

Univerzita Karlova v Praze
2. lékařská fakulta

Studijní program:
Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie



Mgr. Jana Paděrová

Molekulární syndromologie: molekulárně genetické
příčiny vzácných onemocnění na příkladu Kabuki a
Kabuki-like syndromů

*Molecular syndromology: molecular genetic causes of rare
diseases presented on Kabuki and Kabuki-like syndromes*

Dizertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Milan Macek ml., DrSc.

Praha, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou dizertační práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 31. 5. 2018

Jana Paděrová

Identifikační záznam:

Paděrová, Jana. *Molekulární syndromologie: molekulárně genetické příčiny vzácných onemocnění na příkladu Kabuki a Kabuki-like syndromů [Molecular syndromology: molecular genetic causes of rare diseases presented on Kabuki and Kabuki-like syndromes]*. Praha, 2018. rozsah 139s. Dizertační práce (Ph.D). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol. Školitel: Macek, Milan.

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli Prof. MUDr. Milanu Mackovi ml., DrSc. za vedení mé doktorandské práce, za umožnění provádění tohoto výzkumu, za získání přístrojů sekvenování nové generace pro Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2.LF UK, a tím umožnění jejich použití pro účely tohoto výzkumu. Též mu děkuji za možnost účasti na vědeckých konferencích, a tak získání informací relevantních ke zpracování této práce, a děkuji za vstřícnou a promptní pomoc při revizích a publikacích článků, které vznikly v rámci této práce.

Velice děkuji též své konzultantce MUDr. Anně Křepelové za odborné rady a konzultace týkající se patogenicity mutací a metodiky testování. Mé velké díky patří též všem kolegům z laboratoří ÚBLG. Pí. Simoně Bohmové děkuji za její ochotu pomáhat s přípravou vzorků, Mgr. Věře Pajkošové za pomoc při analýze Sangerova sekvenování DNA a za snahu dále poskytovat a vylepšovat diagnostiku zavedenou v rámci této práce. Mnohokrát děkuji Mgr. Janě Drábové PhD. za její ochotu a pomoc při provádění a analýze výsledků metody aCGH.

Ráda bych poděkovala též všem lékařským genetikům z genetické ambulance ÚBLG za jejich skvělou a flexibilní spolupráci a vysokou profesní úroveň, která dovolila přípravu dvou kvalitních článků v rámci této práce. Děkuji za výbornou diagnostiku a popis fenotypových vlastností pacientů, za sdílení informací a stálou dostupnost k diskuzi o porovnávání fenotypů a genotypů. Zejména bych takto chtěla poděkovat Prim. MUDr. Markétě Havlovicové, MUDr. Andree Holubové, MUDr. Markétě Vlčkové, MUDr. Marcele Malíkové, MUDr. Radce Pourové a MUDr. Aleně Puchmajerové.

Za pomoc se statistickým zpracováním fenotypových dat a s bioinformatickým zpracováním dat sekvenování nové generace velice děkuji Mgr. Janu Gerykovi, PhD.

Tato dizertační práce vznikla za podpory grantů: CZ.2.16/3.1.00/24022 OPPK, NT/14200 a Norských fondů NF-CZ11-PDP-3-003-2014.

Abstrakt

Kabuki syndrom (KS) je dominantně dědičné onemocnění způsobené většinou *de novo* patogenními mutacemi v genech *KMT2D* (dříve *MLL2*) nebo *KDM6A*. Jedná se o vzácné multisystémové onemocnění charakterizované především intelektovou nedostatečností (ID – „intellectual disability“) a typickou obličejovou dysmorfii. KS je klinicky velmi heterogenní, což znesnadňuje jeho klinickou diagnostiku.

