

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Vojtěch Rieger

Molekulární podstata variability fenotypů u pacientů a pacientek s Fabryho chorobou

Molecular basis of phenotypic variability in male and female patients with Fabry
disease

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Lenka Dvořáková, Csc.

Praha, 2016

Prohlášení

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

V Praze, 19.8.2016

Vojtěch Rieger

Poděkování

Touto cestou bych chtěl poděkovat lidem, bez kterých by má bakalářská práce byla odsouzena k neúspěchu. Dík patří především mé školitelce RNDr. Lence Dvořákové, CSc, neb mi stála radou a ochotně pomohla překonat veškeré problémy, ať byly sebevětší. Stejně tak musím poděkovat Ing. Heleně Poupětové a MUDr. Luboru Goláňovi za poskytnuté konzultace. A konečně mé rodině, která mne svými neustálými pobídkami hnala kupředu.

Abstrakt

Fabryho choroba je X vázaným onemocněním způsobeným mutací v genu *GLA*, který kóduje lysozomální enzym α -galaktosidázu A. Defekt enzymu vede k progresivnímu ukládání neutrálních glykosfingolipidů v lysozomech, což má významné fyziologické implikace. Fabryho choroba je velmi variabilní ve svém klinickém projevu. Příčinou je kombinace mnoha faktorů, z nichž ne všechny jsou známé. Ačkoli heterozygotní ženy jsou nositelkami i zdravé alely, nejsou asymptomatické a onemocnění se u nich manifestuje, sic obvykle v mírnější podobě. Jelikož u žen dochází k inaktivaci jednoho z X gonozomů, může dojít k vychýlení poměru gonozomů ve prospěch mutované alely, a tedy pravděpodobně ke zvýšení závažnosti projevu. Na téma zešíkmení X inaktivace u pacientek byly publikovány četné studie s protichůdnými závěry. Účelem této práce je zhodnotit původce fenotypové variability u hemizygotů a u heterozygotek se zešíkmením X inaktivace.

Klíčová slova: Fabryho choroba, α -galaktosidáza A, gen *GLA*, neutrální glykosfingolipidy, X inaktivace, heterozygotky

Abstract

Fabry disease is an X linked illness caused by mutation in the *GLA* gene which codes lysosomal enzyme α -galactosidase A. The defect of this enzyme leads to progressive storage of neutral glycosphigolipids in the lysosomes which has significant physiological implications. Fabry disease has very variable clinical manifestations because of the combination of many factors, yet not all of them are known. Even though heterozygotic women carry also a wild type allele, they are not asymptomatic. Their symptoms, however, are usually in a milder form. Due the random inactivation of one of the X gonosomes, there is a possibility of skewed X inactivation pattern, which may inflict an increase of symptoms on the disordered woman. Many studies concerning X inactivation have been published, however their conclusions were contradictory. The purpose of this work is to summarise the causes of phenotypic variability in hemizygotes and heterozygotes with skewed X inactivation.

Key words: Fabry disease, α -galactosidase A, *GLA* gene, neutral glycosphyngolipids, X inactivation, heterozygotes

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Fabryho choroba.....	3
2.1. Biochemické příčiny FD	3
2.1. Charakteristika a metabolismus neutrálních glykosfingolipidů	3
2.2. Alfa-galaktosidáza A.....	5
2.2. Genetika FD	7
2.2.1. <i>GLA</i> gen	7
2.3. Fenotyp a klinické projevy choroby	9
2.3.1. Klasická varianta	9
2.3.2. Další varianty	11
2.3.3. Manifestace FD u heterozygotních žen	12
2.3.4. Příčiny variability fenotypů a korelace genotypu a fenotypu.....	12
2.4. Diagnostika a možnosti léčby	13
2.4.1. Diagnostika.....	13
2.4.2. Terapie.....	15
3. Vztah X inaktivace k FD.....	17
3.1. X inaktivace	17
3.3. X zešikmení.....	18
3.4. FD a zešikmení.....	19
4. Závěr	22
5. Seznam použitých zkratk.....	23
6. Seznam použité literatury.....	24

1. Úvod

Fabryho choroba (FD; OMIM 301500) je vrozená porucha katabolismu glykosfingolipidů vedoucí k hromadění neutrálních glykosfingolipidů, a to především globotriaosylceramidu, v lysozomech (Sweeley & Klionsky 1961). Její příčina spočívá v absentující aktivitě enzymu α -galaktosidázy A (α -Gal), která odštěpuje α -galaktosyl z glykosfingolipidu. S porušením funkce enzymu dochází k akumulaci zmíněných metabolitů v lysozomech (Vance et al. 1975).

Za defektem enzymu stojí mutace v genu *GLA* lokalizovaném na dlouhém raménku chromozomu X v oblasti Xq22 (Bishop et al. 1988). Lokalizace na X gonozomu determinuje dědičnost choroby. Muži hemizygoti mají dcery přenašečky a zdravé syny. Ženy heterozygotky mají 50 % dcer přenašeček a 50 % synů postižených onemocněním. Označení heterozygotních žen jako přenašeček, je však nedostatečné a nevystihuje plně projevy u žen (Germain 2012). Kvůli náhodné inaktivaci jednoho z X chromozomů u žen, lyonizaci, může dojít k X zešíkmení ve prospěch mutované alely, a žena poté manifestuje symptomy FD, byť typicky v mírnější podobě než u hemizygotů (Lyon 1961; Street et al. 2006). Srovnání fenotypového projevu v závislosti na pohlaví je jedním z cílů práce.

FD je multiorgánovým onemocněním s velmi variabilními klinickými projevy, odvislými zejména od residuálního množství aktivního enzymu. Klasickými symptomy FD jsou akroparestázie v končetinách, hypohidróza, abdominální bolesti a křeče spojené s pocitem naplnění i po menším jídle, dále kožní projevy v podobě angiokeratomů převážně v oblasti třísel a podbřišku, cornea verticillata a oční katarakt. Hromadění glykosfingolipidů v buňkách ledvin progresivně zhoršuje jejich funkci. Selhání ledvin mezi čtvrtým a pátým deceniem je tak častou příčinou smrti. FD postihuje také oběhovou soustavu. Zasažen je endotel cév a srdečními projevy bývá levá ventrikulární hypertrofie, arytmie, infarkt myokardu a abnormality chlopní. Pacienti mají vyšší riziko mozkové mrtvice a krvácení do mozku (MacDermot et al. 2001).

Klasickou formu FD, s manifestací všech příznaků, však vykazuje pouze 30 % pacientů. Většina pacientů vykazuje pouze některé symptomy a to v různé míře závažnosti. Krom klasické varianty rozeznáváme ještě kardiální variantu, kdy postižený je jinak asymptomatický a jediným zasaženým orgánem je srdce (Scheidt et al. 1991). Podobně je rozlišována renální varianta s projevy omezenými na ledviny (Nakao et al. 2003). Popsaná šíře fenotypového projevu je značná, což velmi znesnadňuje diagnózu.

Včasná diagnóza je nutná pro nasazení enzymové terapie, která zvyšuje věk dožití i kvalitu života pacientů (Germain et al. 2015).

Udávaná frekvence výskytu je 1:40000 v celkové populaci. Novější plošné studie však ukazují na daleko vyšší prevalenci 1:7057 (Inoue et al. 2013; Thomas 2007). Obtížná diagnostika tedy pravděpodobně skrývá skutečnou incidenci choroby. Onemocnění bylo poprvé popsáno nezávisle na sobě dvěma dermatology, a to Fabrym v Německu a Andersonem v Anglii, v roce 1898.

2. Fabryho choroba

2.1. Biochemické příčiny FD

2.1. Charakteristika a metabolismus neutrálních glykosfingolipidů

FD je způsobena hromaděním neutrálních glykosfingolipidů, zejména globotriaosylceramidu a globotriaosylsfinosinu (Pastores & Lien 2002). Následující řádky přiblíží jejich výskyt a metabolické procesy, kterých se v lidském těle účastní.

Glykosfingolipidy jsou součástí početné rodiny látek vyskytujících se v membránách lidských buněk a to jak v membráně cytoplasmatické, tak v membránách organel jmenovitě lysozomu nebo Golgiho aparátu (Thompson & Tillack 1985). V krevní plasmě jsou vázány na lipoproteiny, poněkud pak na low density lipoproteiny (Dawson et al. 1976).

Lipidickou část glykosfingolipidů tvoří hydrofobní ceramid. Ceramid se sestává ze čtyř sfingosinů a přes amidovou vazbu navázaného řetězce různých mastných kyselin. U neutrálních glykosfingolipidů, u kterých dochází ke stádání, se jedná o nasycené a mononasycené kyseliny s řetězci dlouhými šestnáct až dvacet šest uhlíků. Na ceramid se přes jeho terminální hydroxyl váží cukerné zbytky. Cukernou částí molekuly může být jednoduchý monosacharid, či bohatě větvený oligosacharid s více než dvaceti cukernými zbytky (Simon et al. 1990). Glykosfingolipidy, které se stádají u nemocných, jsou svým složením totožné s glykosfingolipidy u zdravých jedinců (Martensson 1966).

Mezi hlavní glykosfingolipidy, hromadící se u pacientů s FD, patří globotriaosylceramid (Gb3). Gb3 se akumuluje poněkud v lysozomech buněk endotelu cév, v buňkách hladké svaloviny a také parietálních buňkách a epiteliálních buňkách většiny vnitřních orgánů. Mezi orgány, nejsilněji zasažené, patří ledviny, dále pak aorta, slezina a játra. Avšak zvýšené koncentrace Gb3 vykazují všechny tkáně a buněčné populace, vyjma erytrocytů (Schibanoff et al. 1966). Modely na *GLA* knockout myších detailněji ilustrují stázení jednotlivých orgánů, viz Tab. 1 (Sueoka, Aoki, et al. 2015).

Tab. 1: Srovnání koncentrací Gb3 u *GLA* wild-type myši a *GLA* knockout myši

vzorek	Gb3 Wild-Type [ng/mg]	nárůst Gb3 u <i>GLA</i> KO
srdce samce	0.86±0.21	1127×
srdce samice	1±0.3	1300×
ledvina samce	120±20	81×
ledvina samice	70±29	200×
játra samce	1.2±0.4	4166×
játra samice	1.8±1.4	3777×
plasma samce	0.016±0.004	275×
plasma samice	0.018±0.002	155×

Převzato Sueoka et al. (Sueoka, Aoki, et al. 2015)

U lidských pacientů hemizygotů jsou koncentrace Gb3 zvýšené třicetkrát až třistakrát v závislosti na příslušném orgánu oproti zdravým jedincům. U padesátileté symptomatické heterozygotní ženy se koncentrace Gb3 ve vzorcích ze srdce, jater a ledvin zvýšily proti zdravým kontrolám 3,2x; 3,7x; 6,8x (Hozumi et al. 1990).

