et al.*, 2014).

Kromě rodiny z Kavkazu byla mutace identifikována a popsána také na myších jedincích. Myši byly postiženy zejména v oblasti hlavy, kdy došlo k nedovyvinutí mozku, redukcii hipokampu a prodloužené míchy. Hlava byla zploštělá. Jednalo se o homozygotního mutantu v genu KIF14 (Fujikura *et al.*, 2013).

5.13 Meckel-Gruberův syndrom typu 13

Poslední zatím určený typ MKS, typ 13, způsobuje mutace v genu kódující opět protein z rodiny transmembránových proteinů a gen nese označení TMEM107, protein poté transmembránový protein 107. Celkově se jedná o čtvrtý protein z této rodiny, jež zapříčiňuje vznik MKS. Gen se nachází na chromozomu 17 (17p13.1). Jeho role je zejména potřebná při signální dráze Sonic Hedgehog při formování neurální trubice. Během ciliogeneze také reguluje správné umístění proteinů MKS komplexu v přechodové zóně. Protein se skládá ze čtyř transmembránových domén (Lambacher *et al.*, 2016).

Jako kohortu pro potvrzení 13. typu syndromu si skupina vědců zabývající se touto problematikou opět zvolila rodiny původem ze Saudské Arábie. U všech sledovaných rodin existoval příbuzenský vztah mezi rodiči postiženého jedince. Celkově bylo osloveno 25 rodin, u kterých se objevily charakteristické znaky pro MKS. Pro analýzu genomu rodin byla použita metoda next-generation sequencing, Massively parallel sequencing. Díky této metodě byla odhalena mutace ve zcela novém lokusu obsahující gen TMEM107. Tato mutace se projevila v homozygotní variantě a jednalo se o nonsense mutaci, jež vedla k aberantnímu sestříhu. Pro detailnější studii byla použita fibroblastová tkáň pacientů. Bylo jasně prokázáno, že mutace v TMEM107 zapříčinila defektní ciliogenezi v souvislosti s nefunkční Shh dráhou (Shaheen *et al.*, 2015).

Mimo sledování tkání lidských pacientů byly také připraveny myší modely s mutací v genu TMEM107. U těchto myší došlo k jasné redukcii ciliogeneze, u několika případů naopak dorostly primární řasinky do nepřirozené délky. Ztráta funkce genu TMEM107 vede k projevům, které přímo korespondují s MKS v lidské populaci. Primární řasinky jsou zásadní pro správné fungování signální dráhy Sonic Hedgehog a pacienti s mutantním genem TMEM107 měli jasně tuto dráhu narušenou. Role genu TMEM107 pro správné fungování Shh signální dráhy je konzervovaná u myší i u lidí. Tato mutace přesahuje i k jiným ciliopatiím, zejména pak zapříčiňuje syndrom úst, tváře a prstů a pravděpodobně i Joubertův syndrom typ 29 (Christopher *et al.*, 2012).

Protein TMEM107 patří do komplexu proteinů MKS v přechodové zóně primárních řasinek. Interaguje spolu s dalším proteinem komplexu NPHP4, společně napomáhají správné formaci přechodové zóny.

6 Ciliopatie podobné Meckel-Gruberovu syndromu

Syndromové onemocnění patřící do skupiny ciliopatií mají vždy značné přesahy jak v klinických příznacích, tak v genetické a molekulární podstatě. Vždy se jedná o dědičné onemocnění, a to jak ve formě autozomálně dominantní, tak i autozomálně recesivní (Barker *et al.*, 2015). Pro níže diskutované onemocnění včetně MKS platí, že se jedná o autozomálně recesivní onemocnění. Každé počaté dítě rodičů přenašečů má tedy 25% šanci, že bude postižené.

Jak již bylo zmíněno výše, MKS určuje 13 genů, na základě čehož je určeno 13 typů syndromu. Prokázalo se, že další geny se také podílejí na vzniku MKS, zatím jim nebyl přidělen samostatný typ. Žádný z těchto genů nekóduje výhradně pouze přiřazený typ MKS. Mutace v každém z těchto genů vede vždy ke vzniku alespoň dvou ciliopatií. Dokazuje to fakt, že se ciliopatie nepřekrývají pouze klinickými projevy, ale také zasaženými lokusy (Bruel *et al.*, 2017).

Následující tabulka prezentuje 13 genů determinujících kromě 13 typů Meckel-Gruberova syndromu další ciliopatie, kterým byl také konkrétní lokus přiřazen.

Gen	Fenotyp	Jiná označení genu	Lokalizace na chromozomu	Další ciliopatie
MKS1	Meckel-Gruberův syndrom 1	BBS13	17q22	Joubertův Syndrom 28, Bardet-Biedlův syndrom 13
TMEM216	Meckel-Gruberův syndrom 2	JBTS2, CORS2	11q12.2	Joubertův Syndrom 2
TMEM67	Meckel-Gruberův syndrom 3	JBTS6, NPHP11	8q22.1	Joubertův Syndrom 6, Bardet-Biedlův syndrom 14, Nefronofthisis, COACH syndrom, RHYNS syndrom
CEP290	Meckel-Gruberův syndrom 4	KIAA0373, 3H11AG, JBTS5, SLSN6, LCA10, BBS14	12q21.32	Joubertův Syndrom 5, Bardet-Biedlův syndrom 14, Nefronofthisis, Senior-Loken syndrom 6, Laber congenital amaurosis 10
RPGRIP1L,	Meckel-Gruberův syndrom 5	KIAA1005, JBTS7	16q12.2	Joubertův Syndrom 7, Nefronofthisis, COACH syndrom
CC2D2A	Meckel-Gruberův syndrom 6	KIAA1345	4p15.32	Joubertův Syndrom 9, COACH syndrom
NPHP3	Meckel-Gruberův syndrom 7	NPH3, RHPD1	3q22.1	Nefronofthisis, Renal-hepatic-pancreatic dysplasia
TNTC2	Meckel-Gruberův syndrom 8	TECT2	12q24.31	Joubertův Syndrom 24

B9D1	Meckel-Gruberův syndrom 9	MKSR1	17p11.2	Joubertův Syndrom 27
B9D2	Meckel-Gruberův syndrom 10	MKSR2	19q13.2	Joubertův Syndrom 34
TMEM231	Meckel-Gruberův syndrom 11	JBTS20	16q23.1	Joubertův Syndrom 20
KIF14	Meckel-Gruberův syndrom 12	KIAA0042	1q32.1	Primary autosomal recessive microcephaly 20
TMEM107	Meckel-Gruberův syndrom 13	TMEM107	17p13.1	Joubertův Syndrom 29?, Orofaciodigital syndrome

