

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:
Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor:
Molekulární biologie a biochemie organismů



Lenka Kašíková

Turnerův syndrom a jeho souvislost s inaktivací chromozómu X

Turner syndrome and its relation with X chromosome inactivation

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Michaela Schierová, Ph.D.

Praha, 2013

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, 10.05.2013

.....
Lenka Kašíková

Poděkování:

Děkuji RNDr. Michaele Schierové, Ph.D. za trpělivé vedení při zpracování této práce a za příležitost tuto práci napsat.

Dále děkuji Ing. Petru Jansovi, CSs. za konzultace v oblasti problematiky inaktivace chromozómu X. Za jazykové korektury celé práce děkuji Bc. Jakubovi Červenkov. Za pomoc při zpracování obrázkových příloh děkuji svému příteli Ing. Janu Quiserovi. Rodině pak za podporu a pochopení po celou dobu psaní této práce.

Abstrakt

Turnerův syndrom (TS) je genetické onemocnění žen s celosvětovou frekvencí výskytu 1:2 000. Jeho příčinou nemusí být pouze monozómie chromozómu X (45,X), nýbrž i mozaikový karyotyp (45,X/46,XX; 45,X/46,XY; 45,X/47,XXX), izochromozóm X (46,X,i(Xq)), ring chromozóm X (45,X/46,X,r(X)) nebo další strukturní aberace chromozómu X (delece a translokace). U pacientek s TS (s výjimkou pacientek s ring chromozómem) není diagnostikována mentální retardace. TS úzce souvisí s regulací exprese genové dávky, především s procesem inaktivace chromozómu X. Geny unikající procesu inaktivace chromozómu X, jsou u ženy karyotypu 45,X exprimovány v nesprávné, poloviční dávce ve srovnání se zdravou ženou. Příkladem takového genu je *SHOX*, na který jsem se soustředila ve své bakalářské práci. Haploinsuficience genu *SHOX* způsobuje majoritní fenotypový projev TS, kterým je malá postava a kostní abnormality. Výzkum dalších genů, odpovědných za TS, komplikuje skutečnost, že neexistuje vhodný modelový organizmus, na kterém by bylo možné TS studovat a výsledky extrapolovat na člověka. U myších samic se liší nejen samotný proces inaktivace chromozómu X, ale i fenotypové projevy s karyotypem 39,X jsou daleko mírnější než u žen s karyotypem 45,X, což lze vysvětlit skutečností, že u myši uniká procesu inaktivace chromozómu X pouze okolo 3 % genů, zatímco u člověka 15 % genů.

Klíčová slova: Turnerův syndrom, karyotyp Turnerova syndromu, inaktivace chromozómu X, geny unikající procesu inaktivace chromozómu X, gen *SHOX*

Abstract

Turner syndrome (TS) is a genetic anomaly occurring in women with worldwide frequency 1:2,000. Turner syndrome's possible causes include X chromosome monosomy, mosaic karyotype (45,X/46,XX; 45,X/46,XY; 45,X/47,XXX), X isochromosome (46,X,i(Xq)), ring X chromosome (45,X/46,X,r(X)), and other X chromosome aberrations (deletion and translocation). Patients with Turner syndrome (with the exception of ring chromosome abnormalities) aren't diagnosed with mental retardation. Turner syndrome is closely related to the regulation of gene expression level, particularly with X chromosome inactivation. Genes escaping the X chromosome inactivation process in 45,X women are expressed in half the dose of a healthy woman. An example of such a gene is *SHOX*, which I decided to focus on in this thesis. *SHOX* gene haploinsufficiency causes major Turner syndrome phenotype manifesting of short body and bone abnormalities. The research of other genes with possible roles in Turner syndrome is complicated by the absence of adequate model organism, which could be used for TS study with possibility to extrapolate the results to humans. In mice, both the inactivation process itself is different and the phenotypic manifestation of X monosomy (39, X) is also much milder than in 45,X women. This difference could be explained by the fact that in mice only about 3 % of genes escape inactivation, while in humans 15 % of genes escape.

Key words: Turner syndrome, Turner syndrome karyotype, X chromosome inactivation, genes escaping the X chromosome inactivation process, *SHOX* gene

Seznam zkratek

| | | |
|--|---|--|
| 5'- TAAT(N)_nATTA- 3' | palyndromic sequence 5'- TAAT(N) _n ATTA-3' - DNA binding motif for homeodomain of SHOX | palindromatická sekvence 5'- TAAT(N) _n ATTA-3' - DNA vazebný motiv, ke kterému se váže homeodoména proteinu SHOX |
| AER | apical ectodermal ridge | apikální ektodermální hřeben |
| AGC1 | aggrecan gene | gen kódující aggrecan |
| AK | amino acid | aminokyselina |
| AKCRK | nuclear localization sequence alanine - lysine-cystein-arginine-lysine | jaderná lokalizační sekvence - alanin- lysin-cystein-arginin-lysin |
| AMOT | angiomin gene | gen pro angiomin |
| AUG | start codon | iniciační kodon |
| BLAST | basic local alignment search tool | algoritmus pro porovnání podobnosti sekvencí dvou nebo více nukleových kyselin anebo proteinů |
| BNP | brain natriuretic peptide | mozkový natriuretický peptid |
| Car5b | carbonic anhydrase 5b gene | gen kódující karbonát anhydrázu 5b |
| cDNA | complementary DNA | DNA komplementární k mRNA |
| CKII | casein kinase 1 | kasein kináza 1 |
| C-MYC | v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog | homolog virového myelocytomatózního onkogenu v-myc |
| CNE | conserved non-coding elements | konzervovaný nekódující elementy |
| CNS | central nervous system | centrální nervový systém |
| COL2A1 | collagen type II gene | gen kódující kolagen typu II |
| CpG | cytosine-phosphate-guanosine | cytosin-fosfát-guanosin |
| CTCF | CCCTC binding factor | CCCTC vazebný faktor |
| Ddx3x | ATP-dependent RNA helicase DDX3X, X-linked gene | X-vázaný gen kódující ATP dependentní RNA helikázu |
| DNMT3a | de novo DNA (cytosine-5)- methyltransferase 3A | de novo DNA -(cytosin-5) metyltransferáza 3A |
| DXPas34 | <i>DXPas34</i> | <i>DXPas34</i> enhancer genu <i>Tsix</i> |
| Ezh2 | histone-lysine N-methyltransferase | histon-lysin N-metyltransferáza |
| faf | fat facets gene | drozofilý gen důležitý pro vývoj oka a embryonální vývoj |
| FGF | fibroblast growth factor | fibroblastový růstový faktor |
| FGFR3 | fibroblast growth factor receptor gene | gen kódující receptor pro fibroblastový růstový faktor |
| FSH | follicle-stimulating hormone | folikul-stimulující hormon |
| Ftx(FTX) | gene encodes lncRNA, its name comes from five prime to Xist gene | gen kódující lncRNA, jejíž jméno pochází z anglického five prime to Xist gene |
| H3K27me3 | histone H3 trimethyl lysine 27 | trimetylovaný histon H3 na lysinu 27 |

| | | |
|----------------------|---|---|
| H3K4me2 | histone H3 dimethyl lysine 4 | dimetylovaný histon H3 na lysinu 4 |
| H3K4me3 | histone H3 trimethyl lysine 4 | trimetylovaný histon H3 na lysinu 4 |
| H3K36me3 | histone H3 trimethyl lysine 36 | trimetylovaný histon H3 na lysinu 36 |
| HOXA9 | homeobox A9 | homeobox A9 |
| HTR2C | 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C gene | gen kódující receptor 2C pro 5-hydroxytryptamin (serotonin) |
| ICM | inner cell mass | vnitřní buněčná masa |
| Jpx(JPX) | just proximal to <i>Xist</i> gene | gen lokalizovaný proximálně od <i>Xist</i> |
| kb | kilobase | 1 tisíc párů basí |
| KLF4 | Krüppel-like factor 4 | faktor 4 podobný proteinu Krüppel |
| LCR | locus control regions | místo kontrolní oblasti |
| LH | luteinizing hormone | luteinizační hormon |
| LINE | long interspersed elements | dlouhé roztroušené elementy |
| lncRNA | long non-coding RNA | dlouhá (protein) nekódující RNA |
| LWS | Léri - Weill syndrome | Léri - Weillův syndrom |
| Mb | millions of <i>base pairs</i> | milión párů basí |
| Mid1 | gene encodes protein involved in the formation of multiprotein structures acting as anchor points to microtubules | gen kódující protein, zapojený ve fomování multipodjednotkové struktury působící jako kotva pro mikrotubuly |
| miRNA | microRNA | mikroRNA |
| mRNA | messenger RNA | informační RNA |
| NANOG | pluripotency factor's name comes from Tir Na Nog - mythologic Celtic land | název pluripotentního faktoru pochází z keltské mytologie - Tir Na Nog |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information | Národní centrum pro biotechnologické informace v USA |
| NLS | nuclear localization sequence | jaderná lokalizační sekvence |
| NPPB | natriuretic peptide B gene | gen kódující natriuretický peptid B |
| NPRs | Natriuretic peptide receptor | receptor pro natriuretický peptid |
| nt | nucleotide | nukleotid |
| OCT4 | octamer-binding transcription factor 4 | transkripční faktor 4 vážící se k oktamerovému DNA motivu |
| Og12x (Shox2) | short stature homeobox 2 | gen obsahující homeobox 2 související s malou postavou |
| P1 | main promotor of gene <i>SHOX</i> | hlavní promotor genu <i>SHOX</i> |
| P2 | alternative promotor of gene <i>SHOX</i> | alternativní promotor genu <i>SHOX</i> |
| PAR1 | pseudoautosomal region 1 | pseudoatozomální oblast 1 |
| PHOG | pseudoautosomal homeobox-containing osteogenic gene | pseudoautozomalní homeobox obsahující osteogenní gen |
| PRC2 | Polycomb repressive complex 2 | represivní komplex 2 Polycomb |
| Rep-A | repeat adenosin | repetice bohatá na adenosin |
| REX1 | RNA exonuclease 1 | RNA exonukleáza 1 |
| RNA-Seq | RNA sequencing | RNA sekvenování |

| | | |
|---------------------------|---|---|
| RNF12 | ring finger protein 12 | prstencový prstový protein 12 |
| RPS4X | ribosomal protein S4, X-linked gene | gen kódující X-vázany ribozomální protein S4 |
| RPS4Y | ribosomal protein S4, Y-linked gene | gen kódující Y-vázany ribozomální protein S4 |
| Rsx | RNA on the silent X | RNA umlčující chromozóm X u vačnatců |
| S106 | serin in position 106 | serin v pozici 106 |
| SEDE | serin in position 106 is part of motive - serine, glutamic acid, aspartic acid, glutamic acid | serin v pozici 106 je součástí motivu - serin , kyselina glutamová, kyselina asparagová, kyselina glutamová |
| SHH | sonic hedgehog | sonic hedgehog |
| SHOT | <i>SHOX</i> homologous gene on chromosome three | homologní gen ke <i>SHOX</i> na chromozómu 3 |
| SHOX | short stature homeobox gene | gen obsahující homeobox související s malou postavou |
| SHOX2 | short stature homeobox 2 | gen obsahující homeobox 2 související s malou postavou |
| Shroom4 (SHROOM 4) | Shroom family member 4 gene | gen kódující 4 člen rodiny Shroom |
| SOX2 | SRY-box 2 protein | protein SRY -box 2 |
| SOX5 | SRY -box 5 protein | protein SRY -box 5 |
| SOX6 | SRY-box 6 protein | protein SRY -box 6 |
| SOX9 | SRY-box 9 protein | protein SRY -box 9 |
| SRY | sex-determining region Y | sex-determinující faktor Y (gen určující samčí pohlaví) |
| TGA | stop codone | stop kodon |
| TS | Turner syndrome | Turnerův syndrom |
| Tsix (TSIX) | X (inactive)-specific transcript, antisense | antisence transkript specifický pro inaktivní X |
| U2OS | human osteosarcoma cell line | lidská kostní nádorová buněčná linie |
| UBA1 (AIS9T) | ubiquitin-like modifier activating enzyme 1 gene | gen kódující enzym podobný ubiquitin modifikujícímu aktivačnímu enzymu 1 |
| URL | uniform resource locator | jednoznačné určení zdroje |
| USP9X (DFFRX) | ubiquitin specific peptidase 9, X-linked gene | gen kódující X-vázanou ubiquitin specifickou peptidázu 9 |
| USP9Y (DFFRY) | ubiquitin specific peptidase 9, Y-linked gene | gen kódující Y-vázanou ubiquitin specifickou peptidázu 9 |
| UTR | untranslated region | nepřekládaná oblast |
| VII-1 | splice variant 1 containing VII exon | sestříhová varianta 1 obsahující exon VII |
| VII-2 | splice variant 2 containing VII exon | sestříhová varianta 2 obsahující exon VII |
| VII-3 | splice variant 3 containing VII exon | sestříhová varianta 3 obsahující exon VII |

| | | |
|---------------------------|---|---|
| <i>XACT</i> | X active coating transcript | VII transkript obalující aktivní X |
| <i>Xa</i> | active X chromosome | aktivní chromozóm X |
| <i>XCI</i> | X-chromosome inactivation | inaktivace chromozómu X |
| <i>Xi</i> | inactive X chromosome | inaktivní chromozóm X |
| <i>XIC</i> | X-inactivation center | X inaktivační centrum |
| <i>Xist (XIST)</i> | X inactivation specific transcript | transkript specifický pro inaktivaci X |
| <i>Xite</i> | X-inactivation intergenic transcription element | X-inaktivační intergenní transkripční element |
| <i>Xm</i> | maternal X chromosome | maternální chromozóm X (zdeděný od matky) |
| <i>Xp</i> | paternal X chromosome | paternální chromozóm X (zdeděný od otce) |
| <i>Xp</i> | short arm X chromosome | krátké raménko lidského chromozómu X |
| <i>Xq</i> | long arm X chromosome | dlouhé raménko lidského chromozómu X |
| <i>YY1</i> | Yin-Yang 1 | Yin-Yang 1 |
| <i>ZFX</i> | zinc finger protein, X-linked gene | gen kódující X-vazány protein s motivem zinkového prstu |
| <i>ZFY</i> | zinc finger protein, Y-linked gene | gen kódující Y-vazány protein s motivem zinkového prstu |
| <i>ZPA</i> | zone of polarizing activity | zóna polarizující aktivity |

Obsah

| | |
|--|-----------|
| 1. Úvod..... | 1 |
| 2. Karyotyp Turnerova syndromu..... | 2 |
| 2.1 Mozaika..... | 2 |
| 2.2 Izochromozóm X a ring chromozóm X | 2 |
| 2.3 Balancované translokace, delece krátkého a dlouhého raménka | 3 |
| 3. Vyrovnání exprese mezi geny lokalizovanými na chromozómu X a autozómech | 5 |
| 4. Inaktivace chromozómu X..... | 7 |
| 4.1 X inaktivační centrum a gen <i>Xist</i> (<i>XIST</i>)..... | 8 |
| 5. Regulátory exprese genu <i>Xist</i> | 10 |
| 5.1 Gen <i>Tsix</i> (<i>TSIX</i>)..... | 10 |
| 5.1.1 Regulátory exprese genu <i>Tsix</i> - <i>Xite</i> , <i>DXpas34</i> , <i>YY1</i> , <i>CTCF</i> | 12 |
| 5.2 Pluripotentní faktory a <i>RNF12</i> | 14 |
| 5.3 Gen <i>Ftx</i> (<i>FTX</i>)..... | 14 |
| 5.4 Gen <i>Jpx</i> (<i>JPX</i>)..... | 15 |
| 6. Různé uplatnění strategie inaktivace chromozómu X u tří savčích zástupců..... | 16 |
| 7. Geny unikající inaktivaci chromozómu X..... | 19 |
| 8. Fenotypové projevy Turnerova syndromu a jejich molekulární podstata – geny „rezistentní“ k inaktivaci chromozómu X | 22 |
| 8.1 Malá postava a kostní odchylky a gen <i>SHOX</i> | 22 |
| 8.1.1 Struktura genu <i>SHOX</i> a jeho regulace..... | 23 |
| 8.1.2 Příbuznost <i>SHOX</i> | 27 |
| 8.1.3 Geny regulované transkripčním faktorem <i>SHOX</i> | 28 |
| 8.2 Další geny zapojené do Turnerova syndromu..... | 29 |
| 8.2.1 Gonadální dysgeneze | 29 |
| 8.2.2 Gen <i>ZFX</i> – gonadální selhání a malá postava | 30 |
| 8.2.3 Gen <i>RPS4X</i> | 31 |
| 8.2.4. Problémy asociované s lymfatickým systémem a další fenotypové projevy TS | 31 |
| 9. Závěr..... | 33 |
| Seznam použité literatury..... | 35 |

1. Úvod

Fenotypové rysy onemocnění známého dnes jako Turnerův syndrom (TS) byly poprvé pozorovány před více než 250 lety, kdy Giovanni Baptiste Morgagni v roce 1768 popsal při pitvě ženy malého vzrůstu tvarovou anomálii ledvin a chybějící ovariální tkáň (Zapletalová *et al.*, 2003). Ale skutečně první uspořádaný souhrn fenotypových projevů vytvořil až lékař Henry H. Turner, jenž v roce 1938 popsal u sedmi pacientek atypické rysy jako malý vzrůst, mentální retardaci, atypický vývoj primárních a sekundárních pohlavních znaků, dále i cubitus valgus (vybočený loket) a krátký krk (Turner, 1938; cit. dle Stratakis a Rennert, 1994). Před ním si sice už roku 1930 německý lékař Ulrich všiml neobvyklého rysu – pterygium colli (kongenitální řasa po stranách krku) u 6-leté holčičky, nicméně, možná i kvůli omezením, se kterými se v průběhu 2. světové války musel potýkat, nepřispěl k charakterizaci Turnerova syndromu tak významně jako H. H. Turner (shrnutí v Stratakis a Rennert, 1994). Mezi další fenotypové projevy asociované s kompletní nebo částečnou monozómií chromozómu X patří předčasné ovariální selhání a s ním související neplodnost, hypoplazie bradavek, dermatologické odchylky, miskovité nehty, různé kostní odchylky, gotické patro, mikrogathie (malá brada), renální malformace, gastrointestinální problémy nebo onemocnění související s kardiovaskulárním systémem. U pacientek s TS můžeme pozorovat časté záněty středoušní dutiny vyúsťující v dospělosti až v hluchotu, častá jsou i zraková poškození, ale i vyšší predispozice k autoimunitním chorobám či k nádorům (shrnutí v Sybert a McCauley, 2004, Stratakis a Rennert., 1994). V neposlední řadě můžeme diagnostikovat neobvyklý kognitivní a psychosociální profil (El Abd *et al.*, 1999).

Celosvětový výskyt TS v současné době je 1 ze 2 000 narozených děvčátek (shrnutí v Ranke a Saenger, 2001) a jen v České republice žije více jak 2 000 žen a dívek s Turnerovým syndromem. V ČR se každoročně rodí 20 až 25 děvčátek s tímto poškozením (Zapletalová *et al.*, 2003). Z výše uvedených dat vyplývá, že TS postihuje poměrně značný počet žen, kterým defekty s ním spojené znesnadňují či zcela vylučují normální způsob života.