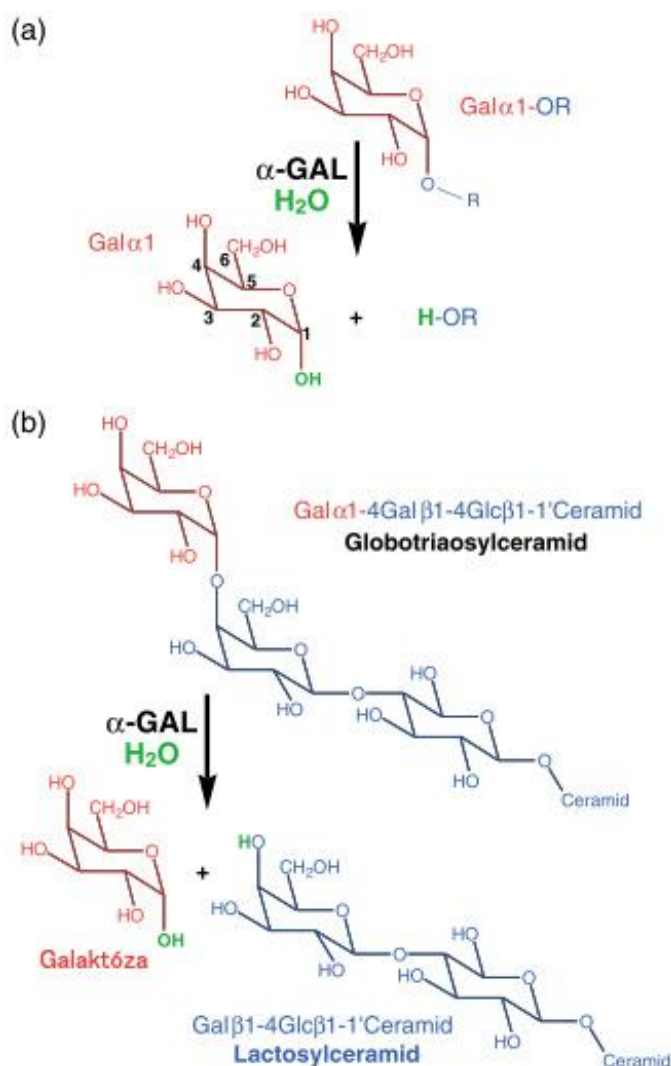
Druhým významným neutrálním glykosfingolipidem je galabiosylceramid. Stejně jako Gb3 se galabiosylceramid abnormálně akumuluje u postižených hemizygotů a v menší míře i u heterozygotek. Rozšíření galabiosylceramidu je však oproti Gb3 tkáňově specifické a k jeho detekci dochází pouze v ledvinách, slinivce, pravém srdci, plicích, močovém sedimentu a gangliích sympatiku (Schibanoff et al. 1966).

Dále u lidí stížených FD s krevní skupinou B a B1 dochází k hromadění glykosfingolipidu funkčního vzorce: [Gal(α1 → 3)Gal(2←1αFuc)(β1 → 3)GlcNAc(β1 → 3)Gal(β1 → 4)Glc(β1 → 1')Cer], který je povrchovým antigenem v případě krevní skupiny B a glykosfingolipidu funkčního vzorce: [Gal(α1 → 3)Gal(2←1αFuc)(β1 → 4)GlcNAc(β1 → 3)Gal(β1 → 4)Glc(β1 → 1')Cer] u skupiny B1 (Asfaw et al. 2002). V obou případech dochází k akumulaci v buňkách pankreatu (Wherrett & Hakomori 1973). Z toho vyplývá, že u nositelů skupin B a B1 dochází k střádání navíc dvou glykosfingolipidů proti nositelům skupin A a 0.

Biosyntéza neutrálních glykosfingolipidů probíhá skrze sekvenci na sebe navazujících enzymatických reakcí, zahrnujících adici monosacharidových jednotek. Enzymy, syntézy se účastní, patří do skupiny glykosyltransferáz. Pro FD jsou významné alfa-galaktosyltransferázy, neboť jejich odlišná přítomnost v různých

buněčných populacích vede k tkáňově specifickému postižení orgánů (Stults et al. 1989). Katabolismu glykosfingolipidů se účastní skupina specifických exoglykosidáz, které mají funkční optimum v kyselém pH a jsou převážně lokalizovány v lysozomech. Defektní alfa-galaktosidáza A, podílejí se na katabolismu, vede k propuknutí FD (Vance et al. 1975; Sandhoff & Kolter 1998).

Obr. 1: Reakce katalyzované α -Gal. a) obecný reakční mechanismus katalytické reakce odštěpení terminálního galaktosylu. b) záznam rozpadu globotriaosylceramidu (Gb3), hromadícího se v lysozomech, na galaktózu a lactosylceramid



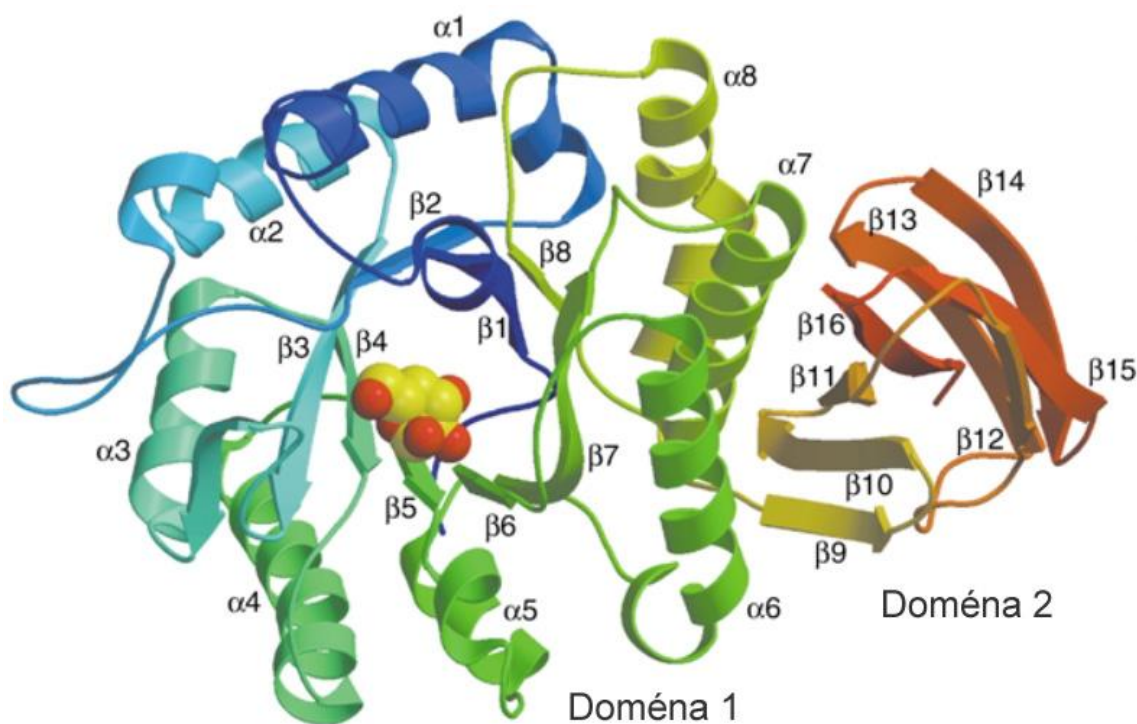
Převzato Garman et al. (Garman & Garboczi 2004)

2.2. Alfa-galaktosidáza A

Enzym α -galaktosidáza A se váže na substrát a štípe α -glykosidickou vazbu mezi terminální galaktózou a lactosylceramidem. Struktura α -Gal byla určena

rentgenovou krystalografií s rozlišením 3,25 Å. Enzym se v aktivní formě vyskytuje jako homodimer. Monomer se sestává ze dvou domén. Doména (β/α_8) obsahuje aktivní místo enzymu a 31 aminokyselin dlouhou signální sekvencí (Bishop et al. 1988). Po odštěpení signální sekvence vzniká peptid čítající celých 299 aminokyselin, stáčeující se v β barrel, ve kterém je lokalizováno aktivní místo. Druhá C-terminální doména monomeru, tvořena aminokyselinami 331 až 429, obaluje doménu první. Celý funkční dimer má 101 kDa, laseivní konkávní tvar s rozměry pohybujícími se okolo 75 Å \times 75 Å \times 50 Å, povrch dimeru má plochu 2200 Å² a zdálenost obou aktivních míst je 50 Å (Garman & Garboczi 2004).

Obr. 2: Struktura monomeru α -Gal. N konec kolorován modře, C konec červeně. V centru domény 1 se nachází aktivní centrum s přítomnou molekulou galaktózy



Převzato Garman et al. (Garman & Garboczi 2004)

Reakční mechanismus spočívá ve dvou po sobě následujících nukleofilních atacích. Prvního se účastní aspartát D170, rozrušující glykosidickou vazbu za vzniku kovalentní vazby enzym-substrát. Poté reakce pokračuje deprotonací molekuly H₂O aspartátem D231. Dochází k dalšímu nukleofilnímu ataku na C₁ uhlíku α -galaktosylu. Tím se rozpadá komplex enzym-substrát za vzniku galaktózy a laktosylceramidu (Vasella et al. 2002).

Dimer má relativně výrazný záporný náboj s poměrem 47 karboxylových skupin ku 36 bazickým. Předpokládaný náboj při neutrálním pH je -11. Avšak je nutné brát v potaz, že místo účinku enzymu je kyselé prostředí lysozomu a tedy některé karboxylové kyseliny se protonují, čímž se negativní náboj snižuje. Negativní náboj samotného peptidu dále zvyšuje N-glykosylace na třech místech pro každý monomer, a to hlavně fosforylace a sialyzace (Garman & Garboczi 2004). Izoelektrický bod enzymu se v závislosti na zdrojové tkáni pohybuje mezi hodnotami 4,3 až 5,1. Maximální efektivitu galaktosidáza vykazuje při hodnotách pH 4,6 (Beutler & Kuhl 1972).

Jelikož enzym vykazuje velmi malou konformační změnu po vazbě substrátu do aktivního místa, pravděpodobně nedochází mezi dvěma aktivními centry enzymu ke kooperativitě (Bishop & Desnick 1981).

2.2. Genetika FD

2.2.1. *GLA* gen

FD je způsobena mutací v genu *GLA*, jehož lokus je lokalizován na dlouhém raménku X chromozomu v oblasti Xq 22.1 (Grzeschik et al. 1972). Pozice genu *GLA* na X gonozomu určuje způsob dědičnosti. Hemizygot přenáší mutovanou alelu na všechny své dcery. Heterozygotky mají 50 % synů stížených a 50 % dcer heterozygotek (Thomas 2007).

Gen, o velikosti 12,436 kbp, kóduje protein α -galaktosidázu A. *GLA* obsahuje sedm exonů (Bishop et al. 1988). Jsou známy mutace ve všech sedmi exonech. K datu bylo publikováno 845 mutací (www.hgmd.cf.ac.uk). Typové rozlišení mutací způsobujících FD je pestré, nejčastěji se jedná o bodové mutace missense a o méně početné nonsense mutace. Dále pak setřihové mutace, způsobené změnou exon-intronových rozhraní. Dochází i k delecím i inzercím různého rozsahu. V genu *GLA* dochází i k drobným přestavbám. Zvláště náchylný k přestavbám je exon 7. Ohniskem těchto přestaveb je oblast 353 - 365, analýza v tomto úseku odhalila čtyřikrát se opakující dinukleotidové repetice AT a GA. Což pravděpodobně zvyšuje chybovost během DNA replikace v replikační vidličce. Podobným ohniskem přestaveb je ještě oblast 111 - 122 na exonu 2 (Eng et al. 1997). Vzácným druhem příčiny lyzozomálního stíždání je komplexní přestavba intronových oblastí. Tyto přestavby mohou vést k down regulaci mRNA a tím i snižovat expresi *GLA* (Gervas-Arruga et al. 2015).