Tabulka 2 Přehled 13 genů, které vedou k MKS. Vždy popsáno, který typ způsobují, jaké jiné označení gen nese, lokus a další patologie, jež způsobuje. Zdroj Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®

6.1 Joubertův syndrom

Obdobně jako MKS disponuje i Joubertův syndrom (JBS) třemi charakteristickými znaky. Velmi výrazná je malformace centrální nervové soustavy, konkrétně mozečku a mozkového kmene, kde vzniká útvar, který svou strukturou připomíná stoličku (Molar tooth sign), jedná se o kombinaci několika abnormalit mozku. Dále syndrom typizuje hypotonie a v poslední řadě opožděný vývin (Akhtar *et al.*, 2019). Hypotonie neboli nízký svalový tonus vede ke špatné koordinaci pohybu. První náznaky se začínají projevovat již v kojeneckém období, v tomto stádiu vývoje také pozorujeme zrychlené, respektive zpomalené dýchání a abnormální pohyby očí. Opožděný vývin se projevuje u závažnějších případů. To doprovází mentální retardace v celé škále závažnosti, od lehkých projevů po velmi závažnou retardaci. Dalšími znaky pozorovatelné u JBS jsou také znaky opět přesahující do charakteristik jiných ciliopatií, včetně různorodých nemocí ledvin a celé vylučovací soustavy, dysfunkce ledvin a abnormálního vývinu skeletonu včetně polydaktylie (Romani *et al.*, 2013).

JBS zapříčiňují mutace ve 34 různých genech, 33 z nich je lokalizováno na autozomech, poslední na chromozomu X. 11 genů zároveň je zásadních i pro MKS (Bachmann-Gagescu *et al.* 2015). Proteiny produkované těmito geny klasicky vedou k disfunkci primárních řasinek. V celosvětovém měřítku připadá na každých 80 000 až 100 000 nově narozených dětí jedno s tímto syndromem (Romani *et al.*, 2013). Joubertův syndrom zapříčiňuje úmrtí pacientů jen velmi ojediněle. V porovnání s MKS se nejedná o letalitu v prenatálním období nebo právě narozených jedinců (Dempsey *et al.*, 2017).

6.2 Bardet-Biedlův syndrom

Bardet-Biedl syndrome (BBS) je autozomálně recesivní dědičné onemocnění, jež determinují mutace v celé plejadě genů. Syndrom se prokazuje zejména obezitou, vysokým krevním tlakem a kardiovaskulárními abnormalitami. Kromě toho onemocnění charakterizuje dystrofie sítnice až úplná absence čípků, hypogonadismus a další anomálie genitálií a porucha učení. Dále k příznakům patří postaxiální polydaktylie a dysfunkce vylučovací soustavy, které

typicky nalezneme i u MKS. První diagnózy vznikly na základě určení výše zmíněných projevů (Sowjanya *et al.*, 2011).

Tento syndrom se s MKS nepřekrývá v tolika genech jako Joubertův syndrom. Celkově je ale způsobován mutacemi v daleko větším počtu genů, než je tomu u MKS. Dohromady bylo definováno 21 typů BBS, obdobně jako u MKS nesou označení BBS1 až BBS21 (Khan *et al.*, 2016). Byla provedena pozorování výskytu BBS v populaci na dvou světových územích. Četnost výskytu u novorozenců je 1:160 000 v Evropě a 1:13 500 u arabské populace (Forsythe & Beales, 2012).

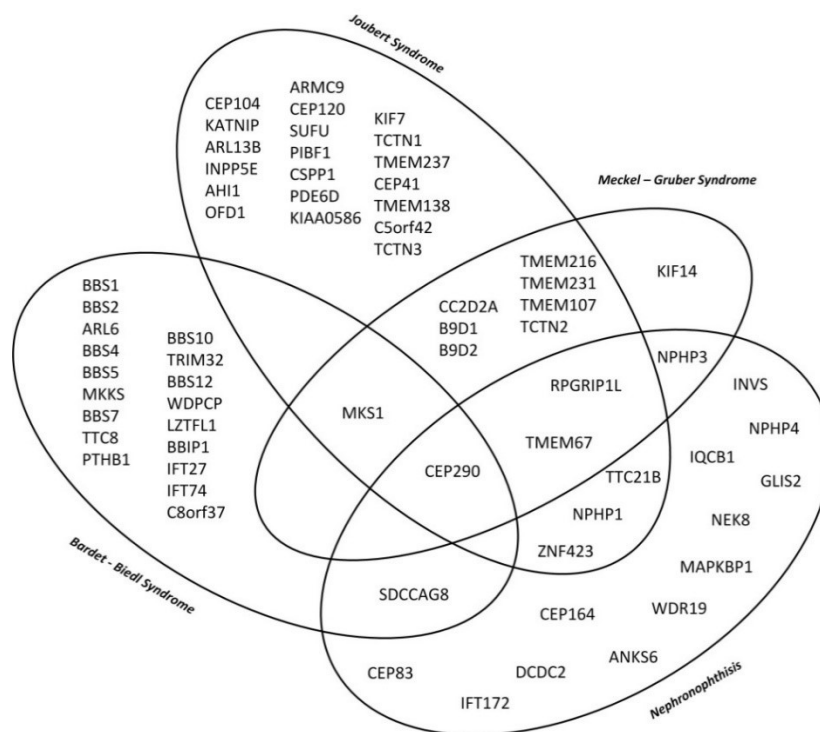
V porovnání s MKS má BBS zanedbatelné procento mortality. U MKS dochází k úmrtí pacienta již ve fetálním období nebo těsně po narození. Příčinou smrti u BBS je pouze selháním ledvin, ke kterému nicméně dochází ne vždy až v pokročilém věku pacienta (Moore *et al.*, 2012). Nad pacienty se ustanovuje bedlivý lékařský dohled, kdy se pravidelně kontrolují změny hmotnosti a krevního tlaku, provádějí se vyšetření očí, ledvin i jater a měření hladiny glukózy, lipidů a endokrinních látek (Sowjanya *et al.*, 2011).