Prvním cílem této dizertační práce bylo zavedení testování patogenních mutací ve dvou známých KS kauzálních genech metodou Sangerova DNA sekvenování a následně metodou MLPA (Multiple Ligation Probe Amplification) na pracovišti Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol a následně pak identifikace mutací v genech *KMT2D* či *KDM6A* u reprezentativního souboru 43 pacientů s fenotypem typickým pro KS, kteří byli indikováni k tomuto molekulárně genetickému vyšetření z několika spolupracujících genetických ambulancí v České republice. Výsledkem této studie bylo potvrzení či vyvrácení klinické diagnózy pacienta, studium spektra mutací v genech *KMT2D/KDM6A* v české populaci, korelace fenotypu s genotypem a zhodnocení využití fenotypového „MLL2-skóre“ (publikovaného Markrythanasisem et al., 2013) jakožto predikčního nástroje k selekci pacientů pro sekvenování genu *KMT2D*.

U 40% (17/43) analyzovaných pacientů s KS fenotypem byla nalezena mutace v genu *KMT2D* pomocí Sangerova DNA sekvenování, naprotá většina mutací byla protein zkracujícího typu a mutace se nacházely v různých exonech tohoto genu. Nebyla nalezena žádná mutace v genu *KDM6A*, ani žádná intragenová přestavba v žádném z obou genů pomocí metody MLPA. Rovněž nebyla nalezena korelace mezi konkrétní mutací a fenotypem studovaného onemocnění. Byla však nalezena výrazná korelace mezi fenotypem a přítomností či nepřítomností mutace v genu *KMT2D* vyjádřená pomocí „MLL2- skóre“, pacienti s patogenní mutací měli průměrné fenotypové skóre 7,4 (rozmezí 6-9), zatímco pacienti bez mutace 5 (rozmezí 2-7). Pacienti s KS se skóre 6 a více jsou tak vhodnými kandidáty pro cílenou sekvenaci genu *KMT2D*.

Druhým cílem této práce bylo objasnit molekulárně genetickou podstatu Kabuki fenotypu u 18 pacientů bez mutace v genech *KMT2D/KDM6A* za použití metody

aCGH následované sekvenováním nové generace (NGS) zacíleným na klinický exom (CES), a tak zjistit, které genomové lokusy mohou způsobovat vzácná onemocnění podobající se KS – tj. syndromy Kabuki-like (KS-like). Pouze u 18 pacientů z 26 *KMT2D/KDM6A* negativních pacientů jsme obdrželi souhlas rodičů s provedením NGS. Taktéž bylo snahou ustanovit testovací algoritmus pro pacienty s KS a KS-like fenotypy.

U 2 pacientek s KS-like fenotypem byly nalezeny kauzální genomické imbalance (Copy Number Variations – CNV) v lokusech Xp21.1-Xp21.3, respektive 14q11.2. U 4 pacientů s fenotypem KS-like byly nalezeny kauzální mutace v embryonálně exprimovaných genech, jejichž proteinové produkty se účastní regulace transkripce – gen *KMT2A*, mRNA sestřihu – gen *EFTUD2*, apoptózy – gen *HUWE1* a přenosu signálu – gen *GRIN1*. U pacientů, kteří jsou *KMT2D/KDM6A* negativní, jsou aCGH následovaná CES metodami první volby, což představuje vhodný kaskádový testovací algoritmus, jehož záchytnost v naší kohortě byla relativně vysoká – 33% (6/18 pacientů se souhlasem k vyšetření pomocí NGS). Pacienti s fenotypovým skóre 5 a nižším mohou být neprodleně indikováni k aCGH/CES testování, jelikož u této skupiny nebyla nalezena mutace v genech *KMT2D/KDM6A*.

Posledním cílem mé práce bylo testování využití CES u pacientů se vzácným onemocněním (VO) charakterizovaným syndromovou ID podobně jako u KS, ke zjištění molekulární příčiny těchto klinicky heterogenních onemocnění. U 15 z 60 testovaných pacientů byla pomocí této metody nalezena potenciálně patogenní či patogenní varianta, stanovující tak diagnostickou výtěžnost metody u syndromově asociované ID až na 25 %. V této skupině pacientů jsme diagnostikovali další dva pacienty s mutací v genu *KMT2A*, přestože nebylo u těchto pacientů vysloveno podezření na Wiedemann-Steiner syndrom, podobně jako u pacienta s fenotypem KS-like. Dále jsme nově asociovali histonovou demetylázu kódovanou genem *KDM6B* (ze stejné genové rodiny jako gen *KDM6A*) se syndromově asociovanou ID. Identifikovali jsme dalšího pacienta s protein zkracující mutací v genu *EFTUD2* a pacientku s mutací v genu *GRIN2B*, a to ze stejné skupiny genů jako *GRIN1*. U dalších dvou pacientů byla potvrzena autozomálně recesivní (AR) dědičnost jejich ID, u dvou pacientů X-vázaná (XL – X-linked) dědičnost. Metoda CES představuje metodu s vysokým záchytem u syndromových forem ID, a může