Cílem mé práce je odpovědět na otázku, proč se u žen s karyotypem X0 manifestují výše zmiňované fenotypové projevy. Turnerův syndrom úzce souvisí s procesem inaktivace chromozómu X, a proto uvedu základní principy jeho regulace a rozdílů jeho molekulární podstaty v rámci savců. Představím také geny, jež unikají procesu inaktivace chromozómu X, jejichž haploinsuficience je pravděpodobně příčinou vzniku TS.

2. Karyotyp Turnerova syndromu

Turnerův syndrom se manifestuje nejen u žen s monozómií chromozómu X, ale i u těch, které mají mozaikový karyotyp 45,X/46,XX, 45,X/46,XY, 45,X/47XXX, ring chromozóm, izochromozóm, popřípadě u těch pacientek, které nesou další strukturní aberaci chromozómu X (deleci, translokaci).

2.1 Mozaika

Ženy s karyotypem 45,X/46,XX mají mírnější fenotypové projevy oproti pacientkám s monozómií chromozómu X. Pacientky s mozaikovým karyotypem jsou často fertillní. Je možné, že monozómie je ve skutečnosti neslučitelná se životem, a i diagnostikovaná monozómie je pravděpodobně skrytou mozaikou. Příčinou většiny spontánních potratů je totiž monozómie chromozómu X. Závažnost fenotypového projevu u těchto žen by pak odrážel stupeň mozaiky (Held *et al.*, 1992; cit. dle Powell, 2005).

Jedinci s karyotypem 45,X/46,XY mohou mít primární pohlavní znaky mužské nebo typické pro ženu s TS. Z 92 testovaných jedinců s karyotypem 45,X/46,XY mělo 95 % normální mužské genitálie. U zbytku testovaných jedinců se vyskytovaly abnormality genitálií, zahrnující hypospadii (vrozená malformace mužských pohlavních orgánů), mikropenis, abnormality šourku, ovariální dysgeneze, popřípadě smíšená gonadální dysgeneze (pohlavní žláza obsahovala jak ovariální tkáň, tak i testikulární tkáň). U jedinců s 45,X/46,XY byl diagnostikován s vyšší frekvencí gonadoblastom. Z 23 zkoumaných jedinců 91 % jedinců mělo mužské primární pohlavní znaky, pokud převažovala buněčná linie 46,XY (Chang *et al.*, 1990).

Přibližně 2 % pacientek s TS mají karyotyp 45,X/47,XXX. Tyto ženy mají mírnější fenotypový projev. U pěti zkoumaných pacientek ze šesti, které byly starší než 10 let, se objevila spontánní puberta a menstruace s pravidelným menstruačním cyklem. Tři pacientky ze sedmi zkoumaných nevyžadovaly léčbu růstovým hormonem. Neměly žádné kardiovaskulární problémy ani renální anomálie. Nebyl u nich ani diagnostikován neobvyklý kognitivní či behaviorální fenotyp (Kleczkowska *et al.*, 1990; cit. dle Powell, 2005).

2.2 Izochromozóm X a ring chromozóm X

Pacientky s karyotypem 46,X,i(Xq) mají jeden chromozóm X normální a druhý ve formě izochromozómu. Izochromozómy vznikají v průběhu meiotického dělení nesprávným horizontálním dělením centroméry, vzniklý izochromozóm X nese pak nejčastěji dvě dlouhá raménka. Izochromozóm X může být monocentrický, ale častěji je dicentrický (Wolff *et al.*, 1996). Pacientky s karyotypem 46,X,i(Xq) měly stejné fenotypové projevy jako pacientky s monozómií chromozómu

X, ačkoliv u pacientek s izochromozómem hrozí vyšší riziko propuknutí autoimunitních onemocnění, nežli u žen s karyotypem 45,X (Elsheikh a Wass, 2001).

Pacientky s karyotypem 45,X/46,X,r(X) (jeden chromozóm X je normální a druhý ve formě ring chromozómu) mají výraznější fenotypové projevy. Mezi ty nejvýraznější projevy patřily mentální retardace, infekce středoušní dutiny a šilhání. Pacientky byly menšího vzrůstu, s menším obvodem hlavy, než pacientky s monozómií chromozómu X. U pacientek s ring chromozómem se objevovaly různé anomálie obličeje zahrnující plochý, široký nos, nadměrná vzdálenost očí, rozštěpy, široká ústa s tenkým horním rtem, kongenitální malformace a různé růstové abnormality zahrnující srůsty prstů a jiné defekty končetin. U pacientek byla patrná hyperpigmentace nebo naopak hypopigmentace kůže. Některé fenotypové projevy (mentální retardace, hypo- nebo hyperpigmentace, srůsty prstů) se vyskytují i u osob s Kubuki syndromem. Závažnost fenotypového projevu závisí na velikosti chromozómu ring, která je dána rozsahem delece krátkých a dlouhých ramének (čím menší byl chromozóm ring, tím projevy měly těžší formu) (Dennis *et al.*, 1993).

Mentální retardace ale i další fenotypové projevy typické pro pacientky s ring chromozómem jsou důsledkem funkční disomie genů lokalizovaných na ring chromozómu. U malých ring chromozómů došlo ke ztrátě X inaktivačního centra (XIC – z angl. X – inactivation centre), a proto nejsou tyto chromozómy X schopny podstoupit transkripční umlčení a některé geny jsou transkribovány ve vyšší dávce nežli u zdravé ženy. Naopak některé geny, lokalizované na koncích krátkých a dlouhých ramének, nejsou přítomny v důsledku delece a jejich haploinsuficience vede ke klasickým rysům popisovaným u TS (Migeon *et al.*, 1993). Příčina mentální retardace zřejmě souvisí s výskytem strukturálních abnormalit mozku (El Abd *et al.*, 1999).

2.3 Balancované translokace, delece krátkého a dlouhého raménka

Balancovaná translokace, která zahrnuje chromozóm X a autozóm, může vést k podobným fenotypovým projevům, které jsou popsány u pacientek s TS nebo k primárnímu či sekundárním ovariálnímu selhání (Powell *et al.*, 1994, Therman *et al.*, 1990; cit. dle Powell, 2005).

Pacientky s balancovanou translokací mohou mít různé fenotypové projevy v závislosti na místě zlomu a lze je obecně roztrdit do čtyř kategorií. První kategorie zahrnuje fenotypově normální ženy, u některých z nich však dcery nejsou zdravé. Druhá skupina žen zahrnuje ty, jež mají nějakou formu gonadální dysfunkce. Ta byla popsána u pacientek se zlomem v oblasti mezi Xq13-Xq26, ale ne u pacientek se zlomem Xq22. Třetí kategorie zahrnuje ženy, které mají recesivní nebo dominantní choroby vázané na chromozóm X. Čtvrtá skupina zahrnuje ženy s kongenitálními abnormalitami a vývojovou retardací (Waters *et al.*, 2001).

Pokud u nositelek balancované translokace dojde k inaktivaci chromozómu X, který nese translokovaný segment pocházející z autozómu, může to způsobit funkční monozómii pro autozómální

geny a naopak funkční disomii pro geny, které byly součástí segmentu translokovaného na autozóm. Tato situace je asociována s fenotypovým projevem podle místa zlomu (Schmidt a Du Sart, 1992; cit. dle Waters, 2001).

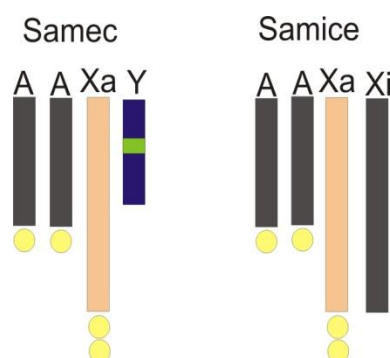
Zcela stěžejním pro odhalení genů TS by mohly být pacientky s delecemi krátkého či dlouhého raménka chromozómu X.

Delece krátkého raménka může vést k některým fenotypovým projevům asociovaným s TS. Rozsah delece u žen s touto chromozomální abnormalitou určuje závažnost fenotypového projevu. Pacientky s terminální delecí krátkého raménka jsou malého vzrůstu, ale jsou fertily. Pterygium colli je často popisovaný somatický rys u pacientek s karyotypem 45,X. Terminální delece Xp nevede však k tomuto fenotypovému projevu. Nižší vlasová hranice a kongenitální edémy byly popsány u pacientek, jež měly zlom v oblasti Xp22.3. Pokles očních víček byl pozorován u pacientek se zlomem v oblasti Xp11.2. Kostní abnormality – krátký krk, gotické patro, Madelungovy deformity, ale i krátká postava byly charakterizovány u pacientek se zlomem v Xp22.3. Pacientky se zlomem, jenž byl distálně od Xp11 neměly žádné kardiovaskulární problémy, naopak pokud zlom byl proximálně od Xp11, tak se u těchto pacientek manifestovaly kardiovaskulární problémy (měly abnormality aortického valu). Renální problémy byly asociovány se zlomem proximálně od Xp22.3. Nadměrná tvorba kožních névů se objevila u pacientek se zlomem proximálně od Xp22. Výskyt autoimunitních onemocnění byl vázán na zlom proximálně od Xp11.4 (James *et al.*, 1998).

Rovněž některé pacientky s delecí dlouhého raménka vykazují některé fenotypové projevy TS jako je malá postava, ovariální selhání (Therman *et al.*, 1990; cit. dle Powell, 2005).

3. Vyrovnání exprese mezi geny lokalizovanými na chromozómu X a autozómeh

V průběhu evoluce se vyvinulo několik systémů kompenzace genové dávky, které slouží k vyrovnání genové exprese u genů lokalizovaných na pohlavních chromozómech. U savců je genová dávka mezi pohlavími kompenzována jen pro genově bohatší chromozóm X (např. lidský chromozóm X nese 1 098 genů, naproti tomu chromozóm Y nese jen okolo 100 genů) a to pomocí transkripční inaktivace jednoho ze dvou chromozómů X v samičích buňkách (Lyon, 1961; cit. dle Heard a Disteche, 2006; Ross *et al.*, 2005; Skaletsky *et al.*, 2003). Současně, aby byla udržena rovnováha mezi expresí genů lokalizovaných na autozómeh a chromozómu X (Obr. 1), musí být dle Ohnovy hypotézy exprese genů lokalizovaných na chromozómu X dvakrát vyšší než u genů lokalizovaných na autozómeh. Genový expresní poměr mezi chromozómem X a autozomy je pak roven jedné (Ohno, 1967; cit. dle Heard a Disteche, 2006). Pokud by tato hypotéza neplatila, znamenalo by to, že nedochází k zdvojnásobení exprese genů lokalizovaných na chromozómu X a expresní poměr mezi chromozómem X a autozomy by byl roven 0,5.



Obr. 1: Zajištění rovnováhy genové exprese u genů lokalizovaných na chromozómu X u savců. Pro zajištění rovnováhy genové dávky u savců musela být hladina genové exprese u genů lokalizovaných na aktivním chromozómu X v průběhu vývoje zdvojnásobena, protože druhý chromozóm X byl u samic transkripčně umlčen (tmavý obdélník, Xi). Úroveň genové exprese (znazorněna graficky, žlutými kolečky) je pak dle Ohnovy hypotézy stejná pro pár autozómů a pro chromozomy X. Převzato a upraveno podle Heard *et al.* (2006).

O potvrzení Ohnovy hypotézy se pokusila studie založená na celogenomové expresní analýze pomocí DNA čipů (DNA microarrays). Nguyen a Disteche prokázali, že expresní poměr mezi autozomy a chromozómem X je blízko jedné (konkrétně pro lidské somatické tkáně 0,94, u myši 1,01) (Nguyen a Disteche, 2006).

Roku 2010 byla Ohnova hypotéza zpochybněna. Dle Xionga a spol. jsou závěry Nguyen a Disteche mylné, neboť celogenomová expresní analýza pomocí DNA čipů je vhodná pro porovnání úrovně exprese stejných genů v různých podmínkách a nikoliv pro porovnání úrovně exprese mezi různými geny. Autoři analyzovali expresi všech X-vazných genů pomocí RNA-

sekvenační technologie (RNA sequencing, RNA-Seq) a dospěli k závěru, že nedochází ke kompenzaci genové dávky mezi geny lokalizovanými na chromozómu X a autozómech (Xiong *et al.*, 2010).

Nicméně v krátké době byly závěry obou studií (Nguyen a Disteché i Xiong a spol.) znovu zpochybněny. Autoři totiž nevzali do úvahy, že chromozómy X jsou obohaceny o geny související s reprodukcí, jejichž exprese je v somatických tkáních nízká. Zároveň do analýzy chybně zahrnuli i X-vázané geny, jež jsou na chromozómu X transkripčně umlčeny.

Čtyři nezávislé skupiny v roce 2011 navrhly, že kompenzace genové dávky zdvojnásobením genové exprese na aktivním chromozómu X se může týkat jen těch genů, jež jsou na něm aktivně transkribovány (Deng *et al.*, 2011, Kharchenko *et al.*, 2011, Lin *et al.*, 2011, Yildirim *et al.*, 2011).

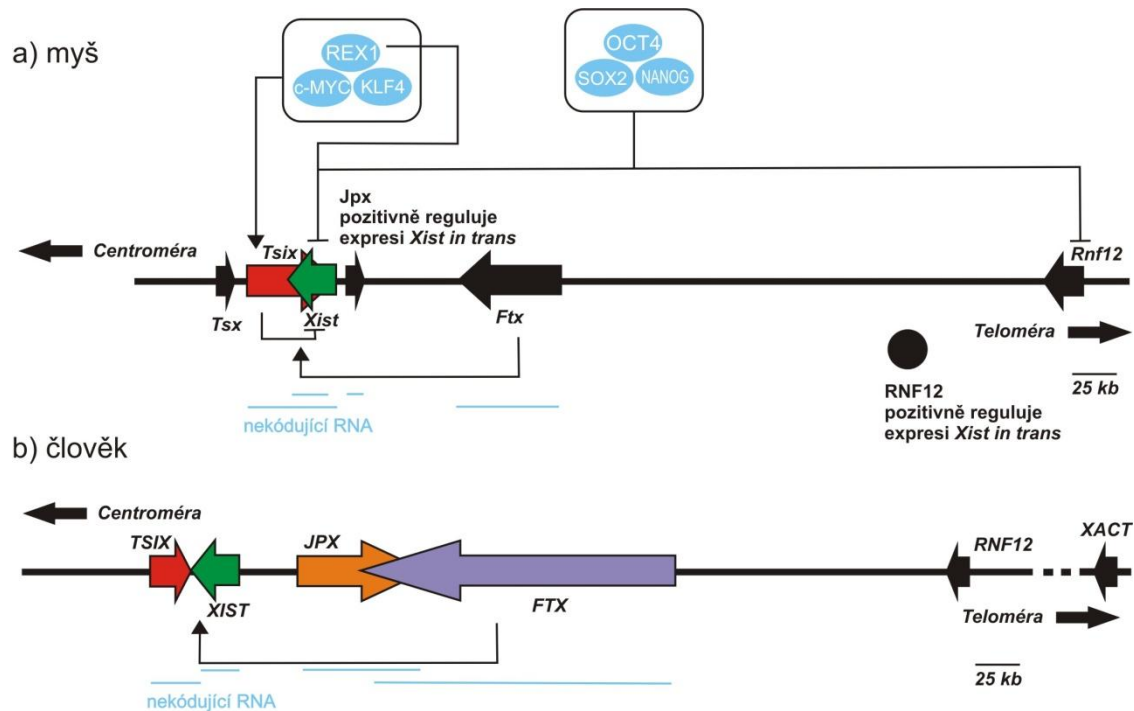
Za nejzajímavější považují výsledky Yildirim a spol., kteří krom potvrzení Ohnovy hypotézy navíc zjistili, že chromatin aktivního chromozómu X je obohacen o modifikace, které podporují transkripci genů: fosforylace RNA polymerázy typu II na serinu v pozici 5, trimetylace lysinu v pozici 4 na histonu H3 (H3K4me3), fosforylace polymerázy typu II na serinu v pozici 2 a trimetylace lysinu v pozici 36 na histonu H3 (H3K36me3). První dvě modifikace jsou spojeny s iniciací transkripce a další dvě s transkripční elongací (Yildirim *et al.*, 2011).

4. Inaktivace chromozómu X

Vlastní proces inaktivace chromozómu X (XCI, z angl. X chromosome inactivation) lze rozdělit do několika fází: *počítání* (hypotetický mechanismus, kterým je registrován počet chromozómů X v buňce vzhledem k počtu autozómů), *volba* (mechanismus náhodné volby, kterým je jeden ze dvou chromozómů X vybrán pro inaktivaci, Xi, a současně druhý jako aktivní, Xa), *iniciace* inaktivace vybraného chromozómu a fáze stabilního transkripčního umlčení během následujících mitotických dělení, která je již nezávislá na *Xist* (shrnutí v Augui *et al.*, 2011).

Většina experimentů, týkajících se inaktivace chromozómu X, byla provedena na myším modelu, konkrétně na myších embryonálních buňkách, které se staly *in vitro* modelovým systémem pro inaktivaci chromozómu X. Podstupují totiž inaktivaci chromozómu X před diferenciací, lze v nich poměrně snadno vytvořit cílové mutace a sledovat, jak tyto mutace ovlivní fenotyp. Fibroblasty jsou vhodným modelem pro výzkum fáze transkripčního umlčení chromozómu X, neboť udržují jeden Xi na diploidní sadu autozómů.

V následující podkapitole bude představen gen *Xist* (*XIST*), který kóduje klíčovou molekulu v procesu XCI u myši i člověka. V následujících kapitolách pak uvedu molekulární regulátory (viz obr. 2.), které se podílejí na regulaci *Xist* (*XIST*), jak už bylo zmíněno v úvodu, Turnerův syndrom úzce souvisí s procesem inaktivace chromozómu X. Nicméně XCI u myši a u člověka je v řadě aspektů odlišná, a proto nelze jednoduše extrapolovat detailní poznatky z myšího modelu na XCI u člověka. Proto představím jak ortologní geny pro lidskou a myší XCI, tak geny druhově specifické.



Obr. 2: Molekulární regulátory XCI. Za vlastní proces XCI zodpovídá gen *Xist*(*XIST*), který kóduje nekódující RNA, která obalením budoucího inaktivovaného chromozómu X indukuje transkripční umlčení X-vázaných genů. U myši exprese genu *Xist*, a tudíž i vlastní proces inaktivace, je výsledkem souhry působení pozitivních (RNF12, *Ftx*, *Jpx*) a negativních regulátorů (pluripotentní faktory: OCT4, SOX2, NANOG, REX1, c-MYC, KLF4, *Tsix*). U člověka, je gen *TSIX* výrazně zkrácený a nefunguje jako negativní regulátor exprese genu *XIST*. Předpokládá se, že *FTX* a *JPX* ovlivňují pozitivně expresi genu *XIST*, přesný molekulární mechanismus není známý. Gen *RNF12* byl sice popsán i u člověka, ale jeho vztah k XCI je neznámý. Nedávno byl u člověka objeven nový nekódující gen *XACT*. Vlastní schéma s využitím Pollex et al. (2012).