Studie zabývající se strukturou a funkcí mutované α -Gal, uvádí rozmanitý vliv konkrétních mutací na enzym a to od změny polarity až po změnu tvaru a objemu molekuly. V celkovém pohledu největší procento bodových mutací narušuje hydrofobní interakce proteinu, což je v rozporu s původním předpokladem, že hlavní příčinou nefunkčnosti proteinu budou mutace postihující aktivní centrum enzymu. Mutací pozměňujících aminokyselinové složení aktivního místa enzymu je ve skutečnosti pouze 10 %. FD je tedy lépe považovat za protein folding chorobu (Garman 2011; Filoni et al. 2011). Vývoj studie mutací ilustruje Tab. 2.

Tab. 2: Tabulka vývoje popisu nových mutací genu *GLA* a počet publikací s příslušnou tematikou

rok	missense	jiné	celkem	počet publikací
1995	52	49	101	20
2000	128	110	238	46
2005	257	192	449	86
2010	373	261	634	138
2015	457	314	771	184

Převzato Lukas et al. (Lukas et al 2015).

Vzhledem k diverzitě mutací není překvapením, že jednotlivé postižené rodiny většinou mají svou vlastní unikátní mutaci. Tato unikátnost značně znesnadňuje predikci vývoje onemocnění u pacientů. Jsou také známy případy vzniku *de novo* mutací a germinálního mosaicismu. Iemolo a kolektiv popsal případ muže manifestujícího klasickou formu FD. Po sekvenaci byla zjištěna záměna v nukleotidu 453 z G na C, a kodón původně překládaný v aspartát nově kódoval histidin. Příbuzní, však až na jednoho, všichni nesli wild type alelu genu. Jediný se stejnou alelou byla dcera probanda (Iemolo et al. 2014). Další případ *de novo* mutace u manifestujícího pacienta byl zaznamenán Pisanim et al. Hemizygot s mutací v nukleotidu c.901 C>T exonu 6 bez žádné rodinné historie choroby (Pisani et al. 2015). V roce 2005 byl na půdě Ústavu dědičných metabolických poruch v Praze Dobrovolným popsán případ dvou sester, nesoucích stejnou mutaci genu *GLA*. Rodiče pacientů neprojevovali žádné příznaky choroby. Co víc, po testování leukocytů z periferní krve ani po výtěru bukalní

sliznice a ani po močovém sedimentu nebyly u rodičů nalezeny mutované alely. Genotypovou analýzou byl zjištěn zdroj mutované alely u pacientek v paternální linii. Následné vyšetření spermatu otce prokázalo přítomnost wild type i mutované alely. Dobrovolný et al. vidí příčinu v germinálním mosaicismu otce a mutaci v zárodečném vývoji spermatogonií (Dobrovolný et al. 2005). Výše uvedené případy dokládají, že diagnostika by měla být založena na projevech pacienta. Chybějící rodinná anamnéza FD nijak nevylučuje.

2.3. Fenotyp a klinické projevy choroby

Klinické projevy choroby pramení z progresivního ukládání glykosfingolipidů ve tkáních postiženého. Vzhledem k výše popsané pestrosti genetických příčin, pacienti s FD nevykazují jednotný fenotyp nýbrž celou plejádu projevů v různé míře závažnosti a rychlosti progresu. Fenotypový projev FD je dělen na Klasickou variantu, která se týká především hemizygotů s minimální aktivitou alfa-galaktosidázy, pak na Kardiální a Renální variantu, projevující se u pacientů se zbytkovou aktivitou α -Gal. Medián dožití u hemizygotů se před zavedením dialýzy a transplantace ledvin pohyboval okolo 40 let, s vývojem medicíny se zvýšil na 50 let, což stále představuje zkrácení života průměrně o 20 let (Colombi et al. 1967; MacDermot et al. 2001).

2.3.1. Klasická varianta

Neuropatická bolest

Objevuje se průměrně ve věkovém rozmezí 4. až 12. roku, ale často se u pacientů objeví později. Bolest je spouštěna horkým počasím, fyzickou zátěží, příjmem alkoholu, horečkou, ale i bez známé příčiny. Lokalizace bolesti je převážně v končetinách, kde se projevuje pocitem pálení. Někteří pacienti mají zkušenost s idiosynkratickou bolestí. Bolest se může vyskytovat jako dlouhodobá konstantní bolest nebo jako náhlý nával prudkých bolestí, trvajících i několik dní. Medián skóre bolesti je, na stupnici 0-10, u hemizygotů 5. U některých pacientů bolesti s věkem ustanou, průměrně kolem 24. roku. U dětí se vyskytuje nepříjemná citlivost rukou a končetin během obvyklých dětských onemocnění (MacDermot et al. 2001).

Selhání ledvin

Míra i věk, při kterém dochází k selhání ledvin, je velmi variabilní mezi postiženými rodinami. Příčinou je hromadění glykosfingolipidů, hlavně Gb3,

v podocytech, epiteliálních buňkách a tubulárních buňkách distálního kanálku a Henleovy kličky. Nemoc se potom manifestuje proteinurií, poklesem glomerulární filtrace vedoucí k chronickému onemocnění ledvin a progresí ke konečnému renálnímu selhání. Patologické změny lze sledovat při biopsii již u dětí. Konečná fáze renálního selhání v dětství je však velmi vzácná (Najafian et al. 2011; Waldek & Feriozzi 2014).

Srdce a cévy

Zasažení srdce je častým symptomem u pacientů s FD. Srdeční projevy spočívají v koncentrické levé a pravé ventrikulární hypertrofii a zvětšení levého atria. Studie na padesáti postižených (věk 45 ± 2 roky, 50 % muži) odhalila zasažení srdce u 48 % pacientů, přičemž ve srovnání s kontrolami měli o 34 % zbytnělé levé ventriculium. U žen dochází dříve k fibrotickým změnám myokardu než hypertrofii (Kozor et al. 2016). Na samotné hypertrofii se podílí především papilární svalstvo (Kozor et al. 2015). Na ultrazvuku jsou patrné abnormality srdečních chlopní v podobě mitrální regurgitace a tloušťnutí aortální chlopně. Příčina abnormalit je shledávána jak v strádání v samotných chlopních, tak sekundárně deformací srdce (MacDermot et al. 2001; Lubor Goláň, ústní sdělení). Brachiální %FMD (flow-mediated dilation) je snížený, naopak IMT (intima media thickness) v karotidě je zvýšený (Rombach et al. 2012).

Gastrointestinální obtíže

Gastrointestinální obtíže se projevují hlavně abdominální bolestí, popisovanou jako kolika, či pálení v nižším abdomenu. Dále pak nauseou, zvracením, pocitem naplnění i po menším jídle nebo citlivostí kůže na břicho. Symptomy se objevují nejčastěji po jídle. Vyšetření bariem, gastrokopií nebo kolonoskopií se ukazuje u pacientů v pořádku. Symptomy se začínají projevovat již v dětském věku. Jako důsledek obtíží je snížený příjem potravy a nižší hodnoty BMI (FD pacienti gastrointestinálními komplikacemi vykazují BMI 18,6 oproti asymptomatickým nemocným s BMI 25,4 (MacDermot et al. 2001)). Příčina problému souvisí s poškozením cév zásobujících nervy inervující GIT (Pensabene et al. 2016; Lubor Goláň, ústní sdělení).

Angiokeratomy

Tato charakteristická vyrážka se objevuje mezi 14. až 16. rokem u hemizygotů. Léze sestávající z dilatovaných kapilár, které po tlaku nemizí, se vyskytují v oblasti

třísel. S věkem přibývají na četnosti, tmavnou, vystupují z kůže a rozšiřuje se místo jejich výskytu.

Další symptomy FD

Byly zaznamenány případy poruch sluchu, a to unilaterálně i bilaterálně ve frekvencích 2-3 kHz. Někteří pacienti popisují extrémní únavu a slabost. Do jisté míry dochází k dysmorfii obličeje. Dalším projevem onemocnění je částečná nebo celková hypohidróza, vedoucí k přehřívání a nesnášenlivost horka. Oční projevy představuje částečná neprůsvitnost rohovky, nepoškozující zrak. Cerebrovaskulární postižení zahrnuje časnou mrtvici či závrať (Desnick et al. 2007; MacDermot et al. 2001; Germain 2012). Symptomy FD a jejich frekvenci výskytu popisuje Tab. 3.

Tab. 3: Souhrnný výčet klinických projevů a jejich frekvencí výskytu u pacientů s FD

symptom	procento manifestujících	počet vyšetřených
Neuropatická bolest	77	93
Angiokeratomy	71	73
Hypohidróza	56	52
Konečná fáze renálního selhání	31	84
Proteinurie	84	44
Abnormální funkce ledvin	47	60
Bolest na hrudi	56	61
Levá ventrikulární hypertrofie	88	34
Abnormality srdečních chlopní	29	34
Gastrointestinální obtíže	69	70
Únava	62	61
Obličejová dysmorfie	56	41
Abnormální audiogram	78	23

Převzato MacDermot (MacDermot et al. 2001).

2.3.2. Další varianty

Kardiální varianta

Pacienti s kardiální formou FD jsou prakticky bez klinických příznaků po většinu života. Oproti klasické formě mají alespoň residuální množství aktivní α -Gal. Kardiální varianta je spojena s projevy jako jsou kardiomegalie a to ve formě hypertrofie levé komory a mezikomorového septa, dále pak kardiomyopatie. Tkáňové biopsie prokazují, že k hromadění Gb3 dochází v myokardu, nikoli však v endotelu cév (Elleder et al. 1990; Morrissey et al. 2011). To dokládá, že i nízké koncentrace enzymu

předchází poškození cév (Desnick et al. 2007). Vzhledem k tomu, že se kardiální forma projevuje poškozením srdce ve vyšším věku, je poměrně obtížně rozpoznávána. Plošný screening pacientů s nevysvětlenou levou ventrikulární hypertrofií ukazuje, že až 4 % případů jsou způsobena právě FD (Palecek et al. 2014).

Renální varianta

Byly popsány případy hemizygotů s omezením projevů FD na postižení ledvin. Renální formu poprvé rozlišil Nakao et al. Podobně jako u kardiální varianty mají pacienti residuální aktivitu α -Gal (přibližně mezi 1 až 10 % normálu) (Nakao et al. 2003). Plošný screening pacientů na dialýze v Japonsku odhalil prevalenci FD 0,02 % (Saito et al. 2015).

2.3.3. Manifestace FD u heterozygotních žen

Přesto, že FD je označována jako X-recesivní onemocnění, jsou heterozygotky často postiženy (Street et al. 2006). Heterozygotní ženy manifestují celé spektrum projevů FD od prakticky asymptomatických případů až po klasickou formu FD (Eng et al. 2007). U vysokého procenta žen se vyvíjí poškození vnitřních orgánů, především srdce a méně často ledvin (Hozumi et al. 1990). Ačkoli toto poškození se projevuje se zpožděním okolo deseti let proti hemizygotům. Z 1077 žen registrovaných v Fabry registry 69,4 % vykazovalo nějaké příznaky FD (www.fabrycommunity.com). Věkový medián prvního klinického projevu byl 13 let. 20 % žen ve věkovém mediánu 46 let vykazovalo cerebrovaskulární, kardiální, či renální příhody (Wilcox et al. 2008).