tak poskytnout rychlou diagnostiku, obzvláště pak u pacientů, kde je jejich klinický fenotyp nejednoznačný často díky variabilní klinické / věkové expresivitě jejich příznaků. Závěrem lze tedy říci, že řada pacientů se syndromově asociovanou ID má mutace v histonových metyltransferázách (obsahujících SET doménou) (*KMT2A*, *KMT2D*) a demetylázách (*KDM6A*, *KDM6B*), v genu pro spisozomální GTPázu (*EFTUD2*), v genech pro neurotransmiterové receptory aktivované glutamátem (*GRIN1*, *GRIN2B*) a v genech kódujících ubiquitin protein ligázy s HECT doménou (*HUWE1*, *HECT2*).

Klíčová slova: aCGH, *EFTUD2*, fenotypizace, *GRIN1*, *GRIN2B*, *HECT2*, *HUWE1*, intelektová nedostatečnost (ID), Kabuki syndrom, *KDM6A*, *KDM6B*, klinický exom, *KMT2A*, *KMT2D*, MLL2-skóre, MLPA, molekulární syndromologie, NGS, Sangerovo DNA sekvenování, sekvenování klinického exomu (CES), sekvenování nové generace (NGS).

Abstract

Kabuki syndrome (KS) is a dominantly inherited rare disease caused mainly by *de novo* pathogenic variants (henceforward mutations) in the *KMT2D* (formerly *MLL2*) and *KDM6A* genes. It is rare multisystemic syndrome characterized by intellectual disability (ID) and typical facial dysmorphism. KS is clinically heterogeneous, which complicates its clinical diagnosis.

The first aim of this thesis was to introduce mutation testing of the two known KS causative genes in KS by Sanger DNA sequencing and by MLPA (Multiple Ligation Probe Amplification) at the Department of Biology and Medical Genetics of 2nd Medical Faculty of Charles University and University Hospital Motol, Prague followed by identification of underlying genetic mutations in *KMT2D/KDM6A* genes in 43 patients with phenotype typical for KS, who were indicated for this molecular genetic analysis by several collaborating genetic departments in the Czech Republic. We aimed to confirm or disprove of patient's clinical diagnosis, establish spectra of *KMT2D/KDM6A* mutations in the Czech population, render phenotype-genotype correlations and evaluate the phenotypic "MLL2-score" (published by Makrithanasis et al., 2013) utility as prediction tool for selection of cases for *KMT2D* sequencing.

Mutations in the *KMT2D* gene were detected by Sanger DNA sequencing in 40 % (17/43) of analyzed patients with the KS phenotype, vast majority of mutations were protein truncating and these were located in various exons. No causal mutation was found in the *KDM6A* gene and no intragenic rearrangements were found in either of the two genes using MLPA analysis. In addition, no correlation was found between a particular mutation and the KS phenotype. However, there was correlation between the KS phenotype and the presence vs. absence of a mutation in the *KMT2D* gene, expressed by the "MLL2-score". Patients with *KMT2D* mutation presented with average phenotypic score of 7,4 (range 6-9) and patients without a *KMT2D* mutation with an average score of 5 (range 2-7). KS patients with score of 6 and higher are thus good candidates for targeted *KMT2D* testing.