4.1 X inaktivační centrum a gen *Xist* (*XIST*)

V době, kdy se ještě nevědělo nic o podstatě regulace inaktivace chromozómu X, bylo už zřejmé z experimentů s chromozomálními translokacemi, že k inaktivaci chromozómu X je potřeba X-vázaný lokus, tzv. X inaktivační centrum, XIC (Rastan, 1983). U člověka je XIC lokalizováno na chromozómu X do oblasti Xq13 (Brown *et al.*, 1991) a u myši do oblasti XD (Rastan, 1985). Z oblasti lidského XIC byl roku 1991 izolován gen *XIST* (z angl. X inactivation specific transcript), jehož unikátní vlastností je, že je exprimován výlučně z inaktivního chromozómu X, nikoliv z aktivního chromozómu X (Brown *et al.*, 1991). Téhož roku se podařilo izolovat i myši gen *Xist* (Borsani *et al.*, 1991). Transkripční umlčení chromozómu X je přímým důsledkem akumulace dlouhé nekódující, procesované RNA - *Xist* (*XIST*) o délce 17 kb. Tato lncRNA (z angl. long non-coding RNA) působí vciis na zvoleném budoucím inaktivovaném chromozómu X. Transkript *Xist* byl první identifikovanou lncRNA (long non-coding RNA) s funkcí v XCI a patří nyní již do několikačlenné rodiny lncRNA, které jsou aktivní v procesu XCI. Transkript - *Xist* (*XIST*) obsahuje pět oblastí (A-E), v nichž se nacházejí charakteristické repetice. Oblast A na 5' konci genu má zásadní funkci pro XCI. Repetice regionu A je obohacena o adenosin a vytváří charakteristickou sekundární strukturu v podobě 2 smyček (Wutz *et al.*, 2002).

Chaumeil a spol. objevili další funkci transkriptu *Xist* při procesu XCI. Akumulace RNA *Xist* na budoucím inaktivovaném chromozómu X vede ke vzniku kompartmentu uvnitř jádra, z kterého je vyloučena RNA polymeráza typu II a transkripční faktory (TF z angl. transcription factor), a tudíž je transkripčně neaktivní. Jeho vznik je nezávislý na oblasti A genu *Xist*. Represe transkripce X-vázaných genů je doprovázená reorganizací chromozómu X, která spočívá ve fyzickém přesunu celých genomových bloků nesoucích geny určené k umlčení z vnější oblasti směrem k transkripčně neaktivnímu vnitřnímu kompartmentu (Chaumeil *et al.*, 2006).

Chow se spol. navrhli, že lokalizace genu do transkripčně neaktivního kompartmentu, vytvářeného *Xist*, je závislá na zastoupení repetitivních sekvencí LINE (z angl. long interspersed nuclear elements). Geny s nízkým obsahem LINE elementů zůstávají vzdálené od represivního kompartmentu a rezistentní vůči umlčení zprostředkované oblastí A genu *Xist*. Naopak geny s vysokou hustotou elementů LINE vykazují umlčení a jsou lokalizovány do kompartmentu s absencí TF a RNA polymerázy typu II (Chow *et al.*, 2010).

U vačnatců inaktivace chromozómu X není závislá na *Xist*, ale na zcela nově identifikované lncRNA – *Rsx* (z angl. RNA on the silent X). Tato RNA je delší než *Xist*, konkrétně - 27 kb. *Rsx*-RNA u vačnatců, podobně jako *Xist*, indukuje transkripční umlčení obalením budoucího inaktivovaného chromozómu X, z kterého je exprimována. Gen *Rsx* má 4 exony a RNA, která vzniká jeho transkripcí, podstupuje sestřih a polyadenylaci. Geny *Rsx* a *Xist* nejsou homology, ale gen *Rsx* se vyznačuje některými společnými rysy s genem *Xist*. Například, na 5'konci se vyskytuje tandemová repetice, která je však bohatá na GC nukleotidové páry. Tato repetice má charakteristickou sekundární strukturu tvořenou dvěma smyčkami. Vlastní sekundární struktura by mohla plnit důležitou funkci v iniciaci inaktivace chromozómu X (Grant *et al.*, 2012). Geny *Xist* a *Rsx* zřejmě plní u placentárních savců a vačnatců stejnou funkci a jejich existence svědčí o dosažení stejného cíle, tedy XCI nezávisle, v průběhu evoluce. Otázkou zatím zůstává, jak jsou tyto dvě evoluční větve odlišné a zda by proces XCI u myši mohl být zajištěn pomocí transgenního *Rsx* při absenci *Xist* a naopak.

Zcela překvapivým byl objev Vallot a spol., kteří uvedli, že aktivní lidský chromozóm X podobně jako inaktivovaný chromozóm X je obalovaný nekódující RNA. Jedná se o další lncRNA, nazvanou *XACT* (z angl. X active coating transcript). Gen *XACT* je na lidském chromozómu X lokalizovaný do oblasti Xq23 mezi protein kódující geny *AMOT* (gen pro angiomotin) a *HTR2C* (z angl. 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C) v tzv. intergenní doméně o velikosti 1,7 Mb. Tato doména je GC bohatá. RNA *XACT* je nesestřižena a polyadenylována. Exprese genu *XACT* a obalení aktivního chromozómu X je omezeno pouze na rané období diferenciace buněk u člověka a je tedy zřejmě důležitý pro iniciaci XCI u člověka. Transkript *XACT* je jen málo konzervován a chybí u myši (Vallot *et al.*, 2013). Je zajímavé, že lncRNA hrají důležitou roli v procesu XCI jak u člověka, tak u myši, ale na příkladech lidské RNA *XACT* a myši RNA *Tsix* se ukazuje, že mechanismy vedoucí k umlčení a aktivaci jednotlivých chromozómů X mohou být druhově zcela odlišné.

5. Regulátory exprese genu *Xist*

Gen *Xist* (*XIST*) je zcela zásadní pro proces inaktivace chromozómu X, neboť obalením chromozómu X indukuje transkripční umlčení a vazbu chromatinových značek, které tento represivní stav ustaví a později i po buněčném dělení v dceřiných buňkách. Exprese genu *Xist* (*XIST*) je výsledkem složité regulace, do které se zapojují jak pozitivní (Jpx (Jpx), Ftx (FTX), RNF12) tak i negativní regulátory (Tsix, pluripotentní faktory) (viz obr. 2), které často působí antagonisticky.

5.1 Gen *Tsix* (*TSIX*)

Jedním z negativních regulátorů exprese genu *Xist* je 40 kb dlouhá RNA *Tsix* (z angl. X (inactive)-specific transcript, antisense). Jedná se o lncRNA, která může být přepisována ze dvou promotorů (buď proximálního, anebo distálního). Iniciací exprese z proximálního promotoru je častější než iniciace exprese z distálního promotoru. Gen *Tsix* je v opačné orientaci ke genu *Xist* a sekvence obou genů se plně překrývá (Lee *et al.*, 1999).

Existuje několik způsobů, kterými by mohl gen *Tsix* reprimovat expresi genu *Xist*. První možností je párování chromozómů X, koordinované pomocí RNA *Tsix* s následným asymetrickým rozložením chromatinových značek na budoucím aktivním a inaktivním chromozómu X. Před počátkem inaktivace chromozómu X v samičích buňkách je gen *Tsix* exprimován z obou chromozómů X a RNA *Tsix* se váže *in cis* na oba chromozómy X (Lee *et al.*, 1999). Tato bialelická exprese má za následek, že se na chromozómech X akumulují proaktivní chromatinové značky: dimethylace lysinu v pozici 4 na histonu H3 (H3K4me2) a zvýšená acetylace histonu H4. Tyto značky podmiňují vznik euchromatinové konformace a ta paradoxně inhibuje expresi genu *Xist* (Sun *et al.*, 2006). V rané fázi inaktivace chromozómu X pokračuje exprese genu *Tsix* na budoucím aktivním chromozómu X. *Tsix* udržuje euchromatinový stav a zároveň transkripčně umlčuje gen *Xist* (Lee *et al.*, 1999). Na budoucím inaktivním chromozómu X je gen *Tsix* reprimován a transkripce genu *Xist* je aktivována pomocí RNA *Jpx* (viz dále) (Tian *et al.*, 2010).

Jako sekundární mechanismus umlčení exprese genu *Xist* na aktivním chromozómu X, může RNA *Tsix* aktivovat *de novo* DNA-metyltransferázu (Dnmt3a), která zodpovídá za metylaci cytosinů CpG dinukleotidů v promotoru genu *Xist* na aktivním chromozómu X a udrží gen *Xist* transkripčně umlčen (Sun *et al.*, 2006). Naopak na budoucím inaktivovaném chromozómu X je exprese genu *Tsix* reprimována (Lee *et al.*, 1999). Absence RNA *Tsix* umožňuje trimetylaci lysinu v pozici 27 na histonu H3 (H3K27me3) i vymizení acetylace histonu H4 a dimethylace lysinu v pozici 4 na histonu H3 (H3K4me2) v blízkosti promotoru genu *Tsix*. Výskyt H3K27me3 vede ke vzniku heterochromatinu, který umožní expresi genu *Xist* na budoucím inaktivovaném chromozómu X. Fáze udržení inaktivace

je asociována se snížením výskytu H3K27me3 a naopak zvýšením výskytu metylace H3K4me2 a acetylace histonu H4 v blízkosti promotoru genu *Xist* (Sun *et al.*, 2006).

Další funkcí RNA *Tsix* je kompetice s RNA *Xist* o vazbu s PRC2. Expresí oblastí bohaté na A repetice, která je součástí genu *Xist*, vzniká 1,6 kb dlouhá RNA - RepA. RNA RepA váže PRC2 (z angl. Polycomb Repressive Complex 2). Komplex PRC2 má histon-metyltransferázovou aktivitu a zodpovídá za přítomnost H3K27me3 v blízkosti promotoru genu *Xist*. Tato chromatinová značka podporuje expresi genu *Xist* z budoucího inaktivního chromozómu X, tudíž i indukci transkripčního umlčení zvoleného chromozómu X. PRC2 se neváže na RNA RepA přímo, ale přes Ezh2 (z angl. histone-lysine N-methyltransferase). Autoři prokázali, že RNA *Tsix* kompetitivně inhibuje vazbu Ezh2, tudíž i PRC2 komplexu, k RepA (Zhao *et al.* 2008).

Poslední navržený mechanismus regulace exprese genu *Xist* pomocí *Tsix* předpokládá účast RNA interference. RNáze III podobný enzym Dicer je schopen tvořit malé dvouvláknové RNA – miRNA (z angl. microRNA) a siRNA (small interfering RNA) z dlouhé prekurzorové dsRNA (z angl. double strand RNA). V principu každá dsRNA by mohla být substrátem Dicer, tudíž i dsRNA, která by vznikla interakcí mezi RNA *Xist* a komplementární RNA *Tsix*.

Ogawa a spol. našli malé RNA duplexy v myších embryonálních kmenových buňkách, jejichž původ byl v *Xist* a *Tsix* a tím jako první prokázali, že by se RNA interference mohla uplatňovat v regulaci exprese genu *Xist* a tudíž i v procesu XCI. Tyto malé RNA, označované jako xiRNA, byly přítomné pouze v průběhu iniciace XCI (v pre- ani postinaktivační fázi nebyly detekovány) (Ogawa *et al.*, 2008).

Ogawa a spol. navrhli model, jak by mohly xiRNA fungovat v procesu XCI. Před vlastní XCI, jsou geny *Xist* i *Tsix* exprimovány z obou chromozómů X (Lee *et al.*, 1999). Jejich transkripty pak mohou vytvořit RNA duplex, který je prekursorem pro krátké molekuly xiRNA, které zajistí inhibici exprese genu *Xist* z obou chromozómů X tak, že v této fázi budou oba chromozómy X aktivní. Na počátku inaktivace chromozómu X *Tsix* na budoucím aktivním chromozómu brání akumulaci *Xist* vytvářením duplexu, ze kterého následně vznikají xiRNA, které inhibují expresi genu *Xist*. Potvrzením této teorie by mohlo být i to, že Ogawa a spol. detekovali duplex RNA, z něhož jsou malé xiRNA generovány. Tato dsRNA by mohla být substrátem Dicer, jenž by jí procesoval do xiRNA o velikosti 22-42 nt (z angl. nucleotide) podobně, jako k tomu dochází v kanonické dráze RNA interference. V souladu s touto hypotézou v nepřítomnosti Dicer množství xiRNA výrazně pokleslo, ale zvýšila se naopak hladina transkriptu *Xist*. Zvýšená hladina transkriptu *Xist* by se dala vysvětlit tím, že absence Dicer, a tudíž i xiRNA, způsobuje uvolnění represe genu *Xist* a tedy jeho transkripci. Ačkoliv v nepřítomnosti Dicer došlo k nárůstu RNA *Xist*, nebyla tato RNA schopna obalovat chromozóm X a indukovat tak transkripční umlčení. Ogawa a spol. proto usoudili, že Dicer má i přímý vliv na XCI (Ogawa *et al.*, 2008).

Na rozdíl od předchozí práce Kanellopoulou a spol. zjistili, že nepřítomnost Dicer nemá vliv na XCI. I v nepřítomnosti Dicer byla RNA *Xist* schopna obalovat budoucí inaktivovaný chromozóm X a indukovat transkripční umlčení ostatních genů akumulací PCR2. Obě práce ukázaly, že v nepřítomnosti Dicer je hladina RNA – *Xist* vyšší. Hladina nesestřížených transkriptů byla srovnatelná mezi kontrolou a Dicer defektními buňkami, a proto Kanellopoulou a spol. usoudili, že hladina RNA *Xist* bude řízena na posttranskripční úrovni (Kanellopoulou *et al.*, 2009).

Nesterová a spol. pozorovali, že nepřítomnost Dicer neměla vliv ani na XCI. I v jeho nepřítomnosti docházelo k expresi genu *Xist* z budoucího inaktivního chromozómu X a následně se *Xist* standardně rozšířila podél chromozómu X. Závěry této studie se tedy shodovaly se závěry Kanellopoulou a spol. v tom, že regulace exprese genu *Xist* i vlastní proces inaktivace není závislý na RNA interferenci (Nesterova *et al.*, 2008).

Ačkoliv detailní molekulární mechanismus vlivu *Tsix* na expresi genu *Xist* je doposud neznámý, je zřejmé, že se jedná o jeho hlavní negativní regulátor. Otázkou byla jeho evoluční konzervace, a zda i u člověka gen *TSIX* plní stejnou funkci? Migeon a spol. identifikovali ortologa myšního genu *Tsix* u člověka. Podobně jako myší gen *Tsix*, i lidský gen *TSIX* je transkribován v opačném směru než gen *XIST* a dává vzniknout lncRNA. Avšak lidský gen *TSIX* je zkrácený na 5' konci a nezasahuje tedy do promotoru genu *XIST*. Dalším rozdílem je, že lidský gen *TSIX* nemá CpG bohatou doménu, která je zcela esenciální pro funkci myšního genu *Tsix* (Migeon *et al.*, 2001). Význam 5' konce myšního genu *Tsix* byl pokázán pomocí jeho delece, která vedla k tvorbě nefunkčního transkriptu v XCI. Tato delece ovlivnila volbu chromozómu X, který bude inaktivován tak, že přednostní inaktivaci podstupoval mutovaný chromozóm X (Lee a Lu, 1999). Transkripty *Tsix* a *TSIX* se dále liší chromozómem, ze kterého jsou exprimovány. Myší gen *Tsix* je exprimován z aktivního chromozómu X, *TSIX* je exprimován z inaktivního chromozómu X stejně jako *XIST* (Migeon *et al.*, 2002).

Lidský gen *TSIX* a jeho produkt – RNA *TSIX* nejsou schopny fungovat jako negativní regulátory genu *XIST* *in cis*. Vše nasvědčuje tomu, že regulace exprese *Xist* za pomoci genu *Tsix* a jeho produktu je zcela specifická pro myš. Gen *TSIX* by mohl být pouze evoluční pozůstatek, který ztratil svou funkci pro proces XCI u člověka. Nedávný objev genu *XACT* by mohl přispět k rozluštění, jak je na aktivním chromozómu X u člověka zabráněno expresi genu *XIST* bez přispění genu *TSIX*.

5.1.1 Regulátory exprese genu *Tsix* - *Xite*, *DXpas34*, *YY1*, *CTCF*

Prvním popsaným regulátorem exprese genu *Tsix* u myší je transkripční element *Xite* (z angl. X-inactivation intergenic transcription elements), který leží proti směru jeho transkripce *Tsix* (20–32 kb po směru transkripce genu *Xist*). Ogawa a Lee zjistili, že delece *Xite* vede ke snížení exprese genu *Tsix* a chromozóm s delecí *Xite* byl přednostně inaktivovaný. Dle tohoto pozorování učinili závěr, že *Xite* funguje jako pozitivní regulátor genu *Tsix*. Bylo zjištěno, že *Xite* na počátku procesu inaktivace

chromozómu X podporuje expresi genu *Tsix* pouze z budoucího aktivního chromozómu X, a blokuje tak akumulaci RNA *Xist* na budoucím aktivním chromozómu X (Ogawa a Lee, 2003).

Ogawa a Lee navrhli několik modelů, kterými by mohl *Xite* pozitivně regulovat expresi genu *Tsix*. První z modelů předpokládá, že *Xite* funguje jako enhancer genu *Tsix*. Nebo by *Xite* mohl fungovat jako LCR (z angl. locus control regions) a indukcí změny chromatinové struktury zajistit expresi genu *Tsix* pouze z aktivního chromozómu X. Gen *Xite* by mohl obsahovat vazebné místo pro transkripční faktory, které by ovlivňovaly promotor genu *Tsix*. Poslední model navrhuje, že *Xite* neovlivňuje expresi genu *Tsix* sám o sobě, nýbrž dává vzniknout nekódující RNA, která pak zodpovídá za vlastní regulaci genu *Tsix* (Ogawa a Lee, 2003). Podle nejnovější publikace je *Xite* matricí pro lncRNA (Lee a Bartolomei, 2013).

DNA element *DXPas34* obsahuje GC bohatou tandemovou repetici (1,2 kb dlouhou). Nachází se 750 bp po směru transkripce od hlavního promotoru genu *Tsix*. Pomocí delece této tandemové repetice autoři prokázali, že je zcela zásadní pro expresi genu *Tsix*. Tato delece totiž snižuje účinnost tvorby iniciačního transkripčního komplexu RNA polymerázy typu II s transkripčním faktorem IIB na hlavním promotoru genu *Tsix*, vedoucí k redukci exprese genu *Tsix* v myších embryonálních buňkách (Vigneau *et al.*, 2006).

Vzhledem k tomu, že se gen *TSIX* neuplatňuje u člověka jako negativní regulátor exprese genu *XIST*, nejsou potřeba ani jeho regulační elementy – *Xite* a *DXPas34*. V průběhu evoluce zřejmě došlo k jejich vymizení, neboť nebyly u člověka detekovány na úrovni DNA (Chureau *et al.*, 2002).

CTCF (z angl. CCCTC binding factor) je obecně se vyskytující TF, jehož DNA vazebnou doménou je zinkový prst. Funguje jednak jak aktivátor, tak i represor během normálního vývoje. CTCF hraje i velmi významnou úlohu při imprintingu. CTCF má významnou roli jako izolátor (insulator) při vytváření hranic mezi euchromatinem a heterochromatinem, a tím reguluje přístup k enhancerovým sekvencím některých genů nebo zabraňuje metylaci v kontrolních oblastech některých genů. Vazebná místa pro tento TF jsou široce rozšířena v rámci genomu včetně enhanceru genu *Tsix*. Některá z těchto vazebných míst mohou být odlišně metylována, což ovlivňuje sílu vazby CTCF (Donohoe *et al.*, 2007).