2.3.4. Příčiny variability fenotypů a korelace genotypu a fenotypu

Plné vysvětlení fenotypové šíře nebylo dosud publikováno a stále probíhá výzkum. Korelace genotypu a fenotypu byla četnými pracemi do jisté míry vyvrácena. Byly popsány případy, kdy přes známou mutaci indukující FD proband nevykazoval žádné příznaky a naopak, proband manifestující bez mutace v *GLA* (Colomba et al. 2015) Jsou známé mutace s různým efektem na fenotyp, např. mutace C142X způsobující jak klasickou tak renální variantu, či mutace R301Q s kardiálními, nebo renálními projevy (Altarescu et al. 2001; Topaloglu et al. 1999; Germain et al. 2002). Což však neznamená, že by se vztah mezi genotypem a fenotypem zcela ztrácel. Byla sesbírána souhrnná data z deseti publikací o 281 nositelích mutace v genu *GLA*. Data

zahrnují 235 mutací. U 26 z nich byl dohledán více než jeden nositel a mohla být zkontrolována korelace s fenotypem. Konflikt se prokázal u 5 mutací, tedy u 19,2 %. To dokládá, že mutační analýza může mnohé napovědět, ale v žádném případě není zcela průkazná (Altarescu et al. 2001; Eng et al. 1997; Germain et al. 2002; Inoue et al. 2013; Oder et al. 2016; Saito et al. 2015; Dobrovolny et al. 2005; Medical & Hospital 1997; Topaloglu et al. 1999; Shabbeer et al. 2006).

Závažnost jednotlivých mutací je různá. Nonsense mutace a větší přestavby či mutace aktivního centra jsou spojeny s těžší klasickou formou FD, mírnější varianty, jako kardiální a renální, jsou spojeny výlučně s missense mutacemi. Tyto poznatky naznačují i jiný zdroj variability než mutace v genu *GLA*. V jedné z předchozích kapitol byl zmíněn vliv krevní skupiny na počet hromadících se glykosfingolipidů. Krevní skupina B může posunout onemocnění k těžšímu projevu (Ledvinova et al. 1997). Někteří autoři zmiňují i environmentální faktory ovlivňující fenotyp, avšak nijak je nekonkretizují a jedná se spíše o spekulace (Nakao et al. 2003). FD je ze střádavých lysozomálních onemocnění, jako např. Tay-Sachsova choroba (Lew et al. 2015), porucha s relativně pomalou progresí. Což v důsledku zvýrazňuje individuální odlišnosti pacientů, jako residuální množství aktivního enzymu nebo genetické predispozice zasažených orgánů. Variabilita klinických projevů je ještě výraznější u heterozygotních žen. Tuto skutečnost osvětlí řádky následujících kapitol.

2.4. Diagnostika a možnosti léčby

2.4.1. Diagnostika

Včasná diagnostika FD je klíčová pro nasazení vhodné terapie, která může předejít projevům choroby. Zásadní je rozpoznání symptomů ošetřujícím lékařem, které ale pro šíří projevů je velmi obtížné a často vede ke špatné diagnóze. Zpětnou analýzou bylo zjištěno, že v Německu dochází ke zpoždění diagnózy u mužů o 13 let a u žen dokonce o 17 let (Hoffmann & Mayatepek 2009).

Po klinickém podezření na onemocnění je u pacienta změřena aktivita enzymu α -Gal. Stanovení aktivity je základním testem, avšak u heterozygotek nemusí být vůbec vypovídající, kvůli náhodné X inaktivaci. Následuje sekvenace genu *GLA* a mutační analýza. Mutační analýza může prozradit, jakým způsobem se u pacienta onemocnění projeví, přímá spojitost mezi genotypem a fenotypem je však problematická (Gal et al. 2011).. Pro výše uvedené je možné tvrdit, že FD se pravděpodobně v populaci

vyskytuje častěji, než je předpokládáno. Stejně tak ještě není vytvořena metodika, která by s jistotou dokázala vést k 100% diagnóze.

Stanovení aktivity α -Gal je prováděno na syntetickém substrátu 4-methylumbellylferyl- α -D-galaktosidu (Kint 1970). Další možností stanovení je využití hmotnostní spektrometrie (Zhang et al. 2010). V obou případech je nutné inhibovat α -galaktosidázu B α -N-acetylgalaktosaminem, tento isoenzym může vykazovat afinitu ke stejným substrátům jako α -Gal, a tak způsobit falešnou negativitu testu (Gal et al. 2011). Dále je doporučováno použít pro kontrolu kvality vzorku β -galaktosidázu. Jako vzorek nejčastěji slouží leukocyty z periferní krve. Další možností je plasma, avšak je nutné použít silnější acetátový pufr a při inkubaci plasmy dochází k snížení aktivity enzymu až na 20 %. Použití fibroblastů jako materiálu pro enzymovou analýzu není příliš využíváno, hlavně pro invazivní způsob jejich získání. Jelikož vyšetření aktivity α -Gal není relevantní pro ženy heterozygotky (enzymologie nevychází u 25 % žen), je nutné v jejich případě přistoupit k mutační analýze (Helena Poupětová, ústní sdělení). K identifikaci mutace by mělo dojít i v případě pozitivního výsledku u hemizygotů. Analýza se sestává ze sekvenace exonů a rozhraní exon/intron. Tímto postupem může však dojít k přehlédnutí některých chorobu způsobujících mutací, jako například komplexnějších změn v oblasti intronů, jedná se ale pouze o 3 % případů (Gervas-Arruga et al. 2015). Další problém vyvstává v případě rozsáhlé delecce celého exonu u heterozygotek. Tento nedostatek analýz založených na PCR vhodně doplňuje molekulární technika Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) (Stuppia et al. 2012). MLPA je používána u více monogenních onemocnění k vyloučení rozsáhlejších genových přestaveb a je doporučována i v případě, že se nenajde mutace indukující FD klasickou metodou. Avšak nejnovější studie z roku 2015 ukazuje, že MLPA může selhat a to i v případě FD hemizygotů (Ferri et al. 2015). Vždy by měli pacienti mít možnost genetického poradenství. Studie rodokmenu je účinný nástroj, neboť frekvence *de novo* mutací se pohybuje mezi 3 - 10 % a tedy minimálně 90 % pacientů má FD v rodině (Gal et al. 2011).

Po potvrzení diagnózy, získává na důležitosti hodnocení postupu nemoci, efektivity léčby a stav pacienta. Původní představa, že marker, který by plnil tuto funkci, bude globotriaosylceramid, nedošla naplnění. Pro některé mutace např. N215S nedochází k zvýšení jeho koncentrace. Současně u mnohých heterozygotek koncentrace Gb3 nebyly detekovány vyšší než u zdravých kontrol (Young et al. 2005). Jako perspektivnějším markerem byl studován globotriaosylsfinhosin (lyso-Gb3). Vznik

lyso-Gb3 ještě není plně vysvětlen, pravděpodobně vzniká sérií glykosylací sfingoidního substrátu. Relace mezi lyso-Gb3 a FD se zdá být přímější než u Gb3, jak dokládá studie pro mutaci 919G>A (Liao et al. 2013). Dále bylo zjištěno, že může inhibovat samotnou α -Gal a stimulovat buňky hladké svaloviny k proliferaci, stejně tak může mít vliv na levou ventrikulární hypertrofii, což je častý symptom pacientů s FD (Aerts et al. 2008). Přednosti lyso-Gb3 ještě zvýšila citlivější metoda nano-Liquid Chromatografie-tandem mass spektrometry (nano-LC-MS/MS) navržená Sueoka et al. Výhodou metody je, že si vystačí s nižšími koncentracemi markeru, je tak citlivější a odhalí i případy pacientů s pozdním nástupem choroby nebo heterozygotních žen, u kterých pro jejich nevyzpytatelnost jiné metody selhávají (Sueoka, Ichihara, et al. 2015). Aktuálnější výzkum využitelnost lyso-Gb3 jako markeru pro plošné využití vyvrací, Lukas a kol. na vzorku 73 pacientu nenašel korelaci poškození a úrovní lyso-Gb3 (Lukas et al. 2015). Vzhledem k tomu, že se FD velmi často projevuje poškozením ledvin, je snaha nalezení optimálního markeru, který by dysfunkci ledvin blíže specifikoval. Lepedda et al. zjistil zvýšení hodnot bikuninu v moči. Studie tedy navrhuje bikunin jako vhodný biomarker pro včasné rozpoznání zasažení ledvin (Lepedda et al. 2013). Potvrzující studie na větším počtu pacientů zatím neproběhly.

Prenatální diagnostika se z etických důvodů bere v potaz pouze u hemizygotů. Vyšetření spočívá v analýze aktivity α -Gal v buňkách získaných v 9. až 10. týdnu z choriových klků, či kultivací buněk odebraných amniocentézou v 15. týdnu (Desnick 2007), (Mahmud 2014).

2.4.2. Terapie

Terapeutický přístup k pacientům s FD stojí na podpůrné léčbě symptomů a ideálně jejich prevenci.

Snižování dopadů FD začíná u úpravy životního stylu. Pacienti by se měli vyhýbat spouštěčům bolestí, jako je například intenzivní fyzická aktivita (MacDermot et al. 2001). Klasická předepisovaná analgetika, s výjimkou opiátů, u FD nezabírají (Gordon et al. 1995). Doporučovanými terapiemi tak jsou difenyl hydantoin, Carbamazepin, Gabapentin, či již zmíněné opiáty jako například morfin (Lenoir et al. 1977; Desnick et al. 2007; Gordon et al. 1995).

Pacienti se zasaženými ledvinami jsou léčeni dialýzou, v konečné fázi je nutná transplantace ledviny. Úspěšná transplantace napravuje renální obtíže. Allograft si

zachovává schopnost metabolizovat glykosfingolipidy, ale korekce jejich stádání v jiných orgánových soustavách nebyla pozorována (Erten et al. 1998; Mosnier et al. 1991).

Od roku 2001 je možné FD léčit specificky pomocí enzymové suplementace (Eng et al. 2001). V současné době jsou na trhu dva enzymy, agalsidáza α (pod obchodním názvem Replagal) a agalsidáza β (pod obchodním názvem Fabrazym). Terapeutika se liší způsobem produkce. Replagal je připravován lidských buněčných kulturách, zatímco Fabrazym využívá buněk křečka čínského. Rozdíly lze nalézt na úrovni glykosylace, syalizace a fosforylace manósových zbytků enzymu. Stejně tak je odlišné dávkování. (Desnick et al. 2007; Germain et al. 2015) V roce 2015 vyšla publikace doporučující Fabrazym pro zhoršení u pacientů po přechodu na Replagal (Politei et al. 2015). Starší práce s větším počtem pacientů však žádnou relevantní změnu neuvádí (Tsuboi & Yamamoto 2012). Výběr verze léku je tedy na uvážení lékaře a na účinnosti u konkrétního pacienta (Lubor Golán, ústní sdělení).

Mezi léčebné postupy patří dále plazmaferéza, tedy mimotělní filtrace plazmy, která se však plošně neprosadila (Pyeritz et al. 1980). Abe et al. publikoval možné terapeutické využití specifických inhibitorů syntézy prekurzorů stádajících se sfingolipidů. A ačkoli testy na lymfoblastech odebraných pacientům byly úspěšné, vliv inhibitorů *in vivo* nebyl plně prověřen (Abe et al. 2000).