The second aim of this study was to elucidate the molecular genetic cause of

Kabuki phenotype in 18 patients lacking mutation in *KMT2D/KDM6A* genes using aCGH followed by Next Generation Sequencing (NGS) targeted to clinical exome (CES) and so determine genomic locuses that are responsible for rare diseases resembling KS – KS-like syndromes. Only in 18 patients out of the 26 *KMT2D/KDM6A* negative patients was granted consent with the NGS testing. Furthermore, we aimed to establish the most suitable testing algorithm in KS and KS-like cases.

In two patients with KS-like phenotype we found causal genomic imbalances (Copy Number Variations / CNV) at Xp21.1-Xp21.3 and 14q11.2 loci, respectively. In four patients with KS-like phenotype we found mutations in embryonically expressed genes, whose protein products participate in the regulation of transcription – gene *KMT2A*, in mRNA splicing – gene *EFTUD2*, in apoptosis – gene *HUWE1* and in signal transmission – gene *GRIN1*. In *KMT2D/KDM6A* negative patients are the aCGH followed by CES the methods of first choice, since the detection rate in our cohort is relatively high – 33 % (6/18 patients with NGS consent). Patients with the phenotypic score 5 and lower could be directly indicated to aCGH/CES testing, as in this cohort of patients no mutation in *KMT2D/KDM6A* genes was observed.

The last aim of this study was an examination of the CES utility in patients with rare disease characterized by syndromic ID (i.e. similar to KS) and elucidation of molecular pathogenesis in those clinically heterogeneous disorders. In 15 out of 60 patients tested we found likely pathogenic or pathogenic variants, increasing the diagnostic yield to 25% in patients with syndromic ID. In this group of patients we diagnosed two additional patients with a mutation in the *KMT2A* gene, although there wasn't original clinical suspicion of the Wiedeman-Steiner syndrome, i.e. similar as in the KS-like *KMT2A*-mutation positive patient. Furthermore, we were able to make novel connection of histone demethylase *KDM6B* (from the same gene family as *KDM6A*) with ID. In addition, we had identified another patient with protein truncating mutation in the *EFTUD2* gene and a patient with mutation in the *GRIN2B* gene (from the same gene family as the *GRIN1* gene). In two other patients autosomal recessive (AR) molecular cause of ID disease was revealed, in two patients X-linked (XL) inherited cause was observed. The NGS method aimed at the clinical exome has a high detection rate in patients with syndromic ID and may provide rapid diagnosis especially in cases, where their clinical phenotype is

ambiguous, often due to variable clinical / age-related expressivity of their features. Many of the studied patients, with syndromic ID, have mutations in histone methyltransferases (with SET domain) (*KMT2A*, *KMT2D*) and demethylases (*KDM6A*, *KDM6B*), in splicingosomal GTPase (*EFTUD2*), in genes coding for neurotransmitter receptors activated by glutamate (*GRIN1*, *GRIN2B*) and in ubiquitin protein ligases with HECT domain (*HUWE1*, *HECT2*).

Key words: aCGH, clinical exome sequencing (CES), *EFTUD2*, *GRIN1*, *GRIN2B*, *HECT2*, *HUWE1*, intellectual disability (ID), Kabuki syndrome, *KDM6A*, *KDM6B*, *KMT2A*, *KMT2D*, MLL2-score, MLPA, molecular syndromology, Next Generation Sequencing (NGS), phenotyping, Sanger DNA sequencing