YY1 je dalším TF s DNA vazebnou doménou s motivem zinkového prstu, jenž se uplatňuje v XCI. Podobně jako CTCF, YY1 působí jako aktivátor, represor i izolant (insulator). YY1 má vazebná místa v promotoru genu *Xist* i v *DXPas34*. YY1 a CTCF spolu navzájem interagují a tento dimér podporuje aktivaci exprese genu *Tsix*. Delece *YY1* nebo *CTCF* vede k výraznému snížení exprese genu *Tsix* v myších embryonálních buňkách. Vliv diméru CTCF – YY1 na expresi *Xist* je důsledkem aktivace *Tsix*. Nelze vyloučit ani přímý vliv na *Xist*, protože YY1 má své vazebné místo v jeho promotoru (Donohoe *et al.*, 2007).

5.2 Pluripotentní faktory a RNF12

Pluripotentní faktory NANOG, OCT4 a SOX2 rovněž indukují represi *Xist*, která však není závislá na *Tsix*. Váží se do oblasti intronu 1 genu *Xist* (Navarro *et al.*, 2008). Oba systémy negativní regulace exprese genů *Xist* spolu navzájem kooperují. Pokud jeden z nich nefunguje, např. při mutaci genu *Tsix* (Lee a Lu, 1999) nebo pokud je deletováno vazebné místo pro pluripotentní faktory (Barakat *et al.*, 2011), nediferencované myší embryonální buňky nejsou schopny spustit XCI.

Dalším pluripotentním faktorem je REX1, který je nezbytný pro elongační fázi transkripce genu *Tsix*. Váže se do oblasti *DXPas34* a zprostředkovává vazbu dalších pluripotentních faktorů: c-MYC a KLF4 do oblasti mezi *DXPas34* a hlavní promotor genu *Tsix*. Oba tyto faktory stimulují transkripci genu *Tsix*. KLF4 zprostředkovává vazbu transkripčního komplexu do promotoru genu *Tsix* (Navarro *et al.*, 2010). REX1 se váže i do promotoru genu *Xist* a podílí se na jeho represi (Gontan *et al.*, 2012).

RNF12 (z angl. ring finger protein 12) je první identifikovaný X-vázaný aktivátor XCI. Je kódován genem *Rnf12*, který leží 500 kb proti směru transkripce od genu *Xist*. RNF12 působí jako pozitivní regulátor transkripce genu *Xist* *in trans* (Barakat *et al.*, 2011). Gen *Rnf12* má svého lidského ortologa v oblasti Xq13–q21, ale jeho úloha v procesu XCI u člověka je neznámá (Ostendorff *et al.*, 2000). U myši RNF12 funguje i jako E3 ubiquitin ligáza, jež zprostředkovává ubiquitinaci REX1, který pak podléhá degradaci v proteazomu. Nebylo prokázáno, že by RNF12 ovlivňoval i jiné pluripotentní faktory zapojené v procesu XCI. Naopak, NANOG, OCT4 a SOX2 nasedají do promotoru genu *Rnf12* a negativně ovlivňují jeho expresi (Barakat *et al.*, 2011).

Předpokládá se, že u myších embryonálních buněk se zvyšuje koncentrace RNF12, což vede ke snížení koncentrace REX1. Gen *Rnf12* je lokalizovaný na chromozómu X, a proto jeho koncentrace přesáhne prahovou hodnotu pouze v samičích buňkách, kde indukuje degradaci proteinu REX1 a zároveň stimuluje XCI. Předpokládá se, že RNF12 ovlivňuje i hladinu/aktivitu transkripčního faktoru YY1 (Gontan *et al.*, 2012).

5.3 Gen *Ftx* (*FTX*)

Gen *Ftx* (z angl. five prime to *Xist*) kóduje další lncRNA, která je zapojena do procesu XCI. Gen *Ftx* je konzervován u myši, člověka a krávy (zvláště jeho 5'konec). U myši se skládá z 15 exonů (genomová oblast je dlouhá 63 kb), u člověka ze 12 exonů (genomová oblast je dlouhá 330 kb) a u skotu z 15 exonů (genomová oblast je dlouhá 82 kb). Gen *Ftx* dává vzniknout několika isoformám RNA, neboť lze vzájemně kombinovat alternativní počátky i terminátory transkripce a také alternativní sestřih. Ke komplexitě produktů genu *Ftx* přispívá lokalizace dvou klastrů miRNA uvnitř intronu 12. I tyto klastry jsou přítomny u všech tří zkoumaných zástupců savčí říše, avšak jejich funkce je doposud neznámá (Chureau *et al.*, 2011).

Gen *Ftx* uniká procesu XCI a uplatňuje se jako pozitivní regulátor exprese genu *Xist*. Produkty genu *Ftx* ovlivňují strukturu chromatinu v oblasti promotoru genu *Xist*, ačkoliv molekulární mechanismus není zcela jasný. Nedávná studie ukázala, že nepřítomnost genu *Ftx* vede k redukci RNA – *Xist* a současně ke snížení H3K4me2 (Chureau *et al.*, 2011).

5.4 Gen *Jpx* (*JPX*)

Gen *Jpx* leží 10 kb proti směru transkripce genu *Xist* a je transkribován v opačné orientaci nežli gen *Xist* (Tian *et al.*, 2010). Gen *Jpx* je konzervován, jeho ortologa najdeme i u člověka (Chureau *et al.*, 2002). Produktem transkripce genu *Jpx/JPX* je opět lncRNA. Gen *Jpx/JPX* uniká XCI a v kooperaci s RepA zodpovídá za aktivaci genu *Xist/XIST* na budoucím inaktivním chromozómu X. Ztráta exprese genu *Tsix* na budoucím inaktivovaném chromozómu X umožní navázání komplexu PCR2/RepA, který zodpovídá za H3K27me3 v promotoru genu *Xist*. RNA *Jpx* působí v *trans* na gen *Xist* a podporuje jeho aktivaci (Tian *et al.*, 2010).

V samčích buňkách není gen *Jpx* exprimován, a proto se v nich neexprimuje ani *Xist*. V samičích buňkách na budoucím aktivním chromozómu X také nedochází k expresi genu *Jpx*, čímž chybí potřebná transaktivace genu *Xist* (Tian *et al.*, 2010).

6. Různé uplatnění strategie inaktivace chromozómu X u tří savčích zástupců

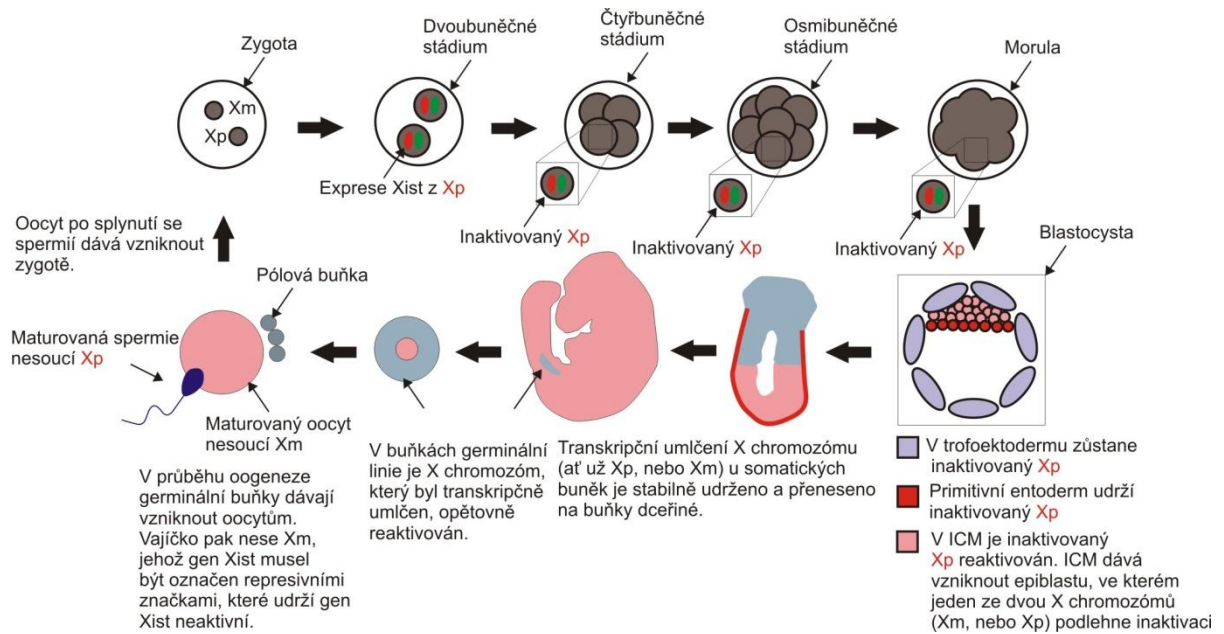
Mechanismus a rozsah inaktivace chromozómu X se mezi savci liší. Například u vačnatců XCI podléhá imprintingu a to paternálnímu (Sharman, 1971; cit. dle Heard *et al.*, 2006).

Inaktivace chromozómu X u myších samic probíhá ve dvou vlnách, jak shrnuje obr. 3. V pre-implantačním období v rané fázi myší embryogeneze jsou oba chromozómy X v samičích buňkách aktivní (Monk a Harper, 1978). Expresi genu *Xist* z Xp (paternálního chromozómu X) můžeme detekovat už v G2 fázi dvoubuněčného samičího embrya (Zuccotti *et al.*, 2002), tedy v době, kdy lze pozorovat hlavní aktivaci zygotického genomu (Schultz, 1993; cit. dle Zuccotti *et al.*, 2002). Dřívější studie detekovala expresi genu *Xist* až ve čtyřbuněčném stádiu (Kay a Penny, 1993), ale to mohlo být způsobeno tím, že autoři analyzovali embryo v G1 fázi dvoubuněčného stádia, zatímco gen *Xist* je exprimován až ve fázi G2 dvoubuněčného stádia (Zuccotti *et al.*, 2002).

Migeon a spol. navrhli, že by přednostní inaktivace paternálního chromozómu X mohla souviset s rozdílnou methylací 5' konce *Tsix* paternálního a maternálního původu (Migeon *et al.*, 2001).

Při přednostní inaktivaci paternálního chromozómu X by mohl hrát roli i protein RNF12 exprimovaný z maternální alely, který je přítomen ve vysoké koncentraci v oocytech. Shin se spol. prokázali, že zvýšení hladiny RNF12 expresí primárně z maternální alely, vede k přednostní inaktivaci Xp v myších embryonálních buňkách. Pokud gen *Rnf12* chyběl na maternálním chromozómu, k přednostní inaktivaci Xp v myších embryonálních buňkách nedocházelo (Shin *et al.*, 2010).

Přednostní umlčení Xp je udrženo v trofoektodermu a primitivním entodermu (Takagi a Sasaki, 1975), ale mizí ve vnitřní buněčné mase (ICM, z angl. inner cell mass), která v průběhu vývoje dává vzniknout mimo jiné vlastnímu embryu. V buňkách epiblastu ve vnitřní buněčné mase dochází po reaktivaci chromozómu Xp k opětovné inaktivaci chromozómu X. Ta je tentokrát náhodná, což znamená, že chromozómy X pocházející od matky nebo od otce mají stejnou pravděpodobnost být inaktivovány (Mak *et al.*, 2004). Inaktivovaný stav je v somatických buňkách stabilně udržován (Lyon, 1961; cit. dle Heard a Disteche, 2006), ale v germinální linii podléhá chromozóm X reaktivaci (Sugimoto a Abe, 2007).



Obr. 3: Průběh inaktivace chromozómu X v myším embryu. Šedá kolečka znázorňuje buňku, ve které jsou umístěny červený oválek (znázorňující inaktivovaný chromozóm X) a zelený oválek (znázorňující aktivní chromozóm X). Xp = paternální chromozóm X, Xm = maternální chromozóm X. Vlastní schéma s využitím Augui et al. (2011).

Ačkoliv králík a myš jsou si poměrně fylogeneticky blízcí, u králíka se paternální imprinting nevyskytuje a načasování XCI se značně liší. U králíka ještě v osmibuněčném stádiu, kdy dochází k aktivaci genomu zygoty, se gen *Xist* exprimuje u embryí obou pohlaví. V pozdějších vývojových stádiích embryí sameček je exprese genu *Xist* umlčena. U myši probíhá aktivace genomu mnohem dříve (v dvoubuněčném stádiu).

U myši mezi obdobím hlavní zygotické aktivace genomu a stádiem vzniku blastocysty není maternální alela genu *Xist* exprimována. To se značně liší od situace v časně králíčí blastocystě, kde zpočátku (96 hodin po pohlavním styku) v ICM nedochází na chromozómech X k akumulaci *Xist* a oba chromozómy X jsou tedy aktivní. Ale už za 24 hodin v buňkách epiblastu *Xist* obaluje jeden nebo dočasně oba chromozómy X, které budou po akumulaci *Xist*-RNA transkripčně umlčeny. Také v trofoektodermu dochází k inaktivaci jednoho nebo obou chromozómů X akumulací *Xist* RNA (Okamoto *et al.*, 2011).

Existuje jen několik studií zabývajících se lidským pre-implantačním vývojem a ranou XCI. Tyto studie jsou totiž limitovány etickým kodexem, týkajícím se práce na lidských embryích. Proto jsou naše představy o XCI v raném lidském embryu velice omezeny.

Na první pohled zřejmý rozdíl mezi myším a lidským embryem je v rychlosti vývoje (vývoj myšího embrya je o 1-2 dny rychlejší). S pomalejším vývojem lidských embryí souvisí i pozdější aktivace zygotického genomu, tedy ve čtyř- až osmibuněčném stádiu (Wells *et al.*, 2005). U lidského embrya nepodléhá XCI imprintingu a exprese genu *XIST* je v raném vývoji bíaleická a lze ji detekovat

již u čtyř- až osmibuněčného stádia. Okamoto a spol. se zaměřili na analýzu tří X-vázaných genů, které jsou na inaktivním chromozómu X lidských somatických buněk umlčeny. Zjistili, že ještě v rané blastocystě jsou stále geny exprimovány, což dokazuje, že chromozómy X jsou aktivní. Z těchto poznatků plyne, že lidská embrya iniciují XCI později nežli jejich myši protějšky (Okamoto *et al.*, 2011). Tyto závěry jsou v rozporu s dřívější studií, kterou provedl Van den Berg a spol. Zjistil totiž, že již v 8 buněčném stadiu lze pozorovat XCI (van den Berg *et al.*, 2009). Rozpor mezi oběma studiemi lze vysvětlit odlišnými kultivačními podmínkami a různými metodami pro detekci exprese genu *Xist*.

Závěry o vlivu imprintingu na XIC v trofoektodermu lidských embryí jsou rozporuplné. Migeon a spol. uvádí, že XCI nepodléhá imprintingu, naopak Harrison a spol. uvádí, že dochází k přednostní inaktivaci paternálního chromozómu X (Migeon *et al.* 1978, Harrison, 1989). Jedním z možných vysvětlení, proč se názory na mechanismus XCI v trofoektodermu lišily, je, že všechny tyto studie se spoléhaly na analýzu pouze jednoho nebo dvou X-vázaných genů a podle nich usuzovaly na aktivitu celého chromozómu. Druhé možné vysvětlení je, že intenzita exprese některých genů na chromozómu X se může u různých buněk lišit (Carrel a Willard, 2005), proto nelze dle expresního stavu jednoho genu usuzovat na expresní aktivitu celého chromozómu X. Až studie, využívající velké množství jednotlivých X-vázaných nukleotidových polymorfismů, dospěla k závěru, že i v lidské placentě (vzniká z buněk trofoektodermu), probíhá XCI náhodně (de Mello *et al.*, 2010).

U lidských embryí jsou v ICM oba chromozómy X aktivní, přestože je u nich exprimován gen *XIST* (Okamoto *et al.*, 2011).

Uvedené studie mapující rozdíly v XCI u člověka a myši ukazují, že ačkoliv je myš využívána jako modelový systém pro výzkum XCI, nelze principy XCI objevené na myším modelu jednoduše extrapolovat na XCI u člověka. Tato skutečnost značně komplikuje i výzkum syndromů včetně TS, jenž s procesem XCI úzce souvisí (viz dále). Nevhodnost myšího modelu lze dokumentovat na příkladu genu *Tsix* (*TSIX*), ve kterém v průběhu evoluce došlo ke změnám, jež mu znemožňují fungovat jako regulátor exprese genu *XIST*. Dosud nezodpovězenou otázkou zůstává, zda zkrácení genu *TSIX*, které vedlo k ztrátě funkce RNA *TSIX* v XCI, způsobilo sekundárně změnu strategie XCI do podoby náhodné volby chromozómu X, který podstoupí aktivaci. Je rovněž možné, že u člověka náhodná XCI přispěla k nižšímu selekčnímu tlaku na gen *TSIX*, a proto mohlo dojít k deleci jeho 5'konce.

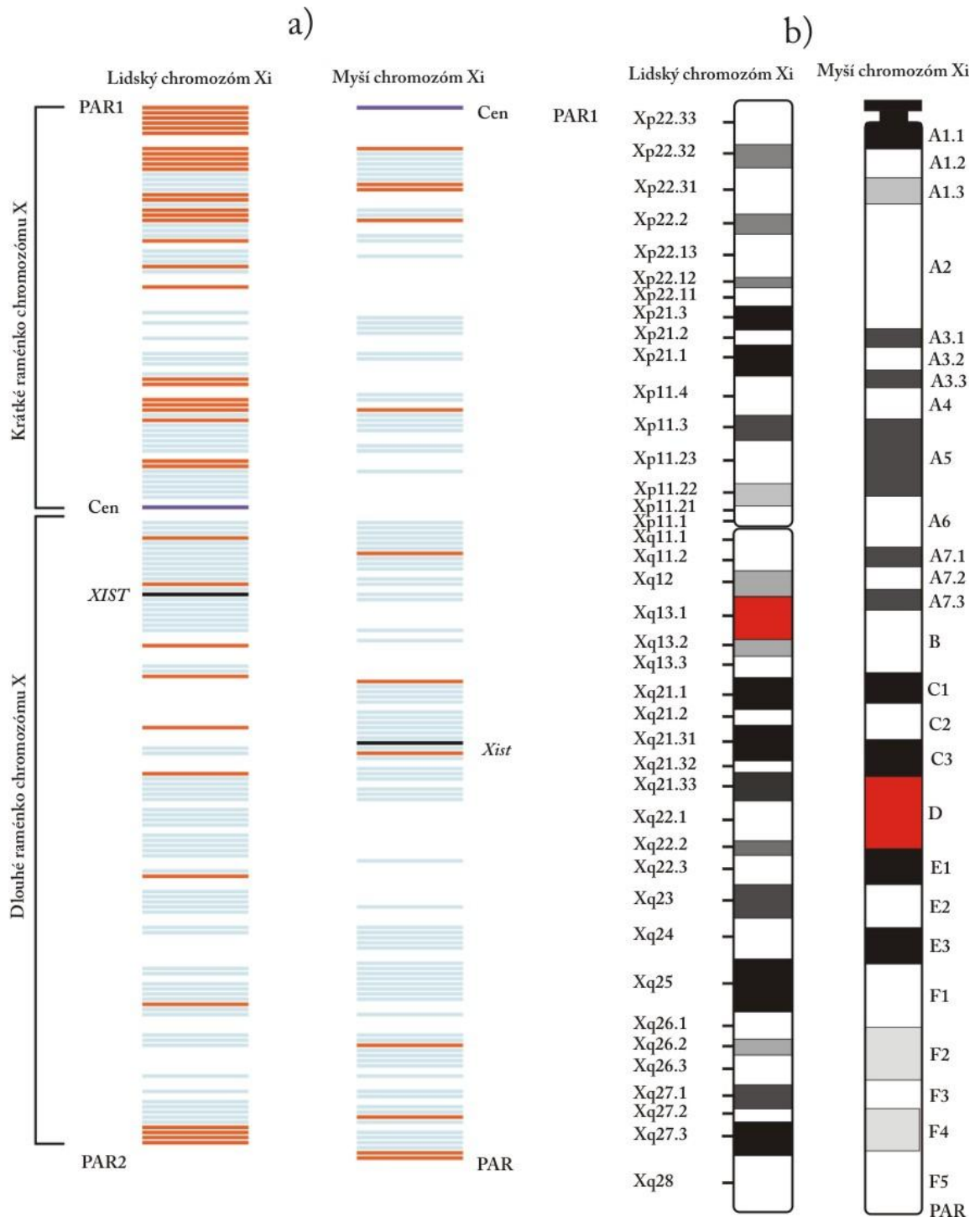
7. Geny unikající inaktivaci chromozómu X

Z lidského inaktivního chromozómu X uniká procesu XCI přibližně 15 % genů (Carrel a Willard, 2005). Situace se liší u myších samic, kde procesu XCI uniká pouze 3,3 % genů (viz obr. 4) (Yang *et al.*, 2010). Geny, které unikají procesu XCI, mají odlišnou lokalizaci na chromozómu X u člověka a u myši.