6.3 Nefronofthisis

Toto onemocnění se projevuje ve dvou formách, a to izolované a syndromové. Obě formy jsou dědičné, autozomálně recesivní. Bylo identifikováno celkem 19 genů, jejichž anomálie vedou k NPHP (Halbritter *et al.*, 2013), z toho 4 geny jsou shodné i pro MKS (Barker *et al.*, 2015) Fenotyp této nemoci charakterizuje snížená schopnost fungování vylučovacího systému, chronická tubulointersticiální nefritida, cystická nemoc ledvin, jež vede až k fatálnímu onemocnění ledvin (End-stage renal disease, ESRD), která vyvrcholí před 30 rokem života. Jednoznačné určení NPHP u pacienta lze provést nejdříve po 3. roku dítěte, do té doby se nemoc projevuje nejednoznačnými symptomy (Hildebrandt *et al.*, 2009).

Klinicky lze nemoc rozdělit na tři skupiny podle věku pacienta, kdy se projeví. Během kojeneckého období do prvního věku dítěte je nápadná malformace vylučovací soustavy. V tomto období se také zakládají první podněty vedoucí k ESRD. Nicméně již v prenatálním stádiu může docházet k oligohydramnionu. Nejčastěji se syndrom projeví v období dítěte. Projevuje se zejména nadměrnou žízní (polydipsií) doprovázenou častým močením (polyurií), opožděným růstem, nedostatkem železa v krvi a několika různými poruchami vedoucími k chronické nemoci ledvin. ESRD kulminuje do 13 roku věku. Posledním klinickým typem je adolescentní a dospělé období vývoje. Projevy bývají zpravidla obdobné jako u dětí. U pacientů této skupiny dochází k hlavní manifestaci ESRD kolem 19 let (Olbrich *et al.*, 2003).

Ze všech typů NPHP se MKS nejvíce podobá NPHP3, kde kromě překryvů v klinických příznacích je také potvrzeno pár případů, kdy došlo k úmrtí v prenatálním období (Bergmann *et al.*, 2008).



Obr. 7 Vennův diagram. Přehledné zobrazení překryvu genů mezi diskutovanými ciliopatiemi. Jasně znázornění největšího genového překryvu MKS a JBS. Dále lze pozorovat, že mutace v genu CEP290 je společná všem čtyřem ciliopatiím. Převzato z Neocyst Network for Early Onset Cystic Kidney Disease

7 Zvířecí modely

Nejvýznamnějšími modely pro studování mutantních genů způsobující Meckel-Gruberův syndrom jsou modely myši, které byly připraveny se zasaženými geny MKS1, TMEM67, CEP290, RPGRIP1L, CC2D2A, NPHP3, TCTN2, B9D1 a B9D2, tedy geny asociované s MKS typem 1 až 10. Projevy velmi dobře simulovaly projevy v lidské populaci (Smith *et al.*, 2006; Logan *et al.*, 2011; Shaheen *et al.*, 2011; Norris & Grimes, 2012).

Nejvíce užívaným modelem pro sledování fenotypu mutantního TMEM67 (MKS3) je modifikovaný potkan Wpk (Wistar polycystic kidney). K dalším modelům využívaných pro MKS3 patří háďátko obecné (*Caenorhabditis elegans*), mutantní jednobuněčný organismus z rodu trepky (*Paramecium tetraurelia*) a BPCCK myši (Bilaterl polycystic kidney) (Williams *et al.*, 2011). Wpk potkan byl původně vytvořen pro sledování polycystické nemoci ledvin, vykazoval ovšem také jiné malformace, jako závažný hydrocephalus (vodnatění mozku) a další poruchy vývoje centrální nervové soustavy (Gauttone *et al.*, 2004) Bpcck myši modely reflektují lidské patologie v mnoha typech tkání, a kromě příznaků typických pro MKS u nich můžou být pozorovány i příznaky dalších ciliopatií jako je defekt neurální trubice, poškození vnitřního ucha nebo degradace rohovky (Leightner *et al.*, 2013). Mutace genu TMEM67 byla odhalena i u ovcí a byla pozorována u dvou jedinců z odlišných stád na Novém Zélandu. Všechny projevy se shodovaly s lidskými, a proto byly tyto malformace přiřazeny k Meckel-Gruberovu syndromu (Stayner *et al.*, 2017).

Transmembránový protein exprimovaný genem TMEM67, nese označení meckelin. Lidský a potkaní (wpk) meckelin je identický z 84 % a podobný z 94 %. Wpk potkan je tedy vhodným modelem pro zkoumání speciálně této mutace (Smith *et al.*, 2006).

Zvláštním případem je gen TMEM216 způsobující patologii typu 2, MKS2. Pro tuto mutaci v současné době neexistuje přímý model, který by vykazoval fenotyp alespoň podobný

lidské patologii. Studie pro mutace v genu *TMEM216* byly provedeny na modelech Dania pruhovaného (*Zebrafish*), kde vznikly defekty během gastrulace, které se překrývají s projevy typických ciliopatií (Valente *et al.*, 2010). Na myším modelu byl gen zmapován v jiné oblasti genomu než u lidí, a to na chromozom 19. U lidí je *TMEM216* lokalizován na chromozomu 11. Tyto chromozomy sdílí homologickou syntenzi (Lee *et al.* 2012).

Gen *TMEM231* přiřazený k dalšímu typu syndromu, *MKS11*, byl zkoumán pouze klinicky, není pro něj zvířecí model (Shaheen *et al.*, 2013). Gen *KIF14*, jehož mutace vede k typu 12, *MKS12*, také nemá vytvořen zvířecí model. Byla pozorována spontánní mutace v tomto genu u myši, na základě čehož byl vytvořen model s knockoutovaným genem *KIF14* který potvrdil mutaci. Fenotyp myši ale přímo neodrážel lidský projev *MKS* (Filges *et al.*, 2014). Pro gen *TMEM107* způsobující zatím poslední typ *MKS13* nebyly vytvořeny modely přímo, byla ale odhalena mutace v tomto genu ve dvou myších modelech. Modely vznikly nezávisle na sledování *MKS13* a myši exprimovaly fenotypem typickým pro ciliopatie (Shaheen *et al.*, 2015).

8 Závěr

Meckel-Gruberův syndrom, někdy také Meckelův syndrom, zkráceně *MKS*, je vzácné autozomálně recesivní dědičné onemocnění, které na základě svého vzniku je řazeno mezi skupinu onemocnění zvané ciliopatie. Tato onemocnění jsou způsobena degradací buněčné organely primární řasinky. Ciliopatie se prezentují kolekcí vývojových poruch, které svou klinickou manifestací přesahují mezi jednotlivými syndromy a onemocněními, které do této skupiny patří.