Obsah

Abstrakt	5
Abstract	8
Obsah	11
Seznam použitých zkratk	13
Úvod	16
Molekulární syndromologie	16
Intelektová nedostatečnost	17
Geny spojené s intelektovou nedostatečností	18
Kabuki syndrom	19
Molekulární příčiny Kabuki syndromu.....	20
Funkce KMT2D a KDM6A proteinů.....	21
Diferenciální diagnostika Kabuki syndromu a další geny studované v souvislosti s Kabuki syndromem	22
Variabilní expresivita a fenotypové “MLL2-skóre”	22
Vybraná vzácná onemocnění s intelektovou nedostatečností	23
Vzácná onemocnění způsobená mutacemi v genu <i>HUWE1</i>	23
Vzácná onemocnění způsobená mutacemi v genu <i>EFTUD1</i>	24
Vzácná onemocnění způsobená mutacemi v genu <i>GRIN1</i>	25
Wiedemann-Steiner syndrom (mutace v genu <i>KMT2A</i>).....	26
Použité metody	27
Metoda Sangerova DNA sekvenování	27
Metoda MLPA.....	28
Metoda aCGH.....	29
Metoda NGS.....	31
Cíle práce	36
<u>Cíl 1: Cílené testování mutací v genech KMT2D a KDM6A</u>	36
<u>Cíl 2: Zjištění molekulární příčiny vzácného onemocnění u pacientů s Kabuki-like fenotypem</u>	37
<u>Cíl 3: Využití vyšetření klinického exomu pomocí NGS u pacientů se syndromově asociovanou intelektovou nedostatečností k detekci dalších potenciálně kauzálních genů</u>	37
Materiál a Metody	38
Soubory pacientů	38
Pacienti s Kabuki a Kabuki-like fenotypem	38
Skupina 1	38
Skupina 2	38
Pacienti se se syndromově asociovanou ID	39
Skupina 3	39
Metody	39
Sangerovo DNA sekvenování.....	39
Metoda MLPA	41
Korelace fenotypu vyšetřovaných pacientů s jejich genotypem.....	42
Fenotypové “MLL2-skóre”	42
Porovnání fenotypových vlastností	42
Komparativní genomová hybridizace aCGH.....	43
Next Generation Sequencing (NGS)	44
NGS klinický exom (CES)	44
NGS panel pro Kabuki syndrom	46

Výsledky a diskuze	47
<u>Cíl 1: Cílené testování mutací v genech KMT2D a KDM6A</u>	47
Zavedení molekulárně genetického testování Kabuki syndromu	47
Potvrzení diagnózy Kabuki syndromu na molekulární úrovni a zjištění genotypového spektra mutací v KMT2D a KDM6A genech v české populaci.....	48
Korelace fenotypu s genotypem a zhodnocení využití fenotypového „MLL2-skóre“ a vhodný testovací algoritmus pro diagnostiku KS.....	51
<u>Cíl 2: Zjištění molekulární příčiny vzácného onemocnění u pacientů s Kabuki-like fenotypem</u>	53
Pacientka KS9 (MLL2-skóre 4).....	54
Pacient KS10 (MLL2-skóre 7).....	55
Pacient KS11 (MLL2-skóre 6).....	57
Pacient KS17 (MLL2-skóre 6).....	58
Pacient KS23 (MLL2-skóre 6).....	59
Pacient KS25 (MLL2-skóre 4).....	61
<u>Cíl 3: Využití vyšetření klinického exomu pomocí NGS u pacientů se syndromově asociovanou intelektovou nedostatečností k detekci dalších potenciálně kauzálních genů</u>	62
Pacient 1 (NG28)	63
Pacient 2 (CDL2).....	64
Pacienti 3 a 4 (NG49A a NG49D)	65
Pacient 5 (NG47)	67
Pacient 6 (NG11).....	69
Pacient 7 (CDL7).....	71
Pacient 8 (NG67)	72
Pacient 9 (NG109).....	73
Pacient 10 (NG103).....	74
Pacient 11 (NG171).....	76
TABULKY A OBRÁZKY	78
Závěr	102
Reference	108
Přílohy	115