Pro některé mutace, ovlivňující stabilitu α -Gal, se ukazuje jako možný způsob léčby pomocí kompetitivních inhibitorů α -Gal. Tím se zvýší stabilita komplexu enzym-inhibitor a nedochází k degradaci v endoplazmatickém retikulu. Pacientům je podávána pravidelně intravenózně galaktóza v množství 1 mg/kg. Účinnost léčby je limitována pouze na omezený typ mutací, např. A156V, LV166V, G328R (Okumiya et al. 1995; Frustaci et al. 2001).

Vzhledem k povaze FD a existenci cross-korekce ukazuje se jako velmi slibná genová terapie (Medin et al. 1996). Na tomto poli probíhá výzkum ideálního vektoru, vhodného pro FD (Ruiz de Garibay et al. 2013).

3. Vztah X inaktivace k FD

3.1. X inaktivace

Pohlaví lidí, stejně jako u jiných savců, je určeno kombinací pohlavních chromozomů. Ženy jsou nositelkami dvou X gonozomů a muži nesou gonozomy X a Y (Lyon 1961). Inaktivace jednoho ze dvou chromozomů X u žen zajišťuje vyrovnání genové dóze u obou pohlaví, díky čemuž nemají geny X chromozomu u žen dvojnásobný efekt (Chow et al. 2005; Starmer & Magnuson 2009). Samotný proces X inaktivace (XCI) není stále zcela objasněn a ukazuje se, že myší model neodpovídá zcela skutečnosti u člověka (Briggs & Reijo Pera 2014). XCI probíhá odlišně v extraembryonálních buňkách trofoektodermu, kde dochází k preferenčnímu umlčování paternálního chromozomu (Norris et al. 1994). V somatických buňkách vyvíjejícího se embrya pak dochází k náhodné inaktivaci. Ačkoli v mechanismu inaktivace jsou stále mezery v poznání, obecný mechanismus je pro potřeby této práce znám. Inaktivaci předchází počítání poměru gonozomů a autozomů. Na počítání a zahájení inaktivace se podílí X inaktivační centrum (Xic) lokalizované na Xq13.3 (Naumova et al. 1998). Pokusy prokázaly, že chromozomy bez Xic nejsou schopny inaktivace (Belmont 1996; Cerase 2016). Jedním z ústředních genů Xic je gen *XIST* kódující 17 kbp dlouhou nepřekládanou RNA. *Xist* RNA je exprimována pouze na umlčovaném gonozomu (Xi), se kterým interaguje a indukuje přestavbu struktury chromatinu (Brown et al. 1992; Engreitz et al. 2013). Odpověď na otázku, jakým způsobem je množství *Xist* regulováno, dává práce Jonkerse a kol. v podobě molekuly Rnf12, která upreguluje *Xist* v buňkách s více X gonozomy (Jonkers et al. 2009; Gendrel & Heard 2011). *Xist* RNA není jedinou nekódující RNA účastnící se inaktivace, další důležitou molekulou se zdá být *XACT* RNA, která se váže na aktivní gonozom (Xa) a v nepřítomnosti *Xist* také Xi. Toto by mohl být mechanismus ochrany před umlčením také druhého gonozomu u člověka (Vallot et al. 2013). Dřívější model vycházející z pokusů na myších, totiž tuto funkci přisuzoval *TSIX* RNA v roli antisense represoru, avšak nedávné studie tento vztah u člověka nepotvrdily (Migeon et al. 2002; Migeon et al. 2001).

Na úrovni DNA dochází k celé řadě epigenetických změn spojených s umlčováním genů. Významné rozdíly mezi Xi a Xa se ukazují v metylaci CpG ostrovů, které jsou na Xi methylovány (Bernardino et al. 1996; Kelkar & Deobagkar 2010; Tribioli et al. 1992; Sharp et al. 2011). Významné se ukazují i změny

v histonovém kódu. Zde stojí zmínit metylaci lysinů 9 a 27 histonu H3 a ubiquitinilaci lysinu 119 histonu H2A na Xi (Mermoud et al. 2002; Fang et al. 2004), histony H3 a H4 jsou deacetylovány, což dále snižuje transkripční aktivitu na Xi (Belyaev et al. 1996; Jeppesen & Turner 1993).

Umlčení Xi neprobíhá v plném rozsahu, některé geny inaktivaci unikají (Berletch et al. 2010). Jedná se předpokladem o 25 % genů, jde především o geny v homologických oblastech s Y gonozomem na krátkých raménkách X, avšak i mimo ně (Brown et al. 1997; Carrel & Willard 2005; Berletch et al. 2010; Miller & Willard 1998). Způsob úniku příslušných genů je v současnosti intenzivně zkoumán. Geny, které XCI unikají, se neúčastní interakcí s *Xist* RNA, ale přesto umožňují její další šíření po chromozomu (Engreitz et al. 2013; Briggs & Reijo Pera 2014).

3.3. X zešikmení

Proces X inaktivace se zdá být obecně náhodný, ovšem konečný poměr inaktivovaných chromozomů v těle pouhou souhrou náhody být nemusí. Jednak jsou známy mutace, které vedou k preferenční inaktivaci mutované alely (Plenge et al. 1997). Spekulace na téma preferenčního umlčování u FD se objevila, byla však vyslovena na podkladě dat získaných od pouze jediné ač početné rodiny a později nebyla potvrzena (Ropers et al. 1977). Stejně tak vliv proliferace nebo selekčních tlaků na původně malé buněčné populace může mít vliv na Xi, jak bylo také nicméně pozorováno na hematopoetických stem buňkách. Vliv senescence na poměr XCI v hematopoetických buňkách není nijak výrazný, přesto je po 30. roku patrný (Busque et al. 1996; Gale et al. 1997; Tonon et al. 1998; Hatakeyama et al. 2004).

Renault et al. dále dodává, že empirická data poměru XCI odpovídají spíše modelu geneticky podmíněné inaktivace než modelu čiré náhody. Je tedy možné, že budoucnost přinese více o vlivu genů na X inaktivaci a zešikmení (Renault et al. 2013).

Minimálně vlivem statistické náhody může dojít k zešikmení poměru inaktivovaných gonozomů ve prospěch jednoho z nich (Minks et al. 2008; Wang et al. 2014). Tento poměr podléhá normálnímu rozdělení. Hranice, od které je poměr označován jako zešikmený, je 75 % buněk s inaktivovanou stejnou alelou. Od 90 % je řeč o extrémním zešikmení (Amos-Landgraf et al. 2006). V populaci se tedy poměr X inaktivace pohybuje mezi 50 – 100 %, podrobnější hodnoty jsou uvedeny v Tab. 4 (Amos-Landgraf et al. 2006; Belmont 1996). Zajímavým aspektem je vývoj zešikmení

v průběhu života. Zdá se, že srovnávací studie X inaktivace u novorozenců a dospělých dokládá vývoj X zešikmení s věkem k jedné alele. To by mohlo mít i implikaci k FD v případě, že by se jednalo o mutovanou alelu (Amos-Landgraf et al. 2006; Sharp et al. 2000; Chagnon et al. 2005). Je však třeba zmínit i publikace, které zmíněnou korelaci mezi věkem a zešikmením nepozorovaly, avšak byl studován řádově menší počet žen (Racchi et al. 1998).

Tab. 4: Vztah věku a zešikmení XCI

	počet	průměr	SD	Procento populace s příslušným poměrem X inaktivace		
				< 20 : 80/ > 80 : 20	< 10 : 90/ > 90 : 10	< 5 : 95/ > 95 : 5
Novorozenci	590	50:50	15.4	4.9	0.5	0.2
Dospělí	415	48:52	19.3	14.2	3.6	1.7
Celkem	1005	49:51	17.2	8.8	1.8	0.8

Převzato Amos-Landgraf (Amos-Landgraf et al. 2006)

Zešikmení X inaktivace je dááno do souvislosti s celou řadou geneticky podmíněných onemocnění. Ne vždy se souvislost potvrdí, jako například v případě rakoviny vaječníku, či rakoviny prsu (Struewing et al. 2006). Ale kupříkladu revmatoidní artritida, autoimunitní poškození štítné žlázy nebo mukopolysacharidósa druhého typu je poměrem Xi ku Xa ovlivněna (Chabchoub et al. 2009; Tuschl et al. 2005). O vlivu zešikmení je spekulováno i v případě FD.

3.4. FD a zešikmení

K dnešku publikované práce, zda-li má na projev FD u žen vliv poměr XCI, dochází k opačným závěrům. Výzkum na příslušné téma má svá specifika a úskalí, která k rozporuplným výsledkům přispívají. Z toho důvodu je dobré se v krátkosti o několika zmínit.

Jednou z prvních problematických oblastí je zvolení vyšetřované tkáně. Nejvyužívanější je v tomto směru odběr periferní krve (Gal et al. 2011), zde musí být zohledněno možné zkreslení věkovou strukturou vyšetřované skupiny, neboť, jak bylo zmíněno výše, X zešikmení se může v hematopoetických buňkách měnit směrem k výraznějšímu zešikmení (Hatakeyama et al. 2004). Mezi další možné vzorkové materiály patří moč, stěr bukalní sliznice, biopsie kůže a vlasový folikul. Studie zkoumající průkaznost uvedených zdrojů materiálu, uvádí stěr bukalní sliznice, jako nejvhodnější materiál, z důvodu své vysoké míry shody s nepřístupnými tkáněmi a

neinvazivnosti odběru. Bukální stěry mají vyšší vypovídající hodnotu i ve srovnání s krví (de Hoon et al. 2015).

Dalším úskalím je volba metody stanovení XCI. V praxi se využívají dva přístupy, a to metody na základě analýzy methylace a následné PCR, či stanovení na základě poměru transkriptů X vázaného genu. V prvním řešení, tedy využití odlišnosti methylace X_m a X_p , se nejčastěji provádí analýza methylace lidského androgenního receptoru lokalizovaného v oblasti Xq11-12 (HUMARA). Metoda spočívá v selektivním naštěpení nemethylované alely s následnou amplifikací pomocí PCR a vyhodnocení na elektroforéze (Allen et al. 1992; Wolf et al. 1984; Brown et al. 1989). Limitace metody spočívají v nutnosti korelace mezi methylací testované oblasti a XCI. Dále, bylo publikováno, že methylace v izolovaném CpG ostrově nemusí plně korespondovat s XCI celého chromozomu (Swierczek et al. 2016). Proto se zdají být metody založené na kvantifikaci transkripce v buňkách pomocí nových technik využívající pyrosekvenace pro studium XCI vhodnější. Tyto metody umožňují vysoce přesnou alelově specifickou kvantifikaci X-kódovaného transkriptu, a tedy spolehlivé určení poměru XCI (Mossner et al. 2013).

Specifikem FD je vysoká variabilita mutací v genu *GLA*. Přesto, že korelace mezi konkrétními mutacemi a závažností fenotypových projevů není úplně jasná, je nutné vliv samotných mutací zohlednit, pokud má korelace XCI s fenotypem být spolehlivá. Terapie, zejména v podobě enzymové suplementace, musí být také brána v potaz.