Primární řasinky jsou nepohyblivé a hrají významnou roli při embryogenezi, plní funkci signální organely. Jejich funkce se specializuje v závislosti na tkáni, ve které se nacházejí. Signál přijímají jako chemoreceptory, mechanoreceptory a fotoreceptory. Existují také pohyblivé řasinky, které na rozdíl od nepohyblivých se uplatňují i po embryonálním vývoji a svoji funkci si zachovávají do dospělosti, například řasinky v dýchacím traktu.

K degradaci řasinek a důsledkem toho ke špatnému vývoji embrya dochází mutací některého z genů, jež kódují proteiny, které jsou lokalizovány v řasinkách nebo se podílejí na formování řasinek. Pro Meckel-Gruberův syndrom bylo definováno 13 těchto genů a další nejméně tři geny nesou přívrstev *MKS* podobné geny. Na základě 13 známých genů klasifikujeme *MKS* na 13 typů. Přestože každý typ má svůj gen, vzestupné číselné označení dostávaly typy *MKS* podle odhalování lokusů, ve kterých se mutace nachází. Lokalizace daných proteinů v řasinkách je evolučně konzervovaná. Dokazují to nejen myši modely a model Dania pruhovaného, ale i případ, kdy byl *MKS* popsán u ovcí na Novém Zélandu.

Na základě klinického pozorování i laboratorních studií bylo zjištěno, že k projevu syndromu nedochází pouze v případě, kdy je pacient homozygot pro daný gen, ale také i v okamžiku, kdy se jedná o tzv. složeného heterozygota. Rodiče postiženého jedince jsou tedy nositeli mutace v genu, tyto mutace se nicméně neshodují. Potomek následně vykazuje stejný fenotypový projev, jako kdyby se o stejnou mutaci jednalo. Většina postižených fetů se prokazovala dvěma nefunkčními alelami v daném genu.

Do klasické triády klinických příznaků syndromu patří týlní encefaloce, polycystická nemoc ledvin a polydaktylie na ruce nebo nohy. Každý z těchto projevů má rozdílnou četnost výskytu u různých typů *MKS*. Je to způsobené tím, že každý z genů stojících za vznikem *MKS* se exprimuje s rozdílnou frekvencí v různých typech tkání. Proto se také při

klinickém zkoumání konkrétního typu udává, který ze tří znaků musí pacient vykazovat. Mimo to syndrom doprovází další patologie, jako jsou malformace celé vylučovací soustavy, cysty v duktu jater, nerozlišitelné genitálie nebo defekty obličeje. K jednoznačné diagnostice dochází pomocí ultrazvuku, a to v období mezi 11. a 16. týdnem těhotenství. Klinické projevy se překrývají s ostatními ciliopatiemi, zejména s Joubertovým syndromem, Bardet-Biedlovým syndromem nebo Nefronofthisis. Se jmenovanými syndromy nesdílí pouze klinický projev, nýbrž způsobují je také mutace ve stejných genech. Nejvíce genů MKS sdílí s JBS. MKS nicméně je označován za tu nejzávažnější ciliopatii, neboť dochází ke 100% letalitě buď ještě během prenatálního období, nebo během několika hodin po narození. Ostatní ciliopatie jsou slučitelné se životem.

Meckel-Gruberův syndrom se vyskytuje ve světové populaci ojediněle. Statistika udává, že na každé 10 000 až 140 000 zdravé dítě se narodí jedno s MKS. Největší četnost výskytu je na Předním a Středním východě, kde často dochází k příbuzenským sňatkům a tím dědění mutantních alel. Oproti tomu největší výskyt u pokrevně nepříbuzných rodin je ve Finsku. V roce 2015 vyšla studie, která udává, že se narodí přesně 2,6 postiženého dítěte na 100 000 zdravých.

9 Seznam použité literatury

- Adams, M. (2010) The Primary Cilium: An Orphan Organelle Finds a Home. *Nature Education*, 3, 54
- Adams, M., Simms, R. J., Abdelhamed, Z., Dawe, H. R., Szymanska, K., Logan, C. V., Whewey, G., Pitt, E., Gull, K., Knowles, M. A., Blair, E., Cross, S. H., Sayer, J. A., & Johnson, C. A. (2012). A meckelin-filamin A interaction mediates ciliogenesis. *Human molecular genetics*, 21(6), 1272–1286.
- Akhtar, A., Hassan, S. A., Falah, N. U., Khan, M., & Sheikh, F. N. (2019). Joubert Syndrome: A Rare Radiological Case. *Cureus*, 11(12), e6410.
- Assi M. H. & Al-Imam A., (2019) Dysencephalia Splanchnocystica, AKA Meckel–Gruber syndrome: A Systematic Review and the First Case Report from Iraq. *Modern Applied Science* 13, 149 – 156
- Auber B., Burfeind P., Herold S., Schoner K., Simson G., Rauskolb R. & Rehder H. (2007). A disease causing deletion of 29 base pairs in intron 15 in the MKS1 gene is highly associated with the campomelic variant of the Meckel-Gruber syndrome. *Clinical Genetics* 72(5), 454-459.
- Baala, L., Audollent, S., Martinovic, J., Ozilou, C., Babron, M. C., Sivanandamoorthy, S., Saunier, S., Salomon, R., Gonzales, M., Rattenberry, E., Esculpavit, C., Toutain, A., Moraine, C., Parent, P., Marcorelles, P., Dauge, M. C., Roume, J., Le Merrer, M., Meiner, V., Meir, K., ... Attié-Bitach, T. (2007). Pleiotropic effects of CEP290 (NPHP6) mutations extend to Meckel syndrome. *American journal of human genetics*, 81(1), 170–179.
- Bachmann-Gagescu, R., Dempsey, J. C., Phelps, I. G., O'Roak, B. J., Knutzen, D. M., Rue, T. C., Ishak, G. E., Isabella, C. R., Gorden, N., Adkins, J., Boyle, E. A., de Lacy, N., O'Day, D., Alswaid, A., Ramadevi A, R., Lingappa, L., Lourenço, C., Martorell, L., Garcia-Cazorla, À., Ozyürek, H. & Doherty, D. (2015). Joubert syndrome: a model for untangling recessive disorders with extreme genetic heterogeneity. *Journal of medical genetics*, 52(8), 514–522.