U člověka jsou geny, které unikají XCI, soustředěny do klastrů a většina je lokalizována v distální části krátkého raménka chromozómu X, což je v oblasti nejvíce homologní s chromozómem Y (Disteche, 1999; Carrel a Willard, 2005). Důvodem této specifické lokalizace genů unikajících procesu XCI je, že XIC je separováno od krátkého raménka centromerou. Centromerický heterochromatin poskytuje bariéru proti šíření XIST na krátké raménko. U myši, kde je centromera lokalizována na konci chromozómu X (myší chromozóm X je telocentrický), nic nebrání rozšíření Xist podél chromozómu X.

U člověka okolo 10 % genů vykazuje variabilní únik z XCI v závislosti na buněčném typu a tkáni. Rozdíly mohou být i individuální (Carrel a Willard, 1999; 2005). Pokud se frekvence genů unikajících z XCI liší v rámci populace, mohla by se lišit i závažnost fenotypových projevů TS. Vzhledem k tomu, že kardiovaskulární či renální problémy nejsou diagnostikovány u všech pacientek s TS, je možné, že právě kritický gen zodpovídající za tento projev vykazuje variabilní únik. Bylo by zajímavé zjistit, zda environmentální faktory ovlivňují variabilitu úniku genů, a tudíž i projevy TS.

U myši se situace liší, geny unikající XCI nejsou soustředěny do rozsáhlých domén jako u člověka. Myši s karyotypem 39,X mají méně závažné fenotypové projevy než ženy s TS. Abnormální fenotyp u myši s karyotypem X0 zahrnuje mírný deficit v chování, mírnou redukci fertility a postnatální růstovou retardaci. Abnormální fenotypové projevy u myši X0 jsou způsobeny haploinsuficí genů, které unikají procesu XCI (Yang *et al.*, 2010).



Obr. 4: a) Distribuce genů na chromozómu X, které unikají procesu XCI u myši a člověka. Geny, které podléhají procesu XCI, jsou označeny modře. Geny, které unikají XCI, jsou označeny oranžově. Na první pohled je vidět, že u člověka uniká více genů. Tyto geny jsou často součástí klastrů, většina je lokalizována v oblasti PAR1 (pseudoautozomální oblasti 1). U myši geny, které unikají procesu XCI, jsou roztroušené. Pozice centromery (fialový proužek) se liší u myši a člověka. Pozice *Xic*, které kóduje *XIST/Xist* je označena černým proužkem. Obrázek b) schematické znázornění lidského a myšího chromozómu X obarvené G-pruhováním. Zleva je schéma lidského a zprava myšího chromozómu X barveného G-pruhováním. Gen *XIST* se u člověka vyskytuje v oblasti Xq13.1 u myši, se gen *Xist* nachází v oblasti XD (červeně označené proužky). PAR1 označuje pseudoautozomální oblast 1. Vlastní obrázek s využitím Berletch et al. (2010).

| Geny unikající XCI u myši | lidský ortolog myšního genu | expresní stav u člověka |
|---------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| <i>Xist</i> | <i>XIST</i> | ano |
| <i>Mid1</i> | <i>MID1</i> | ano |
| <i>6720401G13Rik</i> | - | - |
| <i>Kdm6a</i> | <i>KDM6A</i> | ano |
| <i>2610029G23Rik</i> | <i>CXorf26</i> | ne |
| <i>Eif2s3x</i> | <i>EIF2S3</i> | ano |
| <i>Ddx3x</i> | <i>DDX3X</i> | ano |
| <i>Shroom4</i> | <i>SHROOM4</i> | ne |
| <i>BC022960</i> | - | - |
| <i>Kdm5c</i> | <i>KDM5C</i> | ano |
| <i>Car5b</i> | <i>CA5B</i> | ano |
| <i>Bgn 4</i> | <i>BGN</i> | ne |
| <i>1810030007Rik</i> | <i>CXorf38</i> | ano |

Tabulka 1: Přehled genů, které u myši unikají XCI. Pokud je gen exprimován u člověka (ano), pokud je inaktivován (ne). 6720401G13Rik kóduje nepřekládanou RNA. Ddx3x, Shroom4, Car5b, a 2610029G23Rik byly silně exprimovány z inaktivního chromozómu X. Funkce genů je popsána v textu. Převzato a upraveno podle Yang et al. (2010).

U myši je 380 genů na chromozómu X inaktivováno a 13 genů uniká procesu XCI. Z toho *Shroom4*, *Car5b*, a *2610029G23Rik* jsou výrazně exprimovány z inaktivního chromozómu X a právě jejich nepřítomnost u myši s karyotypem 39,X by mohla způsobit abnormální fenotyp.

Nepřítomnost *Shroom4* u myši způsobuje deficit v chování, zahrnující úzkost a abnormální reakci na nebezpečí. *Shroom4* kóduje protein SHROOM, který patří do rodiny proteinů interagujících s aktinovými filamenty a je navíc zapojen v procesu neurulace. Mutace v *SHROOM4* je u člověka spojena s X-vázanou mentální retardací (Yang et al., 2010).

Ddx3X kóduje RNA helikázu a podílí se na imunitní odpovědi na virovou infekci. U žen s TS se často manifestují různá autoimunitní onemocnění, ale u myších samic s karyotypem 39,X nebyla žádná autoimunitní onemocnění registrována (Yang et al., 2010).

Carb5 kóduje karbonát anhydrázu lokalizovanou v mitochondriích. Vzhledem k tomu, že srdce patří mezi orgány bohaté na buňky s vysokým obsahem mitochondrií, deficit v tomto genu by mohl vést ke kardiovaskulárním problémům (u myši X0 se nevyskytují) (Yang et al., 2010).

Díky tomu, že některé geny mají svého ortologa u člověka, do budoucna by se měly charakterizovat kritické geny zodpovídající za fenotypové projevy u myši X0.

Podobně jako u člověka i u myši některé geny vykazují variabilní únik z XCI v závislosti na tkáni a vývojovém stádiu. Například gen *Mid1* byl v embryonálních buňkách inaktivován, v diferencovaných buňkách unikl z procesu XCI. Naopak gen *Shroom4* v embryonálních buňkách byl exprimován, v diferencovaných buňkách byl transkripčně umlčen (Yang et al., 2010).

8. Fenotypové projevy Turnerova syndromu a jejich molekulární podstata – geny „rezistentní“ k inaktivaci chromozómu X

V předcházející kapitole bylo zmíněno, že 15 % genů uniká inaktivaci chromozómu X. Právě tyto geny, jež jsou na inaktivním chromozómu X aktivní, by mohly zodpovídat za některé fenotypové projevy asociované s Turnerovým syndromem. Následující podkapitolu věnuji majoritnímu fenotypovému projevu – malé postavě a její příčině na molekulární úrovni. V dalších podkapitolách shrnu dosavadní poznatky týkající se genů, o kterých je předpokládáno, že mají souvislost s TS.

8.1 Malá postava a kostní odchylky a gen *SHOX*

Velmi nápadným projevem TS je růstová porucha a s ní asociovaná malá postava, popřípadě různé kostní odchylky, zahrnující mimo jiné i postižení sluchového aparátu. Dnes již víme, že za většinu těchto abnormalit může haploinsuficience genu *SHOX* (viz dále) (Rao *et al.*, 1997; Ellison *et al.*, 1997).

Růstová abnormalita je patrná již v prenatalní fázi a přetrvává i po narození. Nejvýraznější rozdíly ve výšce mezi zdravými děvčaty a děvčaty postiženými TS pozorujeme v období puberty, kdy se u dívek postižených TS vyskytuje absence adolescentního spurtu (shrnuto v Stratakis a Rennert, 1994). V důsledku toho je pacientka trpící Turnerovým syndromem přibližně o 20 cm nižší, než je průměrná výška zdravé ženy srovnatelné etnické skupiny a věku (shrnuto v Ranke a Saenger, 2001).

Pacientky s TS vykazují kromě malé postavy i různé kostní odchylky. Typicky se u nich objevuje disproporcionální růst kostí končetin, v důsledku čehož mají abnormální poměr horního a spodního kostního segmentu. Některé kostní anomálie, jako jsou Madelungovy deformity předloktí, cubitus valgus, genu valgum (zakřivení kostí holenních neboli nohy do X) jsou totožné s Léri - Weilovým syndromem (LWS). Pacientky mohou též trpět skoliózou či hypoplazií krčních obratlů (shrnuto v Sybert a McCauley, 2004).

S delecí genu *SHOX* souvisí i odlišný tvar horní a dolní čelisti, sluchových kůstek a zevního zvukovodu, jenž se v dětství manifestuje jako často se vracející záněty středního ucha. V dospělosti mohou tyto abnormality vést až ke ztrátě sluchu (shrnuto v Sybert a McCauley, 2004).

Již dřívější studie ukázaly, že delece krátkého raménka chromozómu X je téměř vždy asociována s malou postavou (Ballabio *et al.*, 1989). Ogata a spol. upřesnili polohu hledaného genu do PAR1 (PAR1 z angl. pseudoautosomal region 1) (Ogata *et al.*, 1992).

O identifikaci kritického genu se zasloužily v roce 1997 nezávisle dvě skupiny: Raova skupina a Ellisnova skupina (Ellison *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 1997).

Ellisnova skupina izolovala gen *PHOG* (z angl. pseudoautosomal homeobox-containing osteogenic gene), podle Rao *et al.* (1997) *SHOX* (z angl. short stature homeobox – containing gene,

tato zkratka je využívána dodnes) z oblasti PAR1 pohlavních chromozomů, konkrétně z Xp22.3 a Yp11.3.

Tento gen má předpokládané vlastnosti hlavního regulátora růstu: uniká XCI, je exprimován během embryonálního vývoje, je vysoce sekvenčně konzervován u řady živočišných druhů (viz tabulka 2), jeho ztráta nebo mutace je asociovaná s LWS, TS, či popřípadě idiopatickou krátkou postavou. Naopak zvýšená exprese genu *PHOG* je asociovaná s nadměrně vysokou postavou (Rao *et al.*, 1997; Ellison *et al.*, 1997).

Naopak zvýšená exprese genu *SHOX/PHOG* je asociovaná s nadměrně vysokou postavou (Rao *et al.*, 1997; Ellison *et al.*, 1997).

Clement-Jones a spol. prokázali, že haploinsuficience genu *SHOX* zodpovídá i za další kosterní abnormality u pacientek s TS. Lokalizovali silnou expresi genu *SHOX* ve střední části končetin plodu a částečně v koleni, lokti, kosti loketní, vřetenní, zápěstní a v prvním i druhém faryngeálním oblouku. Vyvodili z této skutečnosti, že za malformace a kostní odchylky u pacientek s TS by mohla být zodpovědná nedostatečná exprese genu *SHOX* v příslušných oblastech. Současně skupina prokázala, že gen *SHOX* nehraje roli ve vývoji somatických rysů, které nesouvisí s kostrou (Clement-Jones *et al.*, 2000).

8.1.1 Struktura genu *SHOX* a jeho regulace

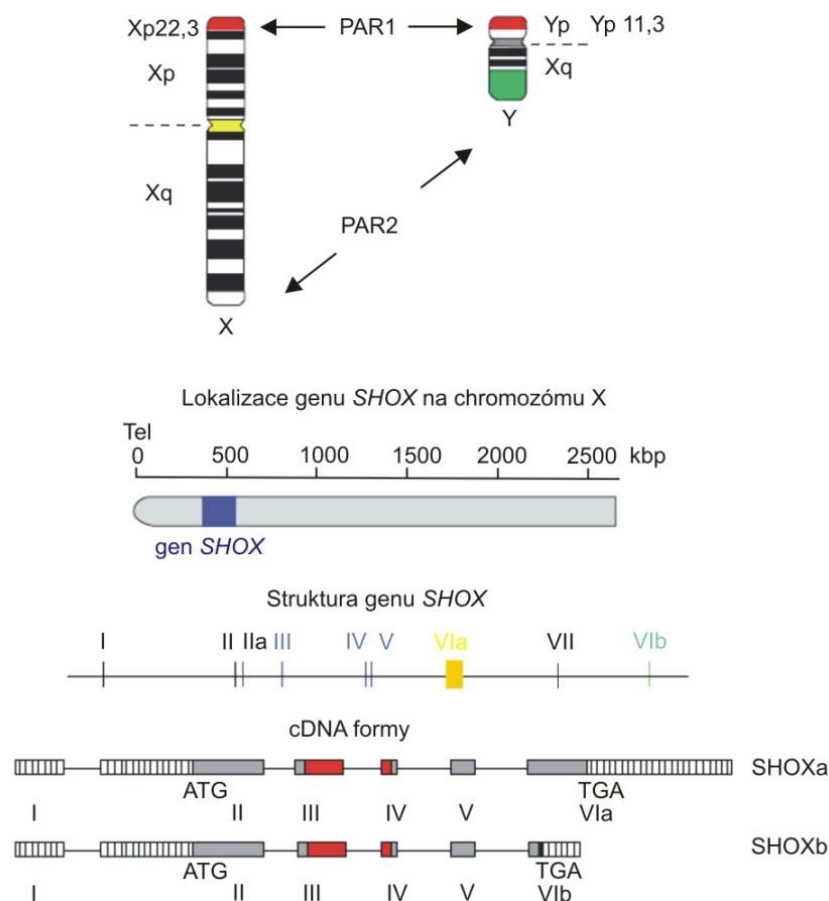
Gen *SHOX* kóduje transkripční faktor, jenž je ve vysoké koncentraci exprimován v osteogenních buňkách. *SHOX* patří mezi transkripční faktory kódující homeodoménu o velikosti 60 AK, která slouží jako DNA vazebná doména a váže se do palindromatické sekvence 5'-TAAT(N)_nATTA-3' (Rao *et al.*, 2001). Gen *SHOX* se skládá z devíti exonů (I, II, IIa, III, IV, V, VIa a VIb, VII). Exon I je nekódující. V exonu III a IV je lokalizována homeodoména (viz obr. 5) (Durand *et al.*, 2011).

Gen *SHOX* podstupuje alternativní sestřih, jehož výsledkem je 7 mRNA, z nichž nejdůležitější jsou *SHOXa* (1 870 bp) a *SHOXb* (1 349 bp). Oba tyto transkripty jsou identické na svém 5' konci, ale jsou rozdílné na svém 3' konci, respektive v exonu VI. Tyto dvě mRNA jsou následně translatovány do proteinu o velikosti 292 AK (*SHOXa*) a 225 AK (*SHOXb*). *SHOXa* se od *SHOXb* liší přítomností C terminální domény, která zahrnuje i motiv OAR o velikosti 14 AK (Rao *et al.*, 1997). Tato doména spolu s homeodoménou zodpovídají za transkripční funkci *SHOX*. *SHOXb* kvůli absenci C terminální domény nemůže působit jako transkripční aktivátor, ale mohl by působit jako modulátor aktivity *SHOXa*. Další atraktivní kandidát pro regulaci aktivity *SHOXa* by mohl být *SHOX2* (viz dále) (Rao *et al.*, 2001). Alternativní sestřih, zahrnující exon IIa, vede k posunu čtecího rámce a vzniku transkriptu s předčasným stop kodónem v exonu III. Předpokládá se, že tento transkript není přepisován do proteinu a podléhá degradaci. Exon IIa je přítomen jen u savců. V závislosti na místě sestřihu může být exon VII zahrnut do 3 sestřihových variant mRNA. První

varianta (VII-1) vzniká sestřihem na 3'konci exonu VIa, který nezpůsobuje terminaci transkripce, a proto dochází k prodloužení 3'nepřekládané oblasti (UTR – angl. untranslated region). U druhé a třetí sestřihové varianty (VII-2 a VII-3) je exon VII připojen k exonu V (varianty se mezi sebou liší na 5'konci exonu VII). Těmto variantám chybí exon VI a neobsahují OAR doménu. Uplatňují se pravděpodobně v regulaci exprese SHOXa podobně jako SHOXb. Jsou exprimovány v embryonálních tkáních neurálního původu. Transkripty, zahrnující exon VII v jeho různých sestřihových variantách, unikají pravděpodobně degradaci a jsou přepisovány do proteinu. Obecně 3'UTR genu jsou cílem miRNA, které zprostředkovávají posttranskripční genové umlčení. Sestřihové varianty zahrnující exon VII prodlužují 3'UTR, a mohou tak poskytnout další vazebná místa pro miRNA a ovlivnit expresi *SHOX* (Durand *et al.*, 2011).

SHOX funguje jako transkripční faktor, a musí být proto transportován do jádra přes jaderný pór za pomoci jaderného lokalizačního signálu, který se nachází uvnitř homeodomény a skládá se z 5 AK - AKCRK (Sabherwal *et al.*, 2004).

Fosforylace je obecný mechanismus, který slouží k regulaci aktivity mnoha transkripčních faktorů. Fosforylace má vliv i na stabilitu, lokalizaci proteinu, vazbu proteinu na DNA a také na transaktivační potenciál daného proteinu. Kinázy, zodpovídající za fosforylaci rodiny proteinů, kódujících homeodoménu jsou: protein kináza A a C a kasein kináza II (CKII). I aktivita SHOX, který patří do rodiny TF kódujících homeodoménu, je závislá na fosforylaci. Za tuto fosforylaci zodpovídá kasein kináza II. Majoritní místo na proteinu SHOX, podléhající fosforylaci, je v oblasti Ser106, který je součástí motivu SEDE a nachází se 11 AK od homeodomény blíže k N konci proteinu. Fosforylace nemá vliv na jadernou lokalizaci ani DNA vazebnou schopnost homeodomény (Marchini *et al.*, 2006).