Ve světle zmíněných skutečností se nyní podívejme na publikace studující vliv XCI na závažnost fenotypu u žen. Velmi hodnotným je popis monozygotických dvojčat, heterozygotek. Jedno z dvojčat bylo asymptomatické a druhé manifestovalo příznaky FD. Po vyšetření rodičů byla zjištěna *de novo* mutace u otce. Následná analýza odhalila extrémní X zešikmení 97:3 ve prospěch X_p u postiženého dvojčete, zatímco u zdravého byl poměr 100:0 ve prospěch X_m . Autoři studie s přihlédnutím k tomu, že jde o monozygotická dvojčata, vysvětlují rozdílnost fenotypu v odlišnosti X zešikmení (Redonnet-Vernhet et al. 1996). V roce 2003 byla opublikována práce Morroneho a kol. popisující X inaktivaci ve vztahu k FD u čtyř příbuzných žen. Opět u dvou stížených žen bylo zjištěno posunutí ve směru mutované alely a u druhých bez příznaků byla aktivnější wild type alela, tedy data ukazující na korelaci XCI a fenotypu (Morrone et al. 2003). Závislost projevů na zešikmení u většího počtu žen byla popsána v roce 2004. Studie se účastnilo 39 žen, u kterýchžto 11 bylo se zešikmením XCI. U desíti z nich se

jednalo o zešíkmení ve prospěch mutované alely, u jedné šlo o opačný poměr XCI. Následné srovnání klinických projevů, i s přihlédnutím k věku, opět dokazovalo korelaci. Limitací práce je nízký počet žen s preferenčně umlčenou mutovanou alelou, studie se účastnila pouze jedna (Dobrovolny et al. 2005). Proti těmto studiím se staví výsledky práce Maiera et al., který na vzorku 28 heterozygotních žen nepozoruje žádnou odchylku od normálního rozdělení XCI. U šesti žen, které všechny nesly příznaky choroby, byly čtyři s aktivnější wild type alelou *GLA* genu a dvě se zvýhodněnou mutovanou alelou (Maier et al. 2006). Zmíněná práce sice srovnává vzorec XCI se stejně starými kontrolami, ovšem věk jednotlivých žen neuvádí. Není tak možné vyloučit, zda uvažuje i o korelaci fenotypu a věku pacientek. Další práci stavící se na stranu proti korelaci je studie z roku 2012 Elstein a kol. Vztah mezi fenotypem, věkem a residuální aktivitou α -Gal zkoumali na kohortě 77 žen ve věkovém rozmezí 45 až 60 let. Výsledky jejich práce nenaznačují žádnou závislost studovaného vztahu. Problémem práce je relativně úzký věkový profil, který spíše odpovídá skutečnosti, že ve vyšším věku jsou do jisté míry zasaženy všechny heterozygotky (Elstein et al. 2012). Zatím poslední publikované výsledky na toto téma se ovšem opět přiklánějí k tomu, že zde spojitost mezi XCI a fenotypem je. Echevarria et al. se pokusil tento vztah buď potvrdit, či vyvrátit. Bylo vyšetřeno 56 žen, kterým byly odebrány bukalní stěry, krev, moč a provedena biopsie kůže. U všech odebraných materiálů byl potvrzen vztah XCI a aktivity α -Gal, vyjma vzorků kůže, kde se korelace neprokázala. Studie výsledky očistila i o možný vliv mutací na fenotyp. Nebyl zakalkulován vliv ERT, který však mohl hloubku závislosti pouze prohloubit (Echevarria et al. 2015). Problémem uvedených publikací může být únik asymptomatických heterozygotek ze studovaných populací. Vzhledem k obtížné diagnostice, obzvláště u žen, je toto opodstatněná domněnka (Hoffmann & Mayatepek 2009). Rozporuplnost závěrů si žádá další výzkum.

4. Závěr

FD je závažné progresivní onemocnění s nezpochybnitelným vlivem na kvalitu a délku života. Specifikem FD je vysoká variabilita klinického projevu (MacDermot et al. 2001). Úplné vysvětlení zmíněné variability nebylo dosud publikováno. Fenotyp je pravděpodobně odvislý od kombinace různých faktorů. V mé práci jsem se zaměřil na vztah genotypu a fenotypu, a zejména vliv zešikmení X na projev u žen. K datu dopsání bakalářské práce bylo známo 845 mutací vedoucích k FD (www.hgmd.cf.ac.uk). Mutace mají různou míru závažnosti a jsou tak jedním ze zdrojů nebývalé šíře, s jakou se FD manifestuje. Nabízí se tedy otázka, do jaké míry jsou mutace s fenotypem spjaty. Rozebráním dat z deseti prací bylo prokázáno, že tato korelace má vážné limity (Altarescu et al. 2001; Eng et al. 1997; Germain et al. 2002; Inoue et al. 2013; Oder et al. 2016; Saito et al. 2015; Dobrovolny et al. 2005; Medical & Hospital 1997; Topaloglu et al. 1999; Shabbeer et al. 2006). Ačkoli jsou mutace vedoucí k různým klinickým projevům známé, nebyly dosud publikovány žádné práce snažící se je komplexněji kvantifikovat. Je zde tedy prostor pro hlubší metaanalýzy, ze kterých by bylo možné sestavit statisticky robustní databáze o mutacích v genu *GLA*. Tato databáze by mohla umožnit snazší charakterizaci mutace pacienta a ideálně zlepšit terapeutický přístup.

FD je klasifikována jako X vázaná choroba. X vázané choroby jsou typicky spojené s postižením hemizygotů a identifikací heterozygotek jako přenašeček. Situace u FD je však jiná, neboť k manifestaci dochází i u žen, byť heterozygotní ženy mají klasicky mírnější formu FD s pozdějším nástupem (von der Lippe et al. 2016). Dle informací uvedených v Fabry registry celých 69,4 % žen vykazuje alespoň jeden symptom onemocnění (www.fabrycommunity.com). V mé práci jsem se pokusil objasnit, proč se pacientky v manifestaci liší od hemizygotů a jakou roli v tom sehrává zešikmení X inaktivace. Výsledky prací, na téma vlivu XCI na závažnost choroby, jsou rozporuplné. To je způsobeno pravděpodobně malými velikostmi studovaných populací, nevhodně zvolenou diagnostickou metodou, či zanedbáním jiných korelujících vlivů. Poslední studie této problematiky však význam XCI do jisté míry potvrzuje (Echevarria et al. 2015).

Výzkum FD by se měl dále soustředit na plné objasnění všech souvislostí s fenotypovým projevem. V současnosti také stále neexistuje relevantní marker, který by spolehlivě monitoroval progresi onemocnění. Oboje zmíněné by značně zjednodušilo postup léčby a predikci vývoje poruchy.

5. Seznam použitých zkratk

FD	Fabryho choroba
α -Gal	α -galaktosidáza A
%FMD	flow-mediated dilatation
IMT	intima media thickness
BMI	body mass index
GIT	gastro-intestinální trakt
MLPA	multiplex ligation probe-dependent amplification
PCR	polymerase chain reaction
nano-LC-MS/MS	nano-Liquid Chromatography-tandem mass spektrometry
lyso-Gb3	globotriaosylsfinosin
Gb3	globotriaosylceramid
XCI	X chromosome inactivation
Xic	X inactivation centrum
Xi	Inaktivní X chromozom
Xa	Aktivní X chromozom
Xm	maternální X chromozom
Xp	paternální X chromozom
ERT	enzyme replacement therapy
HUMARA	human androgen receptor analysis

6. Seznam použité literatury

- Abe, A. et al., 2000. Glycosphingolipid depletion in fabry disease lymphoblasts with potent inhibitors of glucosylceramide synthase. *Kidney international*, 57(2), pp.446–454.
- Aerts, J.M. et al., 2008. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), pp.2812–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2268542&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Allen, R.C. et al., 1992. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *American journal of human genetics*, 51, pp.1229–39. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1682906&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Altarescu et al., 2001. Identification of fifteen novel mutations and genotype – phenotype relationship in Fabry disease. , 22(7), pp.46–51.
- Amos-Landgraf, J.M. et al., 2006. X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. *American journal of human genetics*, 79(3), pp.493–9. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002929707627487>.
- Asfaw, B. et al., 2002. Defects in degradation of blood group A and B glycosphingolipids in Schindler and Fabry diseases. *Journal of lipid research*, 43(7), pp.1096–1104.
- Belmont, J.W., 1996. Genetic control of X inactivation and processes leading to X-inactivation skewing. *American journal of human genetics*, 58(6), pp.1101–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1915050&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Belyaev, N., Keohane, A.M. & Turner, B.M., 1996. Differential underacetylation of histones H2A, H3 and H4 on the inactive X chromosome in human female cells. *Human genetics*, 97(5), pp.573–578.
- Berletch, J.B., Yang, F. & Distèche, C.M., 2010. Escape from X inactivation in mice and humans. *Genome Biology*, 11(6), p.213. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2911101/pdf/gb-2010-11-6-213.pdf><http://genomebiology.com/2010/11/6/213>.
- Bernardino, J. et al., 1996. DNA methylation of the X chromosomes of the human female: an in situ semi-quantitative analysis. *Chromosoma*, 104(7), pp.528–535.
- Beutler, E. & Kuhl, W., 1972. Purification and Properties of Human α -Galactosidases. *The Journal of Biological Chemistry*, 247(22), pp.7195–7201.
- Bishop, D.F. & Desnick, R.J., 1981. Affinity purification of α -galactosidase A from human spleen, placenta, and plasma with elimination of pyrogen contamination. Properties of the purified splenic enzyme compared to other forms. *Journal of Biological Chemistry*, 256(3), pp.1307–1316.
- Bishop, D.F., Kornreich, R. & Desnick, R.J., 1988. Structural organization of the human α -galactosidase A gene: further evidence for the absence of a 3' untranslated region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(11), pp.3903–3907.
- Briggs, S.F. & Reijo Pera, R.A., 2014. X chromosome inactivation: recent advances and

- a look forward. *Current opinion in genetics & development*, 28, pp.78–82.
Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4339055&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Brown, C.J. et al., 1989. Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *American journal of human genetics*, 44(2), pp.264–9.
- Brown, C.J. et al., 1992. The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell*, 71(3), pp.527–542.
- Brown, C.J., Carrel, L. & Willard, H.F., 1997. Expression of genes from the human active and inactive X chromosomes. *American journal of human genetics*, 60(6), pp.1333–1343.
- Busque, B.L. et al., 1996. Nonrandom X-Inactivation Patterns in Normal Females: Lyonization Ratios Vary With Age. *Blood*, 88, pp.59–66.
- Carrel, L. & Willard, H.F., 2005. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*, 434(7031), pp.400–404.
- Cerase, A., 2016. X chromosome inactivation: The importance of being inactive. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 56(August), pp.1–2. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952116301884>.
- Colomba, P. et al., 2015. Fabry disease, a complex pathology not easy to diagnose. *Cardiogenetics*, 5(1). Available at: <http://www.pagepressjournals.org/index.php/cardiogen/article/view/5612>.
- Colombi, A. et al., 1967. Angiokeratoma corporis diffusum--Fabry's disease. *Helvetica medica acta*, 34(1), pp.67–83.
- Dawson, G., Kruski, A.W. & Scanu, A.M., 1976. Distribution of glycosphingolipids in the serum lipoproteins of normal human subjects and patients with hypo- and hyper- lipidemias. *Journal of Lipid Research*, 17, pp.125–131.
- Desnick, R.J. et al., 2007. Fabry Disease, an Under-Recognized Multisystemic Disorder: Expert Recommendations for Diagnosis, Management, and Enzyme Replacement Therapy. *Annals of Internal Medicine*, 147(2).
- Desnick, R.J., 2007. Prenatal diagnosis of Fabry disease. *Prenatal Diagnosis*, 27(8), pp.693–694. Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/pd.1767>.
- Dobrovolny, R. et al., 2005. Relationship between X-inactivation and clinical involvement in Fabry heterozygotes. Eleven novel mutations in the alpha-galactosidase a gene in the Czech and Slovak population. *Journal of Molecular Medicine*, 83(8), pp.647–654.
- Dobrovolný, R. et al., 2005. Recurrence of Fabry disease as a result of paternal germline mosaicism for alpha-galactosidase A gene mutation. *American Journal of Medical Genetics*, 134 A(1), pp.84–87.
- Echevarria, L. et al., 2015. X-chromosome inactivation in female patients with Fabry disease. *Clinical Genetics*, pp.1–11.
- Elleder, M. et al., 1990. Cardiocyte storage and hypertrophy as a sole manifestation of Fabry's disease. Report on a case simulating hypertrophic non-obstructive cardiomyopathy. *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology*, 417(5), pp.449–455.
- Elstein, D. et al., 2012. X-inactivation in Fabry disease. *Gene*, 505(2), pp.266–268. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.06.013>.
- Eng, C.M. et al., 1997. Fabry Disease : Thirty-Five Mutations in the a-Galactosidase A Gene in Patients with Classic and Variant Phenotypes. *Molecular Medicine*, 3(3),