- Bangs F. & Anderson K. V. (2017). Primary Cilia and Mammalian Hedgehog Signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9(5), a028175.
- Barisic, I., Boban, L., Loane, M., Garne, E., Wellesley, D., Calzolari, E., Dolk, H., Addor, M. C., Bergman, J. E., Braz, P., Draper, E. S., Haeusler, M., Khoshnood, B., Klungsoyr, K., Pierini, A., Queisser-Luft, A., Rankin, J., Rissmann, A., & Verellen-Dumoulin, C. (2015). Meckel-Gruber Syndrome: a population-based study on prevalence, prenatal diagnosis, clinical features, and survival in Europe. *European journal of human genetics : EJHG*, 23(6), 746–752.
- Barker, A. R., Thomas, R., & Dawe, H. R. (2014). Meckel-Gruber syndrome and the role of primary cilia in kidney, skeleton, and central nervous system development. *Organogenesis*,
- Beckers A., Ott T., Schuster-Gossler K., Boldt K., Alten L., Ueffing M., Blum M. & Gossler A. (2018) The evolutionary conserved FOXP1 target gene Fam183b is essential for motile cilia in *Xenopus* but dispensable for ciliary function in mice. *Scientific reports* 8
- Bergmann, C., Fliegau, M., Bröchle, N. O., Frank, V., Olbrich, H., Kirschner, J., Schermer, B., Schmedding, I., Kispert, A., Kränzlin, B., Nürnberg, G., Becker, C., Grimm, T., Girschick, G., Lynch, S. A., Kelehan, P., Senderek, J., Neuhaus, T. J., Stallmach, T., Zentgraf, H., ... Omran, H. (2008). Loss of nephrocystin-3 function can cause embryonic lethality, Meckel-Gruber-like syndrome, situs inversus, and renal-hepatic-pancreatic dysplasia. *American journal of human genetics*, 82(4), 959–970.
- Bialas, N. J., Inglis, P. N., Li, C., Robinson, J. F., Parker, J. D., Healey, M. P., Davis, E. E., Inglis, C. D., Toivonen, T., Cottell, D. C., Blacque, O. E., Quarmby, L. M., Katsanis, N., & Leroux, M. R. (2009). Functional interactions between the ciliopathy-associated Meckel syndrome 1 (MKS1) protein and two novel MKS1-related (MKSR) proteins. *Journal of cell science*, 122(Pt 5), 611–624.
- Blacque, O. E. & Sanders, A. A. (2014). Compartments within a compartment: what *C. elegans* can tell us about ciliary subdomain composition, biogenesis, function, and disease. *Organogenesis* 10, 126-137
- Bruel, A. L., Franco, B., Duffourd, Y., Thevenon, J., Jegou, L., Lopez, E., Deleuze, J. F., Doummar, D., Giles, R. H., Johnson, C. A., Huynen, M. A., Chevrier, V., Burglen, L., Morleo, M., Desguerres, I., Pierquin, G., Doray, B., Gilbert-Dussardier, B., Reversade, B., Steichen-Gersdorf, E., ... Thauvin-Robinet, C. (2017). Fifteen years of research on oral-facial-digital syndromes: from 1 to 16 causal genes. *Journal of medical genetics*, 54(6), 371–380.
- Consugar M. B., Kubly V. J., Lager D. J., Hommerding C. J., Wong W. C., Bakker E., Gattone V. H., Torres V. E., Breuning M. H. & Harris P. C. (2007). Molecular diagnostics of Meckel-Gruber syndrome highlights phenotypic differences between MKS1 and MKS3. *Human genetics*, 121(5), 591-599.
- Cook, S. A., Collin, G. B., Bronson, R. T., Naggert, J. K., Liu, D. P., Akeson, E. C., & Davisson, M. T. (2009). A mouse model for Meckel syndrome type 3. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 20(4), 753–764.
- Dawe, H. R., Farr, H. & Gull, K. (2006). Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. *Journal of Cell Science* 120, 7-15.
- Dawe H. R., Smith U. M., Cullinane A. R., Gerrelli D., Cox P., Badano J. L., Blair-Reid S., Sriram N., Katsanis N., Attie-Bitach T., Afford S. C., Copp A. J., Kelly D. A. & Gull K., Johnson C. A. (2007). The Meckel-Gruber Syndrome proteins MKS1 and meckelin

- interact and are required for primary cilium formation. *Human molecular genetics* 15 (2), 173-186.
- Delous, M., Baala, L., Salomon, R., Laclef, C., Vierkotten, J., Tory, K., Golzio, C., Lacoste, T., Besse, L., Ozilou, C. et al. (2007). The ciliary gene RPGRIP1L is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome. *Nature Genetics* 39, 875-81
- Dempsey J. C., Phelps I. G., Bachmann-Gagescu R., Glass I. A., Tully H. M., Doherty D., (2017). Mortality in Joubert syndrome. *Am J Med Genet Part A*. 173A: 1237– 1242.
- den Hollander, A. I., Koenekoop, R. K., Yzer, S., Lopez, I., Arends, M. L., Voeselek, K. E., Zonneveld, M. N., Strom, T. M., Meitinger, T., Brunner, H. G., Hoyng, C. B., van den Born, L. I., Rohrschneider, K., & Cremers, F. P. (2006). Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis. *American journal of human genetics*, 79(3), 556–561.
- Dowdle, W. E., Robinson, J. F., Kneist, A., Sirerol-Piquer, M. S., Frints, S. G., Corbit, K. C., Zaghoul, N. A., van Lijnschoten, G., Mulders, L., Verver, D. E., Zerres, K., Reed, R. R., Attié-Bitach, T., Johnson, C. A., García-Verdugo, J. M., Katsanis, N., Bergmann, C., & Reiter, J. F. (2011). Disruption of a ciliary B9 protein complex causes Meckel syndrome. *American journal of human genetics*, 89(1), 94–110.
- Filges I., Nosova E., Bruder E., Tercanli S., Townsend K., Gibson W. T., Röthlisberger B., Heinemann K., Hall J. G., Gregory-Evans C. Y., Wasserman W. W., Miny P. & Friedman J. M. (2014). Exome sequencing identifies mutations in KIF14 as a novel cause of an autosomal recessive lethal fetal ciliopathy phenotype. *Clinical Genetics* 86(3), 220-228.
- Forsythe, E., & Beales, P. L. (2013). Bardet-Biedl syndrome. *European journal of human genetics : EJHG*, 21(1), 8–13.
- Frank, V., den Hollander, A. I., Bruchle, N. O., Zonneveld, M. N., Nurnberg, G., Becker, C., Du Bois, G., Kendziorra, H., Roosing, S., Senderek, J. et al. (2008). Mutations of the CEP290 gene encoding a centrosomal protein cause Meckel-Gruber syndrome. *Human Mutation* 29, 45-52.
- Fujikura, K., Setsu, T., Tanigaki, K., Abe, T., Kiyonari, H., Terashima, T., & Sakisaka, T. (2013). Kif14 mutation causes severe brain malformation and hypomyelination. *PLoS one*, 8(1), e53490.
- Garcia-Gonzalo, F. R., Corbit, K. C., Sirerol-Piquer, M. S., Ramaswami, G., Otto, E. A., Noriega, T. R., Seol, A. D., Robinson, J. F., Bennett, C. L., Josifova, D. J., García-Verdugo, J. M., Katsanis, N., Hildebrandt, F., & Reiter, J. F. (2011). A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. *Nature genetics*, 43(8), 776–784.
- Gattone V. H., Tourkow B. A., Trambaugh C. M., Yu A. C., Whelan S., Phillips C. L., Harris P. C. & Peterson R. G. (2004). Development of multiorgan pathology in the wpk rat model of polycystic kidney disease. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 277. 384-395
- Gluecklich B. (1976). Johann Friedrich Meckel, the Younger (1781-1833). *The American Journal of Surgery*, 132, 384 – 386.
- Gong S., Ji F., Wang B., Zhang Y., Xu X. & Sun M. (2018). Tectonic Proteins Are Important Players in Non-Motile Ciliopathies. *Cellular Physiology and Biochemistry* 50(1), 398-409