Obr. 5: Poloha genu *SHOX* na chromozómu X a jeho struktura. Gen *SHOX* je lokalizován do PAR1. Struktura genu *SHOX* - římská čísla označují exony. Gen *SHOX* podstupuje alternativní sestřih, jehož výsledkem jsou primárně 2 mRNA (*SHOXa* *SHOXb*). Šrafované obdélníčky v cDNA formě - 5'UTR a 3'UTR a exon 1-nepřekládané oblasti. Červené obdélníčky značí umístění homeodomény. ATG start kodon. TGA stop kodon. Převzato a upraveno podle Oliveira et al. (2011).

SHOX může být exprimován ze dvou promotorů. Alternativní promotor genu *SHOX* (P2) se nachází v exonu II v blízkosti jeho 5' konce. Transkripty se od sebe liší pouze v 5'UTR oblasti bez změny sekvence proteinu. Rozdíl spočívá v tom, že jsou exprimovány s různou účinností. Transkript, který vzniká expresí z promotoru 1 (P1) vzniká s nižší frekvencí než transkript, který vzniká expresí z alternativního promotoru P2. Předpokládá se, že promotor P2 se pravděpodobně využívá ve chvíli, kdy je nutné rychle zvýšit hladinu proteinu *SHOX*, zatímco P1 slouží k udržení konstantní hladiny proteinu (Blaschke et al., 2003).

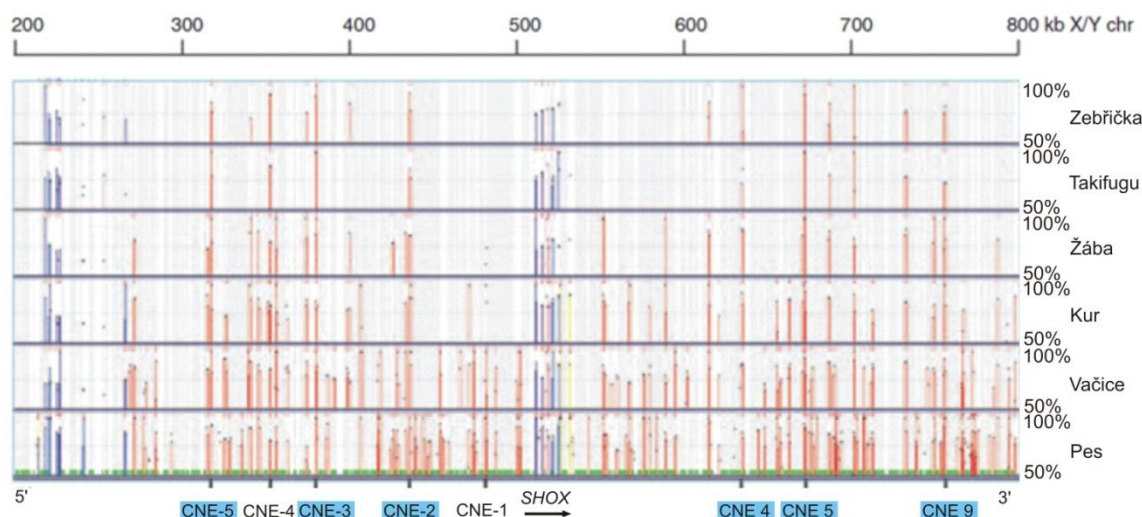
HOXA9 je první identifikovaný regulátor exprese genu *SHOX*, který se váže do AT bohaté palindromické sekvence promotoru 2 (P2). HOXA9 patří mezi rodinu proteinů kódovanou geny HOX a je zcela esenciální během vývoje končetin. Všechny proteiny HOX se vyznačují konzervovanou homeodoménou, která funguje jako DNA vazebná doména. Vazba HOX proteinu na DNA je doprovázena vazbou dalších kofaktorů. Dostupnost těchto kofaktorů závisí na buněčném prostředí a je předmětem prostorové a časové regulace. Díky těmto kofaktorům může HOXA9 fungovat jako represor i aktivátor. Doposud nebyly identifikovány kofaktory pro HOXA9, ale bylo

prokázáno, že HOXA9 fungoval v U2OS (lidská kostní nádorová buněčná linie) jako aktivátor exprese genu *SHOX*, ale v kuřecí embryonální tkáňové kultuře *Hoxa9* působil jako represor exprese genu *Shox* (Durand *et al.*, 2012).

Vývoj končetin během embryonálního vývoje je vysoce regulovaný proces. Existují dvě hlavní signalizační centra AER (z angl. apical ectodermal ridge) a ZPA (z angl. zone of polarizing activity). Tato centra sekretují signalizační molekuly v pupenech zárodku končetin. Mezi signalizační molekuly, produkované z AER, patří FGF (z angl. fibroblast growth factor), mezi signalizační molekuly, produkované ze ZPA, patří morfogen SHH (z angl. sonic hedgehog). V kuřecí embryonální tkáňové kultuře (chicken micromass cultures) bylo zjištěno, že exprese *Shox* je negativně regulována faktorem Fgf, ale nezávisí na Shh. Z toho lze usoudit, že exprese *Shox* (alespoň u kura) závisí na signalizaci z AER, ale ne na signalizaci ze ZPA (Durand *et al.*, 2012).

Expres *Shox* by mohla být negativně regulovaná na dvou úrovních: přímou vazbou HOXA9 do promotoru P2 a nepřímým způsobem pomocí signalizačních molekul produkovaných z AER (Durand *et al.*, 2012).

Sabherwal se spol. našli osm evolučně konzervovaných nekódujících DNA elementů (CNE-2 a 9 z angl. conserved non-coding elements), které leží v oblasti mezi 48 a 215 kb po směru transkripce od genu *SHOX* (viz obr. 6). Bylo potvrzeno, že tři z těchto DNA elementů (CNE-4,5 a 9) fungují jako enhancery genu *SHOX* (Sabherwal *et al.*, 2007). I oblast, která leží proti směru transkripce genu *SHOX*, obsahuje 4 evolučně konzervované nekódující elementy (viz obr. 6), z nichž 3 (CNE-2,3 a 5) také fungují jako enhancery (Durand *et al.*, 2009).



Obr. 6: Srovnávací genová analýza CNE v blízkosti genu *SHOX* a jejich umístění v rámci genomu. Konzervované kódující elementy jsou ukázány jako modré a žluté pruhy. Konzervované nekódující elementy jsou označeny jako červené pruhy. Výška pruhu odpovídá mezidruhové podobnosti. Šířka pruhu značí velikost konzervovaného elementu. Modrou barvou jsou zvýrazněny elementy s funkcí enhancerů. Převzato a upraveno podle Durand *et al.* (2009).

8.1.2 Příbuznost SHOX

Gen *SHOX* je blízce příbuzný lidskému genu *SHOX2* (alias *SHOT* z angl. *SHOX* Homologous gene on chromosome three). *SHOX2* leží v oblasti 3q25-26 chromozómu 3 (Blaschke *et al.*, 1998). *SHOX* nemá homologa u myši, avšak jemu příbuzný gen *SHOX2* má svůj myši protějšek *Og12x*. Gen *Og12x* leží v oblasti chromozómu 3. Pozoruhodné je, že ačkoliv gen *SHOX* nemá svůj protějšek u myši, má jej u kura domácího. Gen *SHOX* u kura domácího je lokalizovaný na chromozómu 1 a kóduje protein o velikosti 243 AK, který je sekvenčně podobný v celé své délce lidské variantě genu *SHOX* (94 % shoda) (Tiecke *et al.*, 2006). V tabulce 1 jsou shrnuty výsledky BLASTp analýzy u různých organizmů.

| protein | latinský název druhu | český název druhu | Počet AK | identita s SHOXa v % | shoda v délce v % |
|-------------------------|-------------------------------|-------------------|----------|----------------------|-------------------|
| SHOXb | <i>Homo sapiens</i> | člověk | 225 | 99 | 72 |
| SHOX | <i>Gorilla gorilla</i> | gorila nížinná | 292 | 100 | 100 |
| SHOX | <i>Saimiri boliviensis</i> | kotul amazonský | 294 | 100 | 92 |
| SHOX | <i>Otolemur Garnettii</i> | komba garnettová | 289 | 100 | 95 |
| SHOX | <i>Canis lupus familiaris</i> | pes domácí | 291 | 100 | 95 |
| SHOX isoforma1 | <i>Felis catus</i> | kočka domácí | 293 | 100 | 93 |
| SHOX isoforma2 | <i>Felis catus</i> | kočka domácí | 306 | 100 | 90 |
| SHOX | <i>Equus caballus</i> | kůň domácí | 97 | 32 | 90 |
| SHOX | <i>Bos taurus</i> | tůr domácí | 306 | 100 | 88 |
| SHOX | <i>Gallus gallus</i> | kur bankivský | 291 | 100 | 93 |
| SHOX | <i>Taeniopygia guttata</i> | zebřička pestrá | 291 | 100 | 92 |
| SHOX isoforma1 | <i>Danio Rerio</i> | dánio pruhované | 285 | 100 | 84 |
| SHOX2 isoforma a | <i>Homo sapiens</i> | člověk | 331 | 100 | 59 |
| SHOX2 isoforma b | <i>Homo sapiens</i> | člověk | 355 | 82 | 74 |
| SHOX2 isoforma c | <i>Homo sapiens</i> | člověk | 319 | 100 | 61 |
| SHOX2 | <i>Mus musculus</i> | myš domácí | 331 | 100 | 57 |

Tabulka 2: Srovnání aminokyselinové sekvence proteinu SHOXa z *Homo sapiens* s aminokyselinovou sekvencí příbuzných proteinů. Ze srovnání je patrné, že protein SHOX je u obratlovců konzervován. Výjimku tvoří myš, u níž se nevyskytuje ortolog genu *SHOX*. V pátém sloupci je uvedena podobnost proteinu s SHOXa, rozsah oblasti homologie je uveden v 6. sloupci. Primární sekvence proteinů jsou z databáze NCBI (dostupné z URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/proteins/>). Vytvořeno v NCBI BLASTp (2013).

Homology a ortology genu *SHOX* a *SHOX2*, jak už je patrné z tabulky 2, se vyskytují u různých obratlovců. Clement-Jones se svými kolegy provedl analýzu exprese *SHOX*, *SHOX2* a *Og12x* (myši ortolog genu *SHOX2*) v porovnatelných stadiích vývoje lidského a myšního embrya. Všechny 3 geny vykazují specifický expresní vzor. *Og12x* je exprimován pouze v centrálním nervovém systému (CNS), srdci, kraniofaciální tkáni, předních a zadních končetinách plodu. Naopak, exprese *SHOX* a *SHOX2* je prokázána v končetinách a faryngeálních obloucích. Při vývoji končetin je

z počátku *SHOX* exprimován v nediferencované mesenchymální tkáni. Síla jeho exprese roste při kondenzaci mesenchymu a diferenciaci chondroblastu v perichondriální vrstvě. *SHOX2* je exprimován primárně v pojivových tkáních a svalstvu. Při vývoji faryngeálních oblouků je *SHOX* exprimován primárně v mezodermálním jádře, zatímco *SHOX2* je silně exprimován ve vnější mezenchymální vrstvě (Clement-Jones *et al.*, 2000).

8.1.3 Geny regulované transkripčním faktorem SHOX

Během enchondrální osifikace dochází k proliferaci, maturaci chondrocytů a ty postupně hypertrofují a dochází u nich k indukci apoptózy. Postupně se vytváří sekundární osifikační jádro v růstových ploténkách, sloužící jako templát pro osteogenezi, při které je hypertrofující chrupavka postupně nahrazena kostí. Tento proces ovlivňuje mnoho hormonů, růstových a transkripčních faktorů, mezi které se řadí i *SHOX*. Nadměrná exprese *SHOX* v primárních fibroblastech, primárních chondrocytech a buněčné linii U2OS vede k zastavení buněčného cyklu a proliferace. *SHOX* reguluje rovnováhu mezi proliferací a apoptózou chondrocytů při růstu dlouhých kostí. To podporuje i skutečnost, že *SHOX* je silně exprimován v hypertrofujících chondrocytech růstových plotének, což vede k zastavení jejich proliferace a indukuje u nich apoptózu, celkově tak podporuje osteogenezi (Marchini *et al.*, 2004).

Cílem TF *SHOX* je gen *NPPB*. *SHOX* se váže do jeho promotoru do palindromické sekvence TAATGATAATTA a pozitivně reguluje jeho expresi. Substituce Ser106 alaninem vede k omezení schopnosti *SHOX* působit jako transkripční aktivátor, a proto zmíněná mutace vedla k neschopnosti *SHOX* indukovat expresi *NPPB*. Gen *NPPB* kóduje BNP (z angl. brain natriuretic peptide) (Marchini *et al.*, 2007). BNP byla až donedávna přisuzována kardiovaskulární funkce kvůli jeho vazodilatačním a diuretickým vlastnostem. Díky těmto schopnostem je využíván jako peptidový hormonální lék pro léčbu srdečního selhání (Bettencourt *et al.*, 2002). V poslední době se předpokládá, že BNP a jeho receptor NPR (z angl. natriuretic peptide receptor) hrají také roli v enchondrální osifikaci. *SHOX* a *NPPB* jsou koexprimovány v proliferaujících a hypertrofujících chondrocytech a předpokládá se, že se uplatňují v maturaci chondrocytů (Marchini *et al.*, 2007).

Dalším cílem TF *SHOX* je gen *FGFR3* (z angl. fibroblast growth factor receptor gene). V závislosti na buněčném typu je *SHOX* schopen působit jako represor nebo aktivátor exprese genu *FGFR3*. Podobně jako u jiných TF, i u *SHOX* rozhoduje dostupnost kofaktorů v různých tkáních o tom, jestli bude fungovat jako represor nebo aktivátor. Doposud tyto kofaktory pro *SHOX* nebyly identifikovány a tato skutečnost brání komplexnímu porozumění regulace exprese *FGFR3* závislé na *SHOX*. Zcela pro nás směrodatná je skutečnost, že *SHOX* působí jako represor exprese genu *FGFR3* právě v kuřecí embryonální tkáňové kultuře, neboť ta slouží jako *in vitro* modelový systém, ve kterém lze simulovat procesy, vyskytující se během enchondrální osifikace při vývoji končetin. Na rozdíl od myši, u kura domácího je přítomen gen *Shox* (viz výše). Gen *FGFR3* má zcela zásadní roli během

vývoje končetin plodu. Produkt genu *FGFR3* inhibuje proliferaci a naopak stimuluje diferenciaci chondrocytů a působí jako negativní regulátor postnatálního růstu. V přítomnosti TF SHOX je hladina *FGFR3* snížena, což umožňuje prodlužování kostí. U žen s TS kvůli haploinsuficienci genu *SHOX*, je hladina SHOX snížena, což způsobuje vyšší hladinu *FGFR3* a tedy i malou postavu. Glaser a spol. prokázali, že SHOX2 není schopen regulovat expresi *FGFR3* (Glaser *et al.*, 2011).

SHOX interaguje i s TF SOX5 a SOX6, které pak spolu se SOX9 regulují chondrogenezi. SHOX kooperuje se SOX5/SOX6 a SOX9 v aktivaci enhanceru genu *Agc1* (Aza-Carmona *et al.*, 2011). *Agc1(AGC1)* je gen kódující Aggrecan – proteoglykan, vyskytující se v chrupavce a zodpovídající za její pevnost. Za produkci proteoglykanu a kolagenu typu II, které jsou součástí mezibuněčné matrix, zodpovídají samotné chondrocyty. Diferenciace chondrocytů z mezenchymálních buněk je doprovázena zvýšenou expresí *AGC1* a *COL2A1* (kóduje kolagen typu II), ale i dalších genů, kódujících komponenty mezibuněčné matrix (Han *et al.*, 2008).

8.2 Další geny zapojené do Turnerova syndromu

Zcela nejprozkoumanější fenotypový projev TS je malá postava a další kostní abnormality. Korelace mezi dalšími fenotypovými projevy TS (gonadální dysgenezí, kardiovaskulárními, renálními problémy a problémy asociovaným s dysfunkcí lymfatického systému) a genetickým faktorem, který by za ně zodpovídal, je podložena jen několika málo publikacemi. Existují sice studie (viz dále), jež navrhly geny zapojené alespoň do některých fenotypových projevů, ale tyto studie nebyly nadále rozvíjeny.

Na základě studií pacientek s delecemi krátkého raménka byly odhaleny kritické oblasti, kde by se geny mohly nacházet. Ale jen těžko lze rozhodnout, zda geny přítomné v oblasti delece jsou primárně zodpovědné za abnormální fenotyp. Je totiž možné, že nepřítomnost kandidátního genu např. v nějaké regulační kaskádě způsobí nedostatek klíčové komponenty (nejspíš proteinu) a sekundárně se rozvine daný fenotyp.

8.2.1 Gonadální dysgeneze

Jedním z dalších majoritních fenotypových znaků, s kterými se setkáváme u pacientek s TS, je gonadální dysgeneze. V raném vývoji jsou ovaria až do 3 měsíců života plodu normální a zcela nerozlišitelná od ovarii zdravého plodu. Od 3 měsíců primordiální folikuly podstupují předčasnou apoptózu a v dospělosti chybí. Struktura kůry ovarii se následně fibroticky mění za vzniku „streak“ gonády. Po narození děvčátka s TS mohou mít ovaria různou morfologickou podobu v závislosti na jejich karyotypu. Ovaria mohou obsahovat fibrotickou tkáň bez zárodečných buněk (u pacientek s monozómií chromozómu X), zbytky normální ovarialní tkáně nebo mít zcela normální histologickou stavbu (u pacientek s chromozomální mozaikou). Gonadální dysfunkce se projevuje nadměrnou

sekrecí LH (z angl. luteinizing hormone) a FSH (z angl. follicle-stimulating hormone) (shrnutí v Sybert a McCauley, 2004).

Jako jeden z kandidátních genů, zapojených v gonadální dysgenezi u pacientek s TS, byl navržen gen *USP9X* (z angl. ubiquitin specific peptidase 9, X-linked), alias *DFFRX*. Tento gen byl původně identifikován jako ortolog drozofilího genu *faf* (z angl. fat facets). Gen *faf* je členem rodiny deubiquitinačních genů, jejichž produkty zodpovídají za odstranění ubiquitin z ubiquitin konjugučního enzymu (E3, ubiquitinproteineligasa). U drozofily je tento gen nezbytný pro normální oogenezi a současně hraje roli ve vzniku fotoreceptorů při vývoji oka. Mutace v genu *faf* u drozofily může mimo jiné vést k selhání ve vývoji oocyty. Lidský ortolog genu *faf* je lokalizován na chromozómu X v oblasti Xp11.4 a má svého homologa na Y chromozómu (*DFFRY*) v oblasti Yq11.2. Gen *USP9X* uniká procesu XCI (Jones *et al.*, 1996).

V roce 1998 James a spol. zjistili v rámci své práce o fenotypových projevech pacientek s delecí krátkého raménka chromozómu X, že gen *USP9X* nejspíš nehraje roli v ovarialním selhání u pacientek s TS. James a spol. testovali 11 pacientek se zlomem chromozómu X v proximální části chromozómu X na přítomnost genu *USP9X*. Pět pacientek z jedenácti mělo normální ovarialní funkci a mělo zachované obě alely genu *USP9X*. Dvě pacientky z šesti, které měly jen jednu kopii genu *USP9X*, měly přesto normální ovarialní funkce. Je možné, že ačkoliv pacientky nebyly podle vyšetření krve mozaiky, mohly mít 46,XX buněčnou linii v ovarích a díky tomu mohly mít normální ovarialní funkce (James *et al.*, 1998).