- pp.174–182.
- Eng, C.M. et al., 2007. Fabry disease: baseline medical characteristics of a cohort of 1765 males and females in the Fabry Registry. *Journal of inherited metabolic disease*, 30(2), pp.184–192.
- Eng, C.M. et al., 2001. Safety and efficacy of recombinant human alpha-galactosidase A--replacement therapy in Fabry's disease. *The New England journal of medicine*, 345(1), pp.9–16.
- Engreitz et al., 2013. The Xist lncRNA exploits three-dimensional genome architecture to spread across the X-chromosome. *Science*, 341(6147).
- Erten, Y. et al., 1998. A case of Fabry's disease with normal kidney function at 10 years after successful renal transplantation. *Transplantation proceedings*, 30(3), pp.842–843.
- Fang, J. et al., 2004. Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(51), pp.52812–52815.
- Ferri, L. et al., 2015. Pitfalls in the detection of gross gene rearrangements using MLPA in Fabry disease. *INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL CHEMISTRY*, 452(October 2015), pp.82–86. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898115300309>.
- Filoni, C. et al., 2011. FUNCTIONAL STUDIES OF NEW GLA GENE MUTATIONS LEADING TO CONFORMATIONAL FABRY DISEASE. , 1802(2), pp.247–252.
- Frustaci, A. et al., 2001. Improvement in Cardiac Function in the Cardiac Variant of Fabry's Disease with Galactose-Infusion Therapy. *The New England journal of medicine*, 345(1), pp.25–32.
- Gal, A., Hughes, D.A. & Winchester, B., 2011. Toward a consensus in the laboratory diagnostics of Fabry disease - Recommendations of a European expert group. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(2), pp.509–514.
- Gale, R.E. et al., 1997. Acquired skewing of X-chromosome inactivation patterns in myeloid cells of the elderly suggests stochastic clonal loss with age. *British Journal of Haematology*, 98(3), pp.512–519. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2141.1997.2573078.x>.
- Garman, S.C., 2011. Structure–function relationships in α -galactosidase A. , 96(455), pp.6–16.
- Garman, S.C. & Garboczi, D.N., 2004. The molecular defect leading to fabry disease: Structure of human alfa-galactosidase. *Journal of Molecular Biology*, 337(2), pp.319–335.
- Gendrel, A.-V. & Heard, E., 2011. Fifty years of X-inactivation research. *Development*, 138(23), pp.5049–5055. Available at: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.068320>.
- Germain, D.P., 2012. Fabry disease. *British Journal of Cardiology*, 19(1), p.220. Available at: <http://www.ojrd.com/content/5/1/30>.
- Germain, D.P. et al., 2002. Fabry disease: twenty novel alpha-galactosidase A mutations and genotype-phenotype correlations in classical and variant phenotypes. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 8(6), pp.306–12. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2039995&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Germain, D.P. et al., 2015. Ten-year outcome of enzyme replacement therapy with agalsidase beta in patients with Fabry disease. *Journal of medical genetics*, pp.1–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25795794>.
- Gervas-Arruga, J. et al., 2015. Increased glycolipid storage produced by the inheritance

- of a complex intronic haplotype in the α -galactosidase A (GLA) gene. *BMC genetics*, 16(1), p.109. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26334996> \n <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4558912>.
- Gordon, K.E., Ludman, M.D. & Finley, G.A., 1995. Successful treatment of painful crises of Fabry disease with low dose morphine. *Pediatric neurology*, 12(3), pp.250–251.
- Grzeschik, K. et al., 1972. Cytological Mapping of Human X-Linked Genes by Use of Somatic Cell Hybrids Involving an X-Autosome Translocation. , 69(1), pp.69–73.
- Hatakeyama, C. et al., 2004. The dynamics of X-inactivation skewing as women age. *Clinical Genetics*, 66(4), pp.327–332.
- Hoffmann, B. & Mayatepek, E., 2009. Fabry disease-often seen, rarely diagnosed. *Deutsches Arzteblatt international*, 106(26), pp.440–447.
- de Hoon, B. et al., 2015. Buccal swab as a reliable predictor for X inactivation ratio in inaccessible tissues. *Journal of medical genetics*, pp.1–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26220467>.
- Hozumi, I., Nishizawa, M. & Ariga, T., 1990. Biochemical and clinical analysis of accumulated glycolipids in symptomatic heterozygotes of angiokeratoma corporis diffusum (Fabry ' s disease) in comparison with hemizygotes. , 31, pp.335–340.
- Chabchoub, G. et al., 2009. Analysis of skewed X-chromosome inactivation in females with rheumatoid arthritis and autoimmune thyroid diseases. *Arthritis research & therapy*, 11(4), p.R106.
- Chagnon, P. et al., 2005. Age-associated skewing of X-inactivation ratios of blood cells in normal females: a candidate-gene analysis approach. *Experimental hematology*, 33(10), pp.1209–1214.
- Chow, J.C. et al., 2005. Silencing of the mammalian X chromosome. *Annual review of genomics and human genetics*, 6, pp.69–92.
- Iemolo, F. et al., 2014. De novo mutation in a male patient with Fabry disease: a case report. *BMC research notes*, 7, p.11. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3892097&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Inoue, T. et al., 2013. Newborn screening for Fabry disease in Japan: prevalence and genotypes of Fabry disease in a pilot study. *Journal of human genetics*, 58(8), pp.548–552. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/jhg.2013.48>.
- Jeppesen, P. & Turner, B.M., 1993. The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell*, 74(2), pp.281–289.
- Jonkers, I. et al., 2009. RNF12 is an X-Encoded dose-dependent activator of X chromosome inactivation. *Cell*, 139(5), pp.999–1011.
- Kelkar, A. & Deobagkar, D., 2010. Methylation profile of genes on the human X chromosome. *Epigenetics*, 5(7), pp.612–618.
- Kint, J.A., 1970. Fabry's disease: alpha-galactosidase deficiency. *Science (New York, N.Y.)*, 167(3922), pp.1268–1269.
- Kozor, R. et al., 2015. A disproportionate contribution of papillary muscles and trabeculations to total left ventricular mass makes choice of cardiovascular magnetic resonance analysis technique critical in Fabry disease. *Journal of cardiovascular magnetic resonance : official journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance*, 17, p.22. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4335368&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Kozor, R. et al., 2016. Cardiac involvement in genotype-positive Fabry disease patients assessed by cardiovascular MR. *Heart*, (JANUARY), pp.heartjnl-2015-308494. Available at: <http://heart.bmj.com/lookup/doi/10.1136/heartjnl-2015-308494>.
- Ledvinova, J. et al., 1997. Blood group B glycosphingolipids in alpha-galactosidase deficiency (Fabry disease): influence of secretor status. *Biochimica et biophysica acta*, 1345(2), pp.180–187.
- Lenoir, G. et al., 1977. [Fabry's disease. Carbamazepine therapy in acrodyniform syndrome]. *Archives francaises de pediatrie*, 34(8), pp.704–716.
- Lepedda, A.J. et al., 2013. Urine bikunin as a marker of renal impairment in Fabry's disease. *BioMed Research International*, 2013.
- Lew, R.M. et al., 2015. Tay-Sachs disease: current perspectives from Australia. *The application of clinical genetics*, 8, pp.19–25. Available at: [/pmc/articles/PMC4309774/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC4309774/?report=abstract).
- Liao, H.C. et al., 2013. Plasma globotriaosylsphingosine (lysoGb3) could be a biomarker for Fabry disease with a Chinese hotspot late-onset mutation (IVS4+919G>A). *Clinica Chimica Acta*, 426(55), pp.114–120. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2013.09.008>.
- von der Lippe, C. et al., 2016. Experiences of Being Heterozygous for Fabry Disease: a Qualitative Study. *Journal of Genetic Counseling*. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10897-016-9941-1>.
- Lukas et al., 2015. Lukas et al ., Human Mutation Lukas et al ., Human Mutation. *Human mutation*.
- Lukas, J. et al., 2015. Functional and Clinical Consequences of Novel α -Galactosidase A Mutations in Fabry Disease.
- Lyon, M.F., 1961. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*, 190, pp.372–373.
- MacDermot, K.D., Holmes, A. & Miners, A.H., 2001. Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 98 hemizygous males. *Journal of medical genetics*, 38(11), pp.769–775. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11732485> \n <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1734754>.
- Mahmud, H.M., 2014. Fabry ' s Disease — A comprehensive review on pathogenesis , diagnosis and treatment. *Journal of pakistan medical association*, pp.189–194.
- Maier, E.M. et al., 2006. Disease manifestations and X inactivation in heterozygous females with Fabry disease. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992). Supplement*, 95(451), pp.30–38.
- Martensson, E., 1966. Neutral glycolipids of human kidney isolation, identification, and fatty acid composition. *Biochimica et biophysica acta*, 116(2), pp.296–308.
- Medical, T. & Hospital, K.S., 1997. Screening and detection of gene mutations in Japanese patients with Fabry disease by non-radioactive single-stranded conformation polymorphism analysis. , 9, pp.111–116.
- Medin, J.A. et al., 1996. Correction in trans for Fabry disease: expression, secretion and uptake of alpha-galactosidase A in patient-derived cells driven by a high-titer recombinant retroviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(15), pp.7917–7922.
- Mermoud, J.E. et al., 2002. Histone H3 lysine 9 methylation occurs rapidly at the onset of random X chromosome inactivation. *Current biology : CB*, 12(3), pp.247–251.
- Migeon, B.R. et al., 2001. Identification of TSIX, encoding an RNA antisense to human XIST, reveals differences from its murine counterpart: implications for X inactivation. *American journal of human genetics*, 69(5), pp.951–60. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1274371&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Migeon, B.R. et al., 2002. Species Differences in TSIX/Tsix Reveal the Roles of These Genes in X-Chromosome Inactivation. *The American Journal of Human Genetics*, 71(2), pp.286–293. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002929707604741>.
- Miller, a. P. & Willard, H.F., 1998. Chromosomal basis of X chromosome inactivation: Identification of a multigene domain in Xp11.21-p11.22 that escapes X inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(15), pp.8709–8714. Available at: <http://www.pnas.org/content/95/15/8709.full>.
- Minks, J., Robinson, W.P. & Brown, C.J., 2008. A skewed view of X chromosome inactivation. *Journal of Clinical Investigation*, 118(1), pp.20–23.
- Morrissey, R.P., Philip, K.J. & Schwarz, E.R., 2011. Cardiac abnormalities in Anderson-Fabry disease and Fabry’s cardiomyopathy. *Cardiovascular Journal of Africa*, 22(1), pp.38–44.
- Morrone, A. et al., 2003. Fabry disease: molecular studies in Italian patients and X inactivation analysis in manifesting carriers. *Journal of medical genetics*, 40(8), p.e103.
- Mosnier, J.F. et al., 1991. Recurrence of Fabry’s disease in a renal allograft eleven years after successful renal transplantation. *Transplantation*, 51(4), pp.759–762.
- Mossner, M. et al., 2013. Skewed X-inactivation patterns in ageing healthy and myelodysplastic haematopoiesis determined by a pyrosequencing based transcriptional clonality assay. *Journal of medical genetics*, 50(2), pp.108–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23339109>.
- Najafian, B. et al., 2011. Renal Complications of Fabry Disease in Children. , 72(2), pp.181–204.
- Nakao, S. et al., 2003. Fabry disease: Detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a “renal variant” phenotype. *Kidney International*, 64(3), pp.801–807.
- Naumova, A.K. et al., 1998. Genetic mapping of X-linked loci involved in skewing of X chromosome inactivation in the human. *European journal of human genetics : EJHG*, 6(6), pp.552–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9887372>.
- Norris, D.P. et al., 1994. Evidence that random and imprinted Xist expression is controlled by preemptive methylation. *Cell*, 77(1), pp.41–51.
- Oder, D. et al., 2016. Organ manifestations and long-term outcome of Fabry disease in patients with the GLA haplotype D313Y. , pp.1–14.
- Okumiya, T. et al., 1995. Galactose stabilizes various missense mutants of alpha-galactosidase in Fabry disease. *Biochemical and biophysical research communications*, 214(3), pp.1219–1224.
- Palecek, T. et al., 2014. Prevalence of Fabry disease in male patients with unexplained left ventricular hypertrophy in primary cardiology practice: Prospective Fabry cardiomyopathy screening study (FACSS). *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 37(3), pp.455–460.
- Pastores, G.M. & Lien, Y.-H.H., 2002. Biochemical and molecular genetic basis of Fabry disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 13 Suppl 2(7), pp.S130–S133.
- Pensabene, L. et al., 2016. Gastrointestinal Symptoms of Patients with Fabry Disease. *Gastroenterology Research and Practice*, 2016(FEBRUARY), pp.1–7. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/grp/2016/9712831/>.