- Halbritter, J., Porath, J. D., Diaz, K. A., Braun, D. A., Kohl, S., Chaki, M., Allen, S. J., Soliman, N. A., Hildebrandt, F., Otto, E. A., & GPN Study Group (2013). Identification of 99 novel mutations in a worldwide cohort of 1,056 patients with a nephronophthisis-related ciliopathy. *Human genetics*, *132*(8), 865–884.
- Hartill Verity, Szymanska Katarzyna, Sharif Saghira Malik, Wheway Gabrielle & Johnson Colin A. (2017). Meckel–Gruber Syndrome: An Update on Diagnosis, Clinical Management, and Research Advances. *Frontiers in Pediatrics* *5*.
- Hildebrandt, F., Attanasio, M., & Otto, E. (2009). Nephronophthisis: disease mechanisms of a ciliopathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, *20*(1), 23–35.
- Hopp, K., Heyer, C. M., Hommerding, C. J., Henke, S. A., Sundsbak, J. L., Patel, S., Patel, P., Consugar, M. B., Czarnecki, P. G., Gliem, T. J., Torres, V. E., Rossetti, S., & Harris, P. C. (2011). B9D1 is revealed as a novel Meckel syndrome (MKS) gene by targeted exon-enriched next-generation sequencing and deletion analysis. *Human molecular genetics*, *20*(13), 2524–2534.
- Huppke, P., Wegener, E., Böhler-Rabel, H., Bolz, H. J., Zoll, B., Gärtner, J., & Bergmann, C. (2015). Tectonic gene mutations in patients with Joubert syndrome. *European journal of human genetics : EJHG*, *23*(5), 616–620.
- Chemke J., Miskin A., Rav-Acha Z., Porath A., Sagiv M. & Katz Z. (1977) Prenatal diagnosis of Meckel syndrome: alpha-feto protein and beta-trace protein in amniotic fluid. *Clinical Genetics* (4), 285-289
- Christopher K. J., Wang B., Kong Y. & Weatherbee S. D. (2012) Forward genetics uncovers Transmembrane protein 107 as a novel factor required for ciliogenesis and Sonic hedgehog signaling. *Developmental Biology*, *368*, 382-39
- Khan S.A., Muhammad N., Khan M. A., Kamal A., Rehman Z. U. & Khan S. (2016) Genetics of human Bardet-Biedl syndrome, an updates. *Clinical Genetics*. *90*(1):3-15
- Khanna, H., Davis, E. E., Murga-Zamalloa, C. A., Estrada-Cuzcano, A., Lopez, I., den Hollander, A. I., Zonneveld, M. N., Othman, M. I., Waseem, N., Chakarova, C. F., Maubaret, C., Diaz-Font, A., MacDonald, I., Muzny, D. M., Wheeler, D. A., Morgan, M., Lewis, L. R., Logan, C. V., Tan, P. L., Beer, M. A., ... Katsanis, N. (2009). A common allele in RPGRIP1L is a modifier of retinal degeneration in ciliopathies. *Nature genetics*, *41*(6), 739–745.
- Kikuchi, A., Yamamoto, H. & Sato, A. (2009). Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways. *Trends in Cell Biology* *19*, 119-129.
- Kyttälä M., Tallila J., Salonen R., Kopra O., Kohlschmidt N., Paavola-Sakki P., Peltonen L. & Kestilä M. (2006). MKS1, encoding a component of the flagellar apparatus basal body proteome, is mutated in Meckel syndrome. *Nature Genetics* *38* (2), 155-157.
- Lambacher, N. J., Bruel, A. L., van Dam, T. J., Szymańska, K., Slaats, G. G., Kuhns, S., McManus, G. J., Kennedy, J. E., Gaff, K., Wu, K. M., van der Lee, R., Burglen, L., Doummar, D., Rivière, J. B., Faivre, L., Attié-Bitach, T., Saunier, S., Curd, A., Peckham, M., Giles, R. H., ... Blacque, O. E. (2016). TMEM107 recruits ciliopathy proteins to subdomains of the ciliary transition zone and causes Joubert syndrome. *Nature cell biology*, *18*(1), 122–131.
- Lee, J. H., Silhavy, J. L., Lee, J. E., Al-Gazali, L., Thomas, S., Davis, E. E., Bielas, S. L., Hill, K. J., Iannicelli, M., Brancati, F. et al. (2012). Evolutionarily assembled cis-regulatory module at a human ciliopathy locus. *Science* *335*, 966-969.