Seznam použitých zkratek

AA	aminokyselina
aCGH	komparativní genomová hybridizace na čipu („arrayCGH“)
AD	autozomálně dominantní onemocnění
AOH	Absence of Heterozygosity (ztráta heterozygosity)
AR	autozomálně recesivní onemocnění
ARX	Aristaless related homeobox, X-linked
ASCOM	ASC-2/NCOA6 komplex (proteinový komplex)
bp	páry (nukleotidových) bazí
BR	Broad Range (široké spektrum/distribuce)
BWA	Burrowsův-Wheelerův Aligner (pro NGS)
CDL	Cornelia de Lange syndrom
CES	Clinical Exome Sequencing (sekvenování klinického exomu)
CNS	Centrální nervová soustava
CNV	copy number variation (variace v počtu kopií)
ČR	Česká republika
Db	databáze
DECIPHER	Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources (decipher.sanger.ac.uk)
del	delece
DGV	Database of Genomic Variants
<i>DMD</i>	Dystrophin gen
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DUF	Domain of Unknown Function (Doména s neznámou funkcí)
dup	duplikace
ECARUCA	European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations (ecaruca.radboudumc.nl:8080/ecaruca/)
<i>EFTUD2</i>	Elongation Factor Tu GTP-binding Domain-containing 2 gen
ESCs	Embryonic Stem Cells (embryonální kmenové buňky)
ExAC	Exome Aggregation Consortium (Broad Institute, USA; databáze populačních frekvencí variant; exac.broadinstitute.org/)
ExAC-NFE	populační frekvence varianty (v evropské populaci “nefinského” původu) dle ExAc databáze
<i>EZH2</i>	Enhancer of Zeste, Drosophilla Homolog 2
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FMRP	protein fragilního chromosome X
<i>GRIN1</i>	Glutamate Receptor, Ionotropic, N-methyl-D-aspartate, subunit 1
<i>GRIN2B</i>	Glutamate Receptor, Ionotropic, N-methyl-D-aspartate, subunit 2B
H3K4	lysin na pozici 4. aminokyseliny u histonu H3
H3K27	lysin na pozici 27. aminokyseliny u histonu H3
HECT	Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus
<i>HERC2</i>	HECT domain and RCC1-like domain 2
HGNC	Human Genome Organisation Gene Nomenclature (www.genenames.org)
HOX	Homeobox, homeodoménové geny (geny řídící embryogenezi)
HS	High Sensitivity (vysoká citlivost)
HSF	Human Splicing Finder (predikční software; www.umd.be/HSF3/)
<i>HUWE1</i>	HECT, UBA a WWE domain containing protein 1
ID	intellectual disability (intelektová nedostatečnost; dříve mentální retardace)

<i>IL1RAPL1</i>	Interleukin 1 Receptor Accessory Protein-like 1
IQ	inteligentní kvocient
ISCA	International Standards for Cytogenomic Arrays (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gap/cgi-bin/study.cgi?study_id=phs000205.v2.p1)
IUGR	intrauterinní růstová retardace (intrauterine growth retardation)
kb	kilobáze (DNA sekvence o tisíci nukleotidech)
<i>KDM6A</i>	lysine /K/ demetyláza 6A
<i>KDM6B</i>	lysine /K/ demetyláza 6B
<i>KMT2A</i>	lyzin/K/ specifická metyl transferáza 2A
<i>KMT2D</i>	lyzin/K/ specifická metyl transferáza 2D
<i>KMT2D-/KDM6A-</i>	nebo <i>KMT2D/KDM6A</i> negativní pacienti bez mutace v genech <i>KMT2D</i> a <i>KDM6A</i>
<i>KMT2D+</i>	pacienti s mutací v genu <i>KMT2D</i>
KS	Kabuki syndrom
KS-like/KLS	Kabuki-like syndrom
M	molarita roztoku
<i>MAGEL2</i>	Mage-Like 2 gen
Mb	megabáze (DNA sekvence o délce 1 milionu nukleotidů)
MFD	Mandibulofacial dysostosis (Mandibulofaciální dysostóza)
MFDM	Mandibulofacial dysostosis with microcephaly (MFD s mikrocefalií)
MLL2	Myeloid/Lymphoid Leukemia 2 – dřívější název pro gen <i>KMT2D</i>
MLL2-skóre	Fenotypové skóre pro hodnocení podobnosti fenotypu pacienta s fenotypem typickým pro Kabuki syndrom
MLPA	Multiplex Ligation dependent Probe Amplification
MPS	Massive Parallel Sequencing (vysokokapacitní paralelní sekvenování)
MR	Mentální retardace (viz také moderní termín ID výše)
MRI	Magnetic resonance imaging (Magnetická resonance)
MS	Makrythanasisovo fenotypické skóre u Kabukiho syndromu
MTS	Martsolf syndrom
MS-MLPA	Metylation-Specific MLPA
NGS	Next Generation Sequencing (