- Pisani, A. et al., 2015. Late diagnosis of Fabry disease caused by a de novo mutation in a patient with end stage renal disease. *BMC research notes*, 8(1), p.711. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/8/711>.
- Plenge, R.M. et al., 1997. A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation. *Nature genetics*, 17(3), pp.353–356.
- Politei, J. et al., 2015. Fabry disease and enzyme replacement therapy in classic patients with same mutation: Different formulations - different outcome? *Clinical Genetics*, (March 2016).
- Pyeritz, R.E. et al., 1980. Plasma exchange removes glycosphingolipid in Fabry disease. *American journal of medical genetics*, 7(3), pp.301–307.
- Racchi, O. et al., 1998. X chromosome inactivation patterns in normal females. *Blood cells, molecules & diseases*, 24(4), pp.439–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9880240>.
- Redonnet-Vernhet, I. et al., 1996. Uneven X inactivation in a female monozygotic twin pair with Fabry disease and discordant expression of a novel mutation in the alpha-galactosidase A gene. *Journal of medical genetics*, 33(8), pp.682–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1050704&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Renault, N.K.E. et al., 2013. Human X-chromosome inactivation pattern distributions fit a model of genetically influenced choice better than models of completely random choice. *European journal of human genetics : EJHG*, 21(12), pp.1396–402. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2013.84>.
- Rombach, S.M. et al., 2012. Vascular aspects of fabry disease in relation to clinical manifestations and elevations in plasma globotriaosylsphingosine. *Hypertension*, 60(4), pp.998–1005.
- Ropers, H.H. et al., 1977. Evidence for preferential X-chromosome inactivation in a family with Fabry disease. *American Journal of Human Genetics*, 29(4), pp.361–70. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1685395&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ruiz de Garibay, A.P., Solinís, M.A. & Rodríguez-Gascón, A., 2013. Gene therapy for fabry disease: a review of the literature. *BioDrugs*, 27(3), pp.237–46.
- Saito, O. et al., 2015. Prevalence of Fabry disease in dialysis patients: Japan Fabry disease screening study (J-FAST). *Clinical and Experimental Nephrology*, (March 2016). Available at: "<http://dx.doi.org/10.1007/s10157-015-1146-7>".
- Sandhoff, K. & Kolter, T., 1998. Processing of sphingolipid activator proteins and the topology of lysosomal digestion. *Acta Biochimica Polonica*, 45(No. 2), pp.373–384.
- Shabbeer, J. et al., 2006. Fabry disease: identification of 50 novel alpha-galactosidase A mutations causing the classic phenotype and three-dimensional structural analysis of 29 missense mutations. *Human genomics*, 2(5), pp.297–309. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3500179&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sharp, A. et al., 2011. DNA methylation profiles of human active and inactive X chromosomes. *Genome research*, 21(10), pp.1592–1600. Available at: <http://genome.cshlp.org/content/21/10/1592.short>.
- Sharp, A., Robinson, D. & Jacobs, P., 2000. Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Human genetics*, 107(4), pp.343–349.

- Scheidt, W.V.O.N. et al., 1991. An atypical variant of Fabry's disease with manifestations confined to the myocardium. *The New England journal of medicine*, 324(6), pp.395–399.
- Schibanoff, J.M., Kamoshita, S. & Briens, J.S.O., 1966. Tissue distribution of glycosphingolipids in a case of Fabry's disease. , 10.
- Simon, M. et al., 1990. Glycolipid storage material in Fabry's disease: a study by electron microscopy, freeze-fracture, and digital image analysis. *Journal of structural biology*, 103(1), pp.40–47.
- Starmer, J. & Magnuson, T., 2009. A new model for random X chromosome inactivation. *Development (Cambridge, England)*, 136(1), pp.1–10. Available at: <http://dev.biologists.org/content/136/1/1.full>.
- Street, N.J. et al., 2006. Comparison of health-related quality of life between heterozygous women with Fabry disease, a healthy control population, and patients with other chronic disease. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 8(6), pp.346–353.
- Struwing, J.P. et al., 2006. Skewed X chromosome inactivation and early-onset breast cancer. *Journal of medical genetics*, 43(1), pp.48–53. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1876702&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Stults, C.L., Sweeley, C.C. & Macher, B.A., 1989. Glycosphingolipids: structure, biological source, and properties. *Methods in enzymology*, 179, pp.167–214.
- Stuppia, L. et al., 2012. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), pp.3245–3276.
- Sueoka, H., Aoki, M., et al., 2015. Distributions of Globotriaosylceramide Isoforms, and Globotriaosylsphingosine and Its Analogues in an α -Galactosidase A Knockout Mouse, a Model of Fabry Disease. *Plos One*, 10(12), p.e0144958. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0144958>.
- Sueoka, H., Ichihara, J., et al., 2015. Nano-LC-MS/MS for quantification of lyso-Gb3 and its analogues reveals a useful biomarker for fabry disease. *PLoS ONE*, 10(5), pp.1–13.
- Sweeley, C. & Klionsky, B., 1961. Fabry's Disease : Characterization Novel Classification and as a Sphingolipidosis Partial of a Novel Glycolipid. , (172713), pp.3148–3151.
- Swierczek, S.I. et al., 2016. Methylation of AR locus does not always reflect X chromosome inactivation state. *Blood*, 119(13), pp.100–110.
- Thomas, G.H., 2007. Part 4 : Lysosomal Disorders. , pp.1–43.
- Thompson, T.E. & Tillack, T.W., 1985. Organization of glycosphingolipids in bilayers and plasma membranes of mammalian cells. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 14, pp.361–386.
- Tanon, L. et al., 1998. Unbalanced X-chromosome inactivation in haemopoietic cells from normal women. *British journal of haematology*, 102(4), pp.996–1003.
- Topaloglu, A.K. et al., 1999. Twenty Novel Mutations in the α -Galactosidase A Gene Causing Fabry Disease. , 1(3), pp.806–811.
- Tribioli, C. et al., 1992. Methylation and sequence analysis around EagI sites: identification of 28 new CpG islands in XQ24-XQ28. *Nucleic acids research*, 20(4), pp.727–33. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=312011&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Tsuboi, K. & Yamamoto, H., 2012. Clinical observation of patients with Fabry disease

- after switching from agalsidase beta (Fabrazyme) to agalsidase alfa (Replagal). *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 14(9), pp.779–86.
- Tuschl, K. et al., 2005. Mucopolysaccharidosis type II in females: case report and review of literature. *Pediatric neurology*, 32(4), pp.270–272.
- Vallot, C. et al., 2013. XACT, a long noncoding transcript coating the active X chromosome in human pluripotent cells. *Nature genetics*, 45(3), pp.239–241.
- Vance, D., Krivit, W. & Sweeley, C., 1975. Metabolism of neutral glycosphingolipids in plasma of a normal human and a patient with Fabry ' s disease of Neutral Glycosphingolipids in Plasma Normal Human and a Patient with Fabry ' s Disease *. *The Journal of Biological Chemistry*, 250(October), pp.8119–8125.
- Vasella, A., Davies, G.J. & Böhm, M., 2002. Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(5), pp.619–629.
- Waldek, S. & Feriozzi, S., 2014. Fabry nephropathy: a review - how can we optimize the management of Fabry nephropathy? *BMC nephrology*, 15(1), p.72.
- Wang, J., Yu, R. & Shete, S., 2014. X-Chromosome Genetic Association Test Accounting for X-Inactivation, Skewed X-Inactivation, and Escape from X-Inactivation. *Genetic Epidemiology*, 38(6), pp.483–493.
- Wherrett, J. & Hakomori, S.-I., 1973. Characterization of a Blood Group B Glycolipid , Accumulating in the Pancreas of a Patient with Fabry ' s Disease *. *The Journal of Biological Chemistry*, 218(9), pp.3046–3051.
- Wilcox, W.R. et al., 2008. Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: lessons from the Fabry Registry. *Molecular genetics and metabolism*, 93(2), pp.112–128.
- Wolf, S.F. et al., 1984. Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus on the human X chromosome: implications for X-chromosome inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(9), pp.2806–10. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=345159&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Young, E. et al., 2005. Is globotriaosylceramide a useful biomarker in Fabry disease? *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992). Supplement*, 94(447), pp.51–54. Available at: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,uid,url&db=mdc&AN=15895713&lang=cs&site=ehost-live>.
- Zhang, K. et al., 2010. Clinical Applications of Mass Spectrometry. *Methods in Molecular Biology*, 603, pp.145–156. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-60761-459-3>.

Citace ústního sdělení:

- MUDr. Lubor Goláň, 14-04-2016, II. interní klinika - klinika kardiologie a angiologie
Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy
- Ing. Helena Poupětová, 14-04-2016, Ústav dědičných metabolických poruch
1. lékařské fakulty UK a VFN v Praze, Laboratoř enzymologie

Internetové zdroje:

- Databáze The Human Gene Mutation Database [online]. [cit. 14-04-2016]. Dostupné z www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=GLA
- Fabry registry [online]. [cit. 10-06-2016]. Dostupné z <https://www.fabrycommunity.com/en/Healthcare/Registry.aspx>