Gen *faf* má u myši 2 ortology. Na chromozómu X se jedná o gen *Usp9x* (*Dffrx*) a na chromozómu Y o gen *Usp9y* (*Dffry*). V myším sekundárním folikulu byla zjištěna exprese *Usp9x* a jeho produkt byl ve vysoké koncentraci akumulován v cytoplazmě Graffova folikulu u dospělých samic (Noma *et al.*, 2002). Stále chybí odhalit mechanismus působení produktu (proteinu/RNA) genu *Usp9x* a poté tuto skutečnost extrapolovat na člověka.

Gen *UBAI* (z angl. ubiquitin-like modifier activating enzyme 1), alias *AIS9T*, je gen, který je lokalizován do Xp11 a uniká procesu XCI. I tento gen by mohl být zapojen v ovarialním selhání (Brown a Willard, 1990).

8.2.2 Gen ZFX – gonadální selhání a malá postava

Gen *ZFX* je mapován do oblasti Xp21.3-Xp22.1 (Schneider-Gädicke *et al.*, 1989). Gen *ZFX* kóduje transkripční aktivátor. Na svém C konci má 13 AK motiv zinkového prstu skládající se z nepřerušenoého řetězce Cys-Cys/His-His. N konec proteinu tvoří aktivační doména, která se skládá z kyselých AK (Luoh *et al.*, 1997). Gen *ZFX* má svého homologa na chromozómu Y (*ZFY*) a uniká XCI (Schneider-Gädicke *et al.*, 1989). Expres genů *ZFX/ZFY* není tkáňově specifická. Gen *Zfx* najdeme i u myši, ale zde podléhá inaktivaci chromozómu X. I u myši existuje Y-vázaný homolog

genu *Zfx*. Exprese *Zfy* je u dospělých myši omezena na testes. Exprese *Zfx* není omezena pouze na embryonální tkáň ale i na diferencované buněčné typy (Adler *et al.*, 1997).

Myši samice s mutací v genu *Zfx* měly nižší životaschopnost, byly drobnější a v neposlední řadě měly omezenou fertilitu v důsledku snížení počtu germinálních buněk oproti normálním samicím. Předpokládá se, že normální funkce *Zfx* je zcela esenciální pro růst epiblastu, z kterého jsou odvozeny i primordiální germinální buňky. Pokud není přítomen funkční *Zfx*, klesá množství primordiálních germinálních buněk a vzniká tak i nižší počet germinálních buněk a samice mají omezenou fertilitu. Současně epiblast dává vzniknout vlastnímu embryu, a pokud je omezena jeho proliferace v důsledku deficitu *Zfx*, novorozená mláďata jsou menší (Luoh *et al.*, 1997).

Myši model *Zfx* *-/-* nastínil, že gen *ZFX* by mohl být důležitý genetický faktor, jenž při své nepřítomnosti přispívá ke gonadální dysgenezi a k malé postavě. Problematika nebyla v dalších studiích dále rozvíjena a chybí studie u člověka.

8.2.3 Gen *RPS4X*

Lidský ribozom se skládá ze 4 RNA a z 80 různých proteinů. Gen *RPS4X* je X-vázaný a kóduje protein o velikosti 263 AK, jenž je součástí malé podjednotky ribozomu (40S). Gen má svého Y-vázaného homologa *RPS4Y*, který se od *RPS4X* liší 19 AK. *RPS4X* uniká procesu XCI. U lidí je normální embryonální vývoj závislý na přítomnosti dvou kopií genu *RPS4*. Myši ortolog lidského *RPS4X* se nachází na chromozómu X a nemá svého Y-vázaného homologa. U myši tento gen podstupuje XCI. Dle této studie je předpokládáno, že dvě kopie genu *RPS4* jsou nezbytné pro raný embryonální vývoj v době, kdy ribozomální syntéza je nejvyšší. Nepřítomnost dvou kopií může být příčinou letality spojené s monozómií chromozómu X (Zinn *et al.*, 1994).

8.2.4. Problémy asociované s lymfatickým systémem a další fenotypové projevy TS

Abnormální vývoj lymfatického systému a následně porucha jeho komunikace s cévním řečištěm je jedním z dalších typických rysů spojovaných s Turnerovým syndromem. Zcela nejzávažnějším poškozením, jež zodpovídá za většinu spontánních potratů, je právě obstrukce na úrovni lymfatojugulárního spojení, které zodpovídá za odvod lymfy do venózního systému. V případě obstrukce se lymfa hromadí v zadních a bočních oblastech krku a obličjeje za vzniku hygroma colli cystikum (cystický hygrom, zvláštní forma cystického lymfagiomu, nezhoubný nádor z rozšířených mízních cév). V důsledku obstrukce mízních cév se u pacientek setkáváme postnatálně s pterygium colli, volnou kůží (převážně po stranách a vzadu na krku), otoky nohou a rukou, abnormálními tvary a posazením ušních boltců, dysplazií nebo dokonce absencí nehtů. Za šilhání a ptózu víček mohou edémy periokulární oblasti (Shrnuto v Stratakis a Rennert., 1994).

Jako kritická oblast, zodpovědná za fenotypový projev související s lymfatickým systémem, byla označena oblast Xp11.4. Nalezení kandidátního genu komplikuje i skutečnost, že tento gen bude pravděpodobně vykazovat neúplnou penetranci a variabilní expresivitu (pacientky se liší závažností fenotypového projevu, u některých se poškození lymfatického oběhu neobjevuje vůbec). Závažnější fenotypové projevy související s lymfatickým systémem se objevovaly u pacientek, jež měly monozómii než, u pacientek s delecí oblasti Xp11. Další geny by mohly sídlit na jiném místě Xp nebo dokonce na Xq (Boucher *et al.*, 2001).

Co se týká kardiovaskulárních a renálních problémů, které jsou pozorované u pacientek s TS, doposud nebyla identifikována příčina těchto fenotypových projevů.

9. Závěr

Z výsledků mé literární rešerše plyne, že příčinou fenotypových projevů Turnerova syndromu je haploinsuficience X-vázaných genů, které u normálních žen unikají procesu inaktivace chromozómu X, XCI.

Karyotyp žen s Turnerovým syndromem nezahrnuje pouze monozómii chromozómu X ale i mozaikový karyotyp, izochromozóm X nebo ring chromozóm X. Překvapivé je, že ačkoliv u pacientek s ring chromozómem je pozorována mentální retardace v důsledku funkční disomie genů lokalizovaných na chromozómu X, s podobným kognitivním fenotypem se u pacientek s TS nesetkáváme.

Ačkoli kompenzace genové dávky u homogametického pohlaví (obsahující dva gonozómy XX) je esenciální pro jejich život, její principy, molekulární mechanismus ale i načasování jsou značně variabilní. Na příkladu myši, králíka, vačnatců a člověka byly představeny tři odlišné mechanismy XCI. U myši je udržen přednostně inaktivovaný paternální chromozóm X až do fáze rané blastocysty, kde poté dochází ve vnitřní buněčné mase k reaktivaci paternálního chromozómu X a je spuštěna druhá vlna XCI. Ta je tentokrát náhodná (maternální i paternální chromozóm X mají stejnou pravděpodobnost být inaktivovány). V trofoektodermu a primitivním entodermu je inaktivace paternálního chromozómu X udržena. U vačnatců je přednostně inaktivovaný paternální chromozóm X, ale naopak u člověka a králíka dochází k náhodné inaktivaci chromozómu X. Navíc je u nich proces XCI spuštěn v pozdějším vývojovém stadiu než u myši, která spouští expresi *Xist* již v dvoubuněčném stádiu.

Pomocí myších experimentálních modelů byly detailně popsány molekulární mechanismy inaktivace chromozómu X (XCI) v samičích buňkách. U člověka je však XCI v některých aspektech molekulárních mechanismů značně odlišná. Transkript lidského genu *TSIX*, ortologu myšičího *Tsix*, je výrazně zkrácený na svém 5'konci, a proto nemůže fungovat jako hlavní negativní regulátor genu *XIST*. U člověka oproti myši navíc neexistují ani pozitivní regulátory exprese genu *TSIX*. Rovněž nebyla doposud odhalena role RNF12 a pluripotentních faktorů v procesu XCI.

Zcela zásadním pro vysvětlení odlišnosti v iniciaci XCI u člověka a myši se jeví nedávný objev nekódující RNA *XACT*, která u člověka obaluje aktivní chromozóm X a mohla by být klíčovým regulátorem exprese genu *XIST*. U myši gen *Xact* chybí. Naopak u vačnatců nacházíme další nekódující RNA *Rsx*, která indukuje transkripční umlčení chromozómu X. Za uvážení by stálo, zda se gen *Rsx* nachází i u placentárních savců a pokud ano, zda má funkci v procesu inaktivace.

Rozdíly v procesu inaktivace chromozómu X (ať už v načasování, v mechanismu, nebo v regulaci) nás utvrzují v tom, že myš není vhodný modelový organizmus pro studium XCI a Turnerova syndromu, který s tímto procesem úzce souvisí. V budoucnu by se mělo věnovat úsilí na nalezení vhodnějšího modelového systému. Za úvahu by stál například králík, u kterého podobně jako u člověka dochází k náhodnému způsobu inaktivace.

Navíc u člověka uniká procesu inaktivace chromozómu X okolo 15 % genů, zatímco u myši pouze cca 3 % genů. Tento markantní rozdíl v počtu genů na chromozómu X je pravděpodobnou příčinou mnohem mírnějších fenotypových projevů u myši s karyotypem 39,X, oproti ženám s karyotypem 45,X. Navíc u člověka přibližně 10 % genů vykazuje variabilní únik v závislosti na buněčném typu tkání ale i v rámci žen. Tato variabilita by se v budoucnu měla studovat ve vztahu k environmentálním faktorům. Výsledky takových studií by se daly využít ve prospěch léčby syndromů souvisejících s epigenetickou regulací, včetně Turnerova syndromu.

Zcela majoritním fenotypovým projevem Turnerova syndromu je malá postava a kosterní abnormality s ní asociované. Za tento projev zodpovídá gen *SHOX*, který uniká inaktivaci chromozómu X u zdravých žen. U pacientek s Turnerovým syndromem není jeho produkt přítomen ve správné expresní hladině, což se u těchto žen manifestuje jako malá postava a kosterní abnormality. Gen *SHOX* je konzervován u řady obratlovců s výjimkou myši, kde nacházíme pouze ortologa lidského genu *SHOX2: Og12x*. Jako vhodnější model pro výzkum genu *SHOX* a patologií s tímto genem souvisejících se ukázaly kuřecí embryonální tkaňové kultury, neboť u kura domácího, na rozdíl od myši, je gen *SHOX* přítomen.

Expresi genu *SHOX* je řízena 2 promotory, několika DNA nekódujícími elementy, které leží po směru i proti směru transkripce a nově objeveným regulátorem HOXA9, který se váže do alternativního promotoru. Transkripční faktor SHOX reguluje expresi genů *NPPB*, *FGFR3*. Tyto geny a jejich produkty jsou zapojeny do enchondrální osifikace a růstu kosti. Odhalení signální dráhy regulace růstu proteinem SHOX otevírá pole pro léčbu růstového selhání u pacientek s Turnerovým syndromem, ale i u pacientek s Léri Weilovým syndromem nebo s idiopatickou krátkou postavou.

Další geny, které byly popsány v souvislosti s Turnerovým syndromem, jsou: *USP9X*, *UBA1* *ZFX* a *RPS4X*. Tyto původní studie nebyly dále rozvíjeny, a proto nelze říci jednoznačně, že skutečně tyto geny zodpovídají za další fenotypové projevy asociované s TS. V budoucnu bude nutné výsledky těchto studií ověřit.

V literární rešerši jsem přinesla souhrnný přehled regulátorů inaktivace chromozómu X se zdůrazněním rozdílů mezi člověkem a myší. Provázala jsem problematiku inaktivace chromozómu X s geneticky podmíněným syndromem - TS. Práce tak může sloužit jako dobrý orientační zdroj přehledných informací o Turnerově syndromu v souvislosti s inaktivací chromozómu X a jako zdroj mapující nedostatky myšího modelu pro jeho přenesení pro mechanismy fungující u člověka.

Seznam použité literatury

Adler, D.A., Bressler, S.L., Chapmant, V.M., Pages, D.C., Disteche, C.M. (1991). Inactivation of the *Zfx* gene on the mouse X chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 4 592–4 595.

* Augui, S., Nora, E.P., Heard, E. (2011). Regulation of X-chromosome inactivation by the X-inactivation centre. *Nature Reviews Genetics* 12, 429–442.

Aza-Carmona, M., Shears, D.J., Yuste-Checa, P., Barca-Tierno, V., Hisado-Oliva, A., Belinchón, A., Heath, K.E. (2011). SHOX interacts with the chondrogenic transcription factors SOX5 and SOX6 to activate the aggrecan enhancer. *Human molecular genetics* 20, 1 547–1 559.

Ballabio, a, Bardoni, B., Carozzo, R., Andria, G., Bick, D., Campbell, L., Hamel, B., Ferguson-Smith, M., Gimelli, G., and Fraccaro, M. (1989). Contiguous gene syndromes due to deletions in the distal short arm of the human X chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 10 001–10 005.

Barakat, T.S., Gunhanlar, N., Pardo, C.G., Achame, E.M., Ghazvini, M., Boers, R., Kenter, A., Rentmeester, E., Grootegoed, J.A., Gribnau, J. (2011). RNF12 activates *Xist* and is essential for X chromosome inactivation. *PLoS Genetics* 7(1), e1002001.

Berletch, J. B., Yang, F., Disteche, C. M. (2010). Escape from X inactivation in mice and humans. *Genome Biology* 11 (6), 213.

Bettencourt, P., Ferreira, S., Azevedo, A. (2002). Preliminary data on the potential usefulness of B-type natriuretic peptide levels in predicting. *The American Journal of Medicine* 113, 215–219.

Blaschke, R.J., and Rappold, G. (2006). The pseudoautosomal regions, SHOX and disease. *Current Opinion in Genetics & Development* 16, 233–239.

Blaschke, R.J., Monaghan, P., Schiller, S., Schechinger, B., Rao, E., Padilla-Nash, H., Ried, T., Rappold, G. (1998). SHOT, a SHOX-related homeobox gene, is implicated in craniofacial, brain, heart, and limb development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 2 406–2 411.

Blaschke, R.J., Töpfer, C., Marchini, A., Steinbeisser, H., Janssen, J.W.G., Rappold, G. A. (2003). Transcriptional and translational regulation of the Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene *SHOX*. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 47 820–47 826.

Borsani, G., Tonlorenzi, R., Simmler, M. C., Dandolo, L., Arnaud, D., Capra, V., Ballabio, A. (1991). Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature* 351, 325–329.

Boucher, C.A., Sargent, C.A., Ogata, T., Avara, N.A., Road, C. (2001). Breakpoint analysis of Turner patients with partial Xp deletions: implications for the lymphoedema gene location. *Journal of Medical Genetics* 38, 591–598.

Brown, C. J., Ballabio, A., Rupert, J. L., Lafreniere, R. G., Grompe, M., Tonlorenzi, R., Willard, H. F. (1991). A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* 349, 38–44.

Brown, C.J., Willard, H.F. (1990). Localization of a Gene That Escapes Inactivation to the X Chromosome Proximal Short Arm: Implications for X Inactivation. *The American Journal of Human Genetics* 46, 273–279.

Brown, C.J., Lafreniere, R.G., Powers, V.E., Sebastio, G., Ballabio, A., Pettigrew, A.L., Ledbetter, D.H., Levy, E., Craig, I.W., Willard, H.F. (1991) Localization of the X inactivation centre on the human X chromosome in Xq13. *Nature* 349, 82–84

Carrel, L., and Willard, H.F. (2005). X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 434, 400–404.

Carrel, L., and Willard, H.F. (1999). Heterogeneous gene expression from the inactive X chromosome: an X-linked gene that escapes X inactivation in some human cell lines but is inactivated in others. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 7 364–7 369.

* sekundární zdroj

Clement-Jones, M., Schiller, S., Rao, E., Blaschke, R.J., Zuniga, a, Zeller, R., Robson, S.C., Binder, G., Glass, I., Strachan, T. (2000). The short stature homeobox gene *SHOX* is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Human Molecular Genetics* 9, 695–702.

Chang, H.J., Clark, R.D., Bachman, H. (1990). The Phenotype of 45,X/46,XY Mosaicism: An Analysis of 92 Prenatally Diagnosed Cases. *American Journal of Medical Genetics* 46, 156–167.

Chaumeil, J., Baccon, P. Le, Wutz, A., Heard, E. (2006). A novel role for Xist RNA in the formation of a repressive nuclear compartment into which genes are recruited when silenced. *Genes & Development* 20, 223–227.

Chow, J.C., Ciaudo, C., Fazzari, M.J., Mise, N., Servant, N., Glass, J.L., Attreed, M., Avner, P., Wutz, A., Barillot, E. (2010). LINE-1 activity in facultative heterochromatin formation during X chromosome inactivation. *Cell* 141, 956–969.

Chureau, C., Chantalat, S., Romito, A., Galvani, A., Duret, L., Avner, P., Rougeulle, C. (2011). Ftx is a non-coding RNA which affects Xist expression and chromatin structure within the X-inactivation center region. *Human Molecular Genetics* 20, 705–718.

Chureau, C., Prissette, M., Bourdet, A., Cattolico, L., Jones, L., Avner, P., Duret, L. (2002). Comparative sequence analysis of the X-inactivation center region in mouse, human and bovine. *Genome Research* 12, 894–908.

de Mello, J.C.M, De Araújo, E.S.S., Stabellini, R., Fraga, A.M., De Souza, J.E.S., Sumita, D.R., Camargo, A., Pereira, L.V. (2010). Random X inactivation and extensive mosaicism in human placenta revealed by analysis of allele-specific gene expression along the X chromosome. *PloS One* 5, e10947.

Deng, X., Hiatt, J.B., Nguyen, D.K., Ercan, S., Sturgill, D., Hillier, L.W., Schlesinger, F., Davis, C.A., Reinke, V.J., Gingeras, T.R. (2011). Evidence for compensatory upregulation of expressed X-linked genes in mammals, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Nature Genetics* 43, 179–185.

Dennis, N.R., Collins, A.L., Crolla, J.A., Cockwell, A.E., Fisher, A.M., Jacobs, P.A. (1993) Three patients with ring X chromosomes and a severe phenotype. *Journal of Medical Genetics* 30, 482–486.

Disteche, C.M. (1999). Escapees on the X chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 14180–14182.

Donohoe, M.E., Zhang, L., Xu, N., Shi, Y., Lee, J.T. (2007). Identification of a CTCF cofactor, YY1, for the X chromosome binary switch. *Molecular Cell* 25, 43–56.

Durand, C., Bangs, F., Signolet, J., Decker, E., Tickle, C., Rappold, G. (2009). Enhancer elements upstream of the *SHOX* gene are active in the developing limb. *European Journal of Human Genetics* 18, 527–532.