- Leightner, A. C., Hommerding, C. J., Peng, Y., Salisbury, J. L., Gainullin, V. G., Czarnecki, P. G., Sussman, C. R., & Harris, P. C. (2013). The Meckel syndrome protein meckelin (TMEM67) is a key regulator of cilia function but is not required for tissue planar polarity. *Human molecular genetics*, 22(10), 2024–2040.
- Lewis, W. R., Bales, K. L., Revell, D. Z., Croyle, M. J., Engle, S. E., Song, C. J., Malarkey, E. B., Uytingco, C. R., Shan, D., Antonellis, P. J., Nagy, T. R., Kesterson, R. A., Mrug, M. M., Martens, J. R., Barbari, N. F., Gross, A. K., & Yoder, B. K. (2019). Mks6 mutations reveal tissue- and cell type-specific roles for the cilia transition zone. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(1), 1440–1455.
- Logan C. V., Abdel-Hamed Z. & Johnson C. A. (2011). Molecular genetics and pathogenic mechanisms for the severe ciliopathies: insights into neurodevelopment and pathogenesis of neural tube defects. *Molecular neurobiology* 43(1),12-26
- McIntosh K. (2015) The extra ciliary roles of Meckel-Gruber syndrome proteins. *Unpublished manuscript, University of Exeter*
- Moore, S. J., Green, J. S., Fan, Y., Bhogal, A. K., Dicks, E., Fernandez, B. A., Stefanelli, M., Murphy, C., Cramer, B. C., Dean, J. C., Beales, P. L., Katsanis, N., Bassett, A. S., Davidson, W. S., & Parfrey, P. S. (2005). Clinical and genetic epidemiology of Bardet-Biedl syndrome in Newfoundland: a 22-year prospective, population-based, cohort study. *American journal of medical genetics. Part A*, 132A(4), 352–360.
- Mougou-Zerelli, S., Thomas, S., Szenker, E., Audollent, S., Elkhartoufi, N., Babarit, C., Romano, S., Salomon, R., Amiel, J., Esculpavit, C., Gonzales, M., Escudier, E., Leheup, B., Loget, P., Odent, S., Roume, J., Gérard, M., Delezoide, A. L., Khung, S., Patrier, S., ... Attié-Bitach, T. (2009). CC2D2A mutations in Meckel and Joubert syndromes indicate a genotype-phenotype correlation. *Human mutation*, 30(11), 1574–1582.
- Norris, D. P., & Grimes, D. T. (2012). Mouse models of ciliopathies: the state of the art. *Disease models & mechanisms*, 5(3), 299–312.
- Nozawa, Y. I., Lin, C., & Chuang, P. T. (2013). Hedgehog signaling from the primary cilium to the nucleus: an emerging picture of ciliary localization, trafficking and transduction. *Current opinion in genetics & development*, 23(4), 429–437.
- Olbrich, H., Fliegauf, M., Hoefele, J., Kispert, A., Otto, E., Volz, A., Wolf, M. T., Sasmaz, G., Trauer, U., Reinhardt R et al. (2003). Mutations in a novel gene, NPHP3, cause adolescent nephronophthisis, tapeto-retinal degeneration and hepatic fibrosis. *Nature Genetics* 34, 455-459.
- Ozturk P., Asena M., Katar S., Ozturk U. (2019): Meckel-Gruber Syndrome: A Case Who Lived for 5 Months. *Pediatr Neurosurg* 54 :277-280
- Parelkar, S. V., Kapadnis, S. P., Sanghvi, B. V., Joshi, P. B., Mundada, D., & Oak, S. N. (2013). Meckel-Gruber syndrome: A rare and lethal anomaly with review of literature. *Journal of pediatric neurosciences*, 8(2), 154–157.
- Park, T. J., Haigo, S. L. and Wallingford, J. B. (2006). Ciliogenesis defects in embryos lacking inturned or fuzzy function are associated with failure of planar cell polarity and Hedgehog signaling. *Nature Genetics* 38, 303-311
- Radhakrishnan P., Nayak S. S., Shukla A., Lindstrand A. & Girisha K. M. (2019). Meckel syndrome: Clinical and mutation profile in six fetuses. *Clinical genetics*, 96(6),560-565
- Reiber H., Walther K. & Althaus H. (2003) Beta-trace protein as sensitive marker for CSF rhinorhea and CSF otorhea. *Acta Neurologica Scandinavica* 108(5), 359-362