Durand, C., Decker, E., Roeth, R., Schneider, K.U., Rappold, G. (2012). The homeobox transcription factor HOXA9 is a regulator of *SHOX* in U2OS cells and chicken micromass cultures. *PloS one* 7(9), e45369.

Durand, C., Roeth, R., Dweep, H., Vlatkovic, I., Decker, E., Schneider, K.U. (2011). Alternative splicing and nonsense-mediated RNA decay contribute to the regulation of *SHOX* expression. *PloS one* 6, e18115.

El Abd, S., Patton, M.A., Turk, J., Hoey, H., Howlin, P. (1999) Social, communicational, and behavioral deficits associated with ring X Turner syndrome. *American Journal of Medical Genetics* 88, 510–516.

Ellison, J.W., Wardak, Z., Young, M.F., Gehron Robey, P., Laig-Webster, M., Chiong, W. (1997). *PHOG*, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. *Human Molecular Genetics* 6, 1341–1347.

Elsheikh, M., Wass, J.A., Copnway, G.S. (2001) Autoimmune thyroid syndrome in women with Turner's syndrome - the association with karyotype. *Clinical Endocrinology* 55, 223–226.

Glaser, A., Decker, E., Durand, C., Bender, S., Ro, C., Hecht, J., Schneider, K.U., Rappold, G. (2011). *FGFR3* is a target of the homeobox transcription factor *SHOX* in limb development. *Human Molecular Genetics* 20, 1524–1535.

Gontan, C., Achame, E.M., Demmers, J., Barakat, T.S., Rentmeester, E., Ijcken, W. Van, Grootegoed, J.A., Gribnau, J. (2012). RNF12 initiates X-chromosome inactivation by targeting REX1 for degradation. *Nature* 485, 386–390.

Grant, J., Mahadevaiah, S. K., Khil, P., Sangrithi, M. N., Royo, H., Duckworth, J., McCarrey, J. R., Van de Berg, J. L., Renfree, M. B., Taylor, W. (2012). Rxs is a metatherian RNA with Xist-like properties in X-chromosome inactivation. *Nature* 487, 254–258.

* sekundární zdroj

Han, Y., Lefebvre, V. (2008). L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer. *Molecular and cellular biology* 28, 4 999–5 013.

Heard, E., and Disteche, C.M. (2006). Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome. *Genes & Development* 20, 1 848–1 867.

Harrison, K.B. (1989). X-chromosome inactivation in the human cytotrophoblast. *Cytogenetics and Cell Genetics* 52, 37–41.

* Held, K.R., Kerber, S., Kaminsky, E. (1992). Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes? *Human Genetics* 88, 288–294; cit. dle Powell, C. M. (2005). *Sex chromosomes and sex chromosome abnormalities*. In *The Principles of Clinical Cytogenetics* (pp. 207–246). Humana Press

James, R.S., Coppin, B., Dalton, P. (1998). A study of females with deletions of the short arm of the X chromosome. *Human Genetics* 102, 507–516.

Jones, M.H., Furlong, R.A., Burkin, H., Chalmers, I.J., Brown, G.M., Khwaja, O., Affara, N.A. (1996). The *Drosophila* developmental gene *fat facets* has a human homologue in Xp11.4 which escapes X-inactivation and has related sequences on Yq11.2. *Human Molecular Genetics* 5, 1 695–1 701.

Kanellopoulou, C., Muljo, S. A., Dimitrov, S. D., Chen, X., Colin, C., Plath, K., Livingston, D. M. (2009). X chromosome inactivation in the absence of Dicer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 1 122–1 127.

Kay, G.F., Penny, G.D., Patel, D., Ashworth, A., Brockdorff, N., Rastan, S. 1993. Expression of *Xist* during mouse development suggests a role in the initiation of X chromosome inactivation. *Cell* 72, 171–182.

Kharchenko, P.V., Xi, R., Park, P.J. (2011). Evidence for dosage compensation between the X chromosome and autosomes in mammals. *Nature Genetics* 43, 1 167–1 169.

* Kleczkowska, A., Dmoch, E., Kubein, E., Fryns, J.P., Van den Berghe, H. (1990) Cytogenetic findings in a consecutive series of 478 patients with Turner's syndrome. The Lueven experience. *Genet. Couns.* 1, 227–233; cit. dle Powell, C. M. (2005). *Sex chromosomes and sex chromosome abnormalities*. In *The Principles of Clinical Cytogenetics* (pp. 207–246). Humana Press.

Lee, J.T., and Bartolomei, M.S. (2013). Review X-inactivation, imprinting, and long noncoding RNAs in health and disease. *Cell* 152, 1 308–1 323.

Lee, J.T., Davidow, L.S., and Warshawsky, D. (1999). *Tsix*, a gene antisense to *Xist* at the X-inactivation centre. *Nature Genetics* 21, 400–404.

Lee, J.T., and Lu, N. (1999). Targeted mutagenesis of *Tsix* leads to nonrandom X inactivation. *Cell* 99, 47–57.

Lin, H., Halsall, J.A., Antczak, P., O'Neill, L.P., Falciani, F., Turner, B.M. (2011). Relative overexpression of X-linked genes in mouse embryonic stem cells is consistent with Ohno's hypothesis. *Nature Genetics* 43, 1 169–1 170.

Luoh, S., Bain, P.A., Polakiewicz, R.D., Goodheart, M.L., Gardner, H., Jaenisch, R., Page, D.C. (1997). *Zfx* mutation results in small animal size and reduced germ cell number in male and female mice. *Development* 124, 2 275–2 284.

* Lyon, M. F. (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse. *Nature* 190, 372–373; cit. dle Heard, E., Disteche, C.M. (2006). Dosage compensation in mammal: fine-tuning the expression of the X chromosome. *Genes & Development* 20, 1 848–1 867.

Mak, W., Nesterova, T.B., Napoles, M., Appanah, R., Yamanaka, S., Arie P.O., Brockdorff, N. (2004). Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science* 303, 666–669.

Marchini, A., Häcker, B., Marttila, T., Hesse, V., Emons, J., Weiss, B., Karperien, M., Rappold, G. (2007). BNP is a transcriptional target of the short stature homeobox gene SHOX. *Human Molecular Genetics* 16, 3 081–3 087.

Marchini, A., Daeffler, L., Marttila, T., Schneider, K.U., Rommelaere, J., Blaschke, J., Schno, M. (2006). Phosphorylation on Ser 106 modulates the cellular functions of the SHOX homeodomain protein. *The Journal of Molecular Biology* 355, 590–603.

* sekundární zdroj

Marchini, A., Marttila, T., Winter, A., Caldeira, S., Malanchi, I., Rao, E., Karperien, M., Wit, J.M., Richter, W., Tommasino, M. (2004). The short stature homeodomain protein SHOX induces cellular growth arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 37 103–37 114.

Migeon, B.R., Do, T.T. (1978) In search of nonrandom X inactivation: studies of the placenta from newborns heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Basic Life Sciences* 12, 379–391.

Migeon, B.R., Chowdhury, A.K., Dunston, J.A., McIntosh, I. (2001). Identification of *TSIX*, encoding an RNA antisense to human *XIST*, reveals differences from its murine counterpart: implications for X inactivation. *The American Journal of Human Genetics* 69, 951–960.

Migeon, B.R., Lee, C.H., Chowdhury, A.K., Carpenter, H. (2002). Species differences in *TSIX/Tsix* reveal the roles of these genes in X-chromosome inactivation. *The American Journal of Human Genetics* 71, 286–293.

Migeon, B.R., Luo, S., Stasiowski, B.A. (1993) Deficient transcription of *XIST* from tiny ring X chromosomes in females with severe phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 12 025–12 029.

Monk, M., and Harper, M. (1978). X-chromosome activity in preimplantation mouse embryos from XX and XO mothers. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 46, 53–64.

Navarro, P., Chambers, I., Karwacki-Neisius, V., Chureau, C., Morey, C., Rougeulle, C., Avner, P. (2008). Molecular coupling of *Xist* regulation and pluripotency. *Science Signaling* 321(5896), 1693.

Navarro, P., Oldfield, A., Legoupi, J., Festuccia, N., Dubois, A., Attia, M., Schoorlemmer, J., Rougeulle, C., Chambers, I., Avner, P. (2010). Molecular coupling of *Tsix* regulation and pluripotency. *Nature* 468, 457–460.

Nesterova, T.B., Popova, B.C., Cobb, B.S., Norton, S., Senner, C.E., Tang, Y.A., Spruce, T., Rodriguez, T.A., Sado, T., Merkenschlager, M. Dicer regulates *Xist* promoter methylation in ES cells indirectly through transcriptional control of *Dnmt3a*. *Epigenetics & Chromatin* 1(1), 2.

Nguyen, D.K., and Disteche, C.M. (2006). Dosage compensation of the active X chromosome in mammals. *Nature Genetics* 38, 47–54.

Noma, T., Kanai, Y., Kanai-azuma, M., Ishii, M., Fujisawa, M. (2002). Stage- and sex-dependent expressions of *Usp9x*, an X-linked mouse ortholog of *Drosophila* Fat facets, during gonadal development and oogenesis in mice. *Mechanisms of Development* 3, 91–95.

Ogata, T., Goodfellow, P., Petit, C., Aya, M., Matsuo, N. (1992). Short stature in a girl with a terminal Xp deletion distal to *DXYS15*: localisation of a growth gene(s) in the pseudoautosomal region. *Journal of Medical Genetics* 29, 455–459.

Ogawa, Y., and Lee, J.T. (2003). *Xite*, X-inactivation intergenic transcription elements that regulate the probability of choice. *Molecular Cell* 11, 731–743

Ogawa, Y., Sun, B.K., Lee, J.T. (2008). Intersection of the RNAi and X-inactivation pathways. *Science* 320, 1 336–1 341.

* Ohno, S. (1967). *Sex chromosomes and sex-linked genes*. Springer, Berlin; cit. dle Heard, E., Disteche, C.M. (2006). Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome. *Genes & Development* 20, 1 848–1 867.

Okamoto, I., Patrat, C., Thépot, D., Peynot, N., Fauque, P., Daniel, N., Diabangouaya, P., Wolf, J.P., Renard, J.P., Duranthon, V. (2011). Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. *Nature* 472, 370–374.

Oliveira, C. S., and Alves, C. (2011). The role of the *SHOX* gene in the pathophysiology of Turner syndrome. *Endocrinología y Nutrición* 58, 433–442.

Ostendorff, H. P., Bossenz, M., Mincheva, A., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Lichter, P., Bach, I. (2000) Functional characterization of the gene encoding RLIM, the corepressor of LIM homeodomain factors. *Genomics* 69, 120–130.

Pollex, T., and Heard, E. (2012). Recent advances in X-chromosome inactivation research. *Current Opinion in Cell Biology* 24, 825–832.

Powell, C.M., Taggart, R.T., Drumheller, T.C. (1994) Molecular and cytogenetic studies of an X;autosome translocation in a patient with premature ovarian failure and review of the literature. *American Journal of Medical Genetics* 52, 19–26.

* sekundární zdroj

- * Ranke, M.B., and Saenger, P. (2001). Turner's syndrome. *Lancet* 358, 309–314.
- Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, Muroya K. (1997). Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nature Genetics* 16, 54–63.
- Rao, E., Blaschke, R.J., Marchini, A., Niesler, B., Burnett, M., Rappold, G. (2001). The Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX encodes a cell-type specific transcriptional activator. *Human Molecular Genetics* 10, 3 083–3 091.
- Rastan, S. (1983). Non-random X-chromosome inactivation in mouse X-autosome translocation embryos—location of the inactivation centre. *Journal of Embryology & Experimental Morphology* 78, 1–22.
- Rastan, S. (1985). X-chromosome deletions in embryo-derived (EK) cell lines associated with lack of X-chromosome inactivation. *Journal of Embryology & Experimental Morphology* 90, 379–388.
- Ross, M.T., et al. (2005). The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 434, 325–338.
- Sabherwal N., Bangs F., Roth R., Weiss B., Jantz K. (2007). Long-range conserved non-coding SHOX sequences regulate expression in developing chicken limb and are associated with short stature phenotypes in human patients. *Human Molecular Genetics* 16, 210–222.
- Sabherwal, N., Schneider, K.U., Blaschke, R.J., Marchini, A., Rappold, G. (2004). Impairment of SHOX nuclear localization as a cause for Léri-Weill syndrome. *Journal of Cell Science* 117, 3 041–3 048.
- * Sharman, G.B. 1971. Late DNA replication in the paternally derived X chromosome of female kangaroos. *Nature* 230: 231–232; cit. dle Heard, E., and Distèche, C.M. (2006). Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome. *Genes & Development* 20, 1 848–1 867.
- Shin, J., Bossenz, M., Chung, Y., Ma, H., Byron, M., Zhu, X., Jiao, B., Hall, L.L., Green, M.R., Jones, S.N. (2010). Maternal Rnf12/RLIM is required for imprinted X chromosome inactivation in mice. *Nature* 467, 977–981.
- * Schmidt, M. and DuSart, D. (1992) Functional disomies of the X chromosome influence the cell selection and hence the X inactivation pattern in females with balanced X-autosome translocations: a review of 122 cases. *American Journal of Medical Genetics* 42, 161–169. Podle Waters, J.J., Campbell, P.L., Crocker, A.J.M., Campbell, C.M. (2001) Phenotypic effects of balanced X-autosome translocations in females: a retrospective survey of 104 cases reported from UK laboratories. *Human Genetics* 108, 318–327
- Schneider-Gädicke, A., Beer-Romero, P., Brown, L. G., Nussbaum, R., Page, D. C. (1989). *ZFX* has a gene structure similar to *ZFY* the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. *Cell* 57, 1 247–1 258.
- * Schultz, R.M. (1993). Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *BioEssays* 15, 531–538; cit. dle Zuccotti, M., Boiani, M., Ponce, R., Guizzardi, S., Scandroglio, R., Garagna, S., and Redi, C.A. (2002). Mouse *Xist* expression begins at zygotic genome activation and is timed by a zygotic clock. *Molecular Reproduction and Development* 61, 14–20.
- Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P.J., Cordum, H.S., Hillier, L., Brown, L.G., Repping, S., Pyntikova, T., Ali, J., Bieri, T. (2003). The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423, 825–837.
- * Stratakis C.A. and Rennert O.M. (1994). Turner Syndrome: molecular and cytogenetics, dysmorphology, endocrine and other clinical manifestation and their management. *The Endocrinologist* 4, 442–453.
- Sun, B.K., Deaton, A.M., Lee, J.T. (2006). A transient heterochromatic state in *Xist* preempts X inactivation choice without RNA stabilization. *Molecular Cell* 21, 617–628.
- Sugimoto, M., and Abe, K. (2007). X chromosome reactivation initiates in nascent primordial germ cells in mice. *PLoS Genetics* 3(7), e116.
- * Sybert, V. P., and McCauley, E. (2004). Turner's syndrome. *New England Journal of Medicine* 351, 1 227–1 238.
- * Takagi, N. and Sasaki, M. (1975). Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. *Nature* 256, 640–642.
- * Therman E., Laxova, R., and Susman, B. (1990) The critical region on the human Xq. *Human Genetics* 85, 455–461; cit. dle Powell, C. M. (2005). *Sex chromosomes and sex chromosome abnormalities*. In *The Principles of Clinical Cytogenetics* (pp. 207-246). Humana Press.

* sekundární zdroj

Tian, D., Sun, S., Lee, J.T. (2010). The long noncoding RNA, *Jpx*, is a molecular switch for X chromosome inactivation. *Cell* 143, 390–403.

Tiecke, E., Bangs, F., Blaschke, R., Farrell, E.R., Rappold, G., Tickle, C. (2006). Expression of the short stature homeobox gene *Shox* is restricted by proximal and distal signals in chick limb buds and affects the length of skeletal elements. *Developmental Biology* 298, 585–596.

Turner H.H. (1938). A syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and cubitus vagus. *Endocrinology* 23, 566-574 převzato z Stratakis C.A. and Rennert O.M. (1994). Turner Syndrome: molecular and cytogenetics, dysmorphology, endocrine and other clinical manifestation and their management. *The Endocrinologist* 4, 442–453.

Vallot, C., Huret, C., Lesecque, Y., Resch, A., Oudrhiri, N., Bennaceur-Griscelli, A., Duret, L., Rougeulle, C. (2013). XACT, a long noncoding transcript coating the active X chromosome in human pluripotent cells. *Nature Genetics* 45, 239–241.

van den Berg, I. M., Laven, J. S., Stevens, M., Jonkers, I., Galjaard, R. J., Gribnau, J., Hikke van Doorninck, J. (2009). X chromosome inactivation is initiated in human preimplantation embryos. *The American Journal of Human Genetics* 84, 771-779.

Vigneau, S., Augui, S., Navarro, P., Avner, P., Clerct, P. (2006). An essential role for the *DXPas34* tandem repeat in the counting and Tsix process transcription inactivation of X chromosome. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 7 390–7 395 .

Waters, J.J., Campbell, P.L., Crocker, A.J.M., Campbell, C.M. (2001) Phenotypic effects of balanced X-autosome translocations in females: a retrospective survey of 104 cases reported from UK laboratories. *Human Genetics* 108, 318–327.

Wells, D., Bermudez, M.G., Steuerwald, N., Thornhill, R., Walker, D.L., Malter, H., Delhanty, J.D., Cohen, J. (2005). Expression of genes regulating chromosome segregation, the cell cycle and apoptosis during human preimplantation development. *Human Reproduction* 20, 1 339–1 348.

Wolff, D.J., Miller, A.P., Dyke, D.L. Van, Schwartz, S., Willard, H.F. (1996). Molecular definition of breakpoints associated with human Xq isochromosomes: implications for mechanisms of formation. *American Journal of Medical Genetics* 58, 154–160.

Wutz, A., Rasmussen, T.P., Jaenisch, R. (2002). Chromosomal silencing and localization are mediated by different domains of Xist RNA. *Nature genetics* 30,167–174

Xiong, Y., Chen, X., Chen, Z., Wang, X., Shi, S., Wang, X., Zhang, J., He, X. (2010). RNA sequencing shows no dosage compensation of the active X-chromosome. *Nature Genetics* 42, 1 043–1 047.

Yang, F., Babak, T., Shendure, J., Disteche, C.M. (2010). Global survey of escape from X inactivation by RNA-sequencing in mouse. *Genome Research*. 20, 614–622.

Yildirim, E., Sadreyev, R.I., Pinter, S.F., Lee J.T. (2011). X-chromosome hyperactivation in mammals via nonlinear relationships between chromatin states and transcription. *Nature Structural & Molecular Biology* 19, 56–61.

Zapletalová, J., Lebl, J., Šnajderová, M. *Turnerův syndrom*. Praha: Galén, 2003. ISBN 8072622048.

Zhao, J., Sun, B.K., Erwin, J.A., Song, J., Jeannie, T. (2008). Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X-chromosome. *Science* 322, 750–756.

Zinn, A.R., Alagappan, R.K., Brown, L.G., Wool, I.R.A., Page, D.C. (1994). Structure and function of ribosomal protein S4 genes of the human and mouse sex chromosomes. *Molecular and Cellular Biology* 14, 2 485–2 492.

Zuccotti, M., Boiani, M., Ponce, R., Guizzardi, S., Scandroglia, R., Garagna, S., Redi, C.A. (2002). Mouse *Xist* expression begins at zygotic genome activation and is timed by a zygotic clock. *Molecular Reproduction and Development* 61, 14–20.

* sekundární zdroj