- Roberson, E. C., Dowdle, W. E., Ozanturk, A., Garcia-Gonzalo, F. R., Li, C., Halbritter, J., Elkhartoufi, N., Porath, J. D., Cope, H., Ashley-Koch, A., Gregory, S., Thomas, S., Sayer, J. A., Saunier, S., Otto, E. A., Katsanis, N., Davis, E. E., Attié-Bitach, T., Hildebrandt, F., Leroux, M. R., ... Reiter, J. F. (2015). TMEM231, mutated in orofacioidigital and Meckel syndromes, organizes the ciliary transition zone. *The Journal of cell biology*, 209(1), 129–142.
- Roepman R., Bernoud-Hubac N., Schick D. E., Maugeri A., Berger W., Ropers H.H., Cremers F. P. & Ferreira P. A. (2000). The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) interacts with novel transport-like proteins in the outer segments of rod photoreceptors. *Human molecular genetics* 1, 2095-2105.
- Roepman, R., Letteboer, S. J., Arts, H. H., van Beersum, S. E., Lu, X., Krieger, E., Ferreira, P. A., & Cremers, F. P. (2005). Interaction of nephrocystin-4 and RPGRIP1 is disrupted by nephronophthisis or Leber congenital amaurosis-associated mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(51), 18520–18525.
- Romani, M., Micalizzi, A., & Valente, E. M. (2013). Joubert syndrome: congenital cerebellar ataxia with the molar tooth. *The Lancet. Neurology*, 12(9), 894–905.
- Romani, M., Micalizzi, A., Kraoua, I., Dotti, M. T., Cavallin, M., Sztriha, L., Ruta, R., Mancini, F., Mazza, T., Castellana, S., Hanene, B., Carluccio, M. A., Darra, F., Máté, A., Zimmermann, A., Gouider-Khouja, N., & Valente, E. M. (2014). Mutations in B9D1 and MKS1 cause mild Joubert syndrome: expanding the genetic overlap with the lethal ciliopathy Meckel syndrome. *Orphanet journal of rare diseases*, 9, 72.
- Roume, J., Genin, E., Cormier-Daire, V., Ma, H. W., Mehaye, B., Attie, T., Razavi-Encha, F., Fallet-Bianco, C., Buenerd, A., Clerget-Darpoux, F., Munnich, A., & Le Merrer, M. (1998). A gene for Meckel syndrome maps to chromosome 11q13. *American journal of human genetics*, 63(4), 1095–1101.
- Shaheen, R., Faqeih, E., Seidahmed, M. Z., Sunker, A., Alali, F. E., Al Qahtani, K. and Alkuraya, F. S. (2011). A TCTN2 mutation defines a novel Meckel Gruber syndrome locus. *Human Mutation* 32, 573-578
- Shaheen, R., Ansari, S., Mardawi, E. A., Alshammari, M. J., & Alkuraya, F. S. (2013). Mutations in TMEM231 cause Meckel-Gruber syndrome. *Journal of medical genetics*, 50(3), 160–162.
- Shaheen R., Almoisheer A., Faqeih E., Babay Z., Monies D., Tassan N., Abouelhoda M., Kurdi W., Al Mardawi E., Khalil M. M. I., Seidahmed M. Z., Alnemer M., Alsahan N., et al. (2015) Identification of a novel MKS locus defined by TMEM107 mutation, *Human Molecular Genetics* 24, 5211–5218.
- Shaheen, R., Szymanska, K., Basu, B., Patel, N., Ewida, N., Faqeih, E., Al Hashem, A., Derar, N., Alsharif, H., Aldahmesh, M. A., Alazami, A. M., Hashem, M., Ibrahim, N., Abdulwahab, F. M., Sonbul, R., Alkuraya, H., Alnemer, M., Al Tala, S., Al-Husain, M., Morsy, H., ... Alkuraya, F. S. (2016). Characterizing the morbid genome of ciliopathies. *Genome biology*, 17(1), 242.
- Schueler, M., Braun, D. A., Chandrasekar, G., Gee, H. Y., Klasson, T. D., Halbritter, J., Bieder, A., Porath, J. D., Airik, R., Zhou, W., LoTurco, J. J., Che, A., Otto, E. A., Böckenhauer, D., Sebire, N. J., Honzik, T., Harris, P. C., Koon, S. J., Gunay-Aygun, M., Saunier, S., ... Hildebrandt, F. (2015). DCDC2 mutations cause a renal-hepatic ciliopathy by disrupting Wnt signaling. *American journal of human genetics*, 96(1), 81–92.

- Smith, U. M., Consugar, M., Tee, L. J., McKee, B. M., Maina, E. N., Whelan, S., Morgan, N. V., Goranson, E., Gissen, P. & Lilliquist, S. (2006). The transmembrane protein meckelin (MKS3) is mutated in Meckel-Gruber syndrome and the wpk rat. *Nature Genetics* 38, 191-196.
- Sowjanya, B., Sreenivasulu, U., Naidu, J. N., & Sivaranjani, N. (2011). End stage renal disease, differential diagnosis, a rare genetic disorder: Bardet-Biedl syndrome: case report and review. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, 26(2), 214–216.
- Sreekumar V. & Norris D. P. (2019). Cilia and development. *Current Opinion in Genetics & Development* 56, 15-21
- Stayner, C., Poole, C.A., McGlashan, S.R., PIlanthanonon1 M., Brauning R., Markie D., Lett B., Slobbe L., Chae A., Johnstone A. C., Jensen C. G., McEwan J. C. et al. (2017) An ovine hepatorenal fibrocystic model of a Meckel-like syndrome associated with dysmorphic primary cilia and TMEM67 mutations. *Sci Rep* 7, 1601
- Tallila, J., Jakkula, E., Peltonen, L., Salonen, R., & Kestilä, M. (2008). Identification of CC2D2A as a Meckel syndrome gene adds an important piece to the ciliopathy puzzle. *American journal of human genetics*, 82(6), 1361–1367.
- Tammachote, R., Hommerding, C. J., Sinderson, R. M., Miller, C. A., Czarnecki, P. G., Leightner, A. C., Salisbury, J. L., Ward, C. J., Torres, V. E., Gattone, V. H., 2nd, & Harris, P. C. (2009). Ciliary and centrosomal defects associated with mutation and depletion of the Meckel syndrome genes MKS1 and MKS3. *Human molecular genetics*, 18(17), 3311–3323.
- Torres V. E. & Harris P.C. (2006). Mechanisms of Disease: autosomal dominant and recessive polycystic kidney diseases. *Clinical Nature Practice Nephrology* 2, 40-55.
- Valente, E. M., Logan, C. V., Mougou-Zerelli, S., Lee, J. H., Silhavy, J. L., Brancati, F., Iannicelli, M., Travaglini, L., Romani, S., Illi, B., Adams, M., Szymanska, K., Mazzotta, A., Lee, J. E., Tolentino, J. C., Swistun, D., Salpietro, C. D., Fede, C., Gabriel, S., Russ, C., ... Gleeson, J. G. (2010). Mutations in TMEM216 perturb ciliogenesis and cause Joubert, Meckel and related syndromes. *Nature genetics*, 42(7), 619–625.
- Waters, A. M., & Beales, P. L. (2011). Ciliopathies: an expanding disease spectrum. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 26(7), 1039–1056.
- Watson C. M., Dean P., Camm N., Bates J., Carr I. M., Gardiner C. A. & Bonthron D.T. (2019) Long-read nanopore sequencing resolves a TMEM231 gene conversion event causing Meckel-Gruber syndrome. *Human Mutation*
- Weng, R. R., Yang, T. T., Huang, C. E., Chang, C. W., Wang, W. J., & Liao, J. C. (2018). Super-Resolution Imaging Reveals TCTN2 Depletion-Induced IFT88 Lumen Leakage and Ciliary Weakening. *Biophysical journal*, 115(2), 263–275.
- Wheway, G., Nazlamova, L., & Hancock, J. T. (2018). Signaling through the Primary Cilium. *Frontiers in cell and developmental biology*, 6, 8
- Wheway G., Lord J. & Baralle D. (2019) Splicing in the pathogenesis, diagnosis and treatment of ciliopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*
- . Williams, C. L., Li, C., Kida, K., Inglis, P. N., Mohan, S., Semenc, L., Bialas, N. J., Stupay, R. M., Chen, N., Blacque, O. E. et al. (2011). MKS and NPHP modules cooperate to establish basal body/transition zone membrane associations and ciliary gate function during ciliogenesis. *Journal of Cell Biology* 192, 1023-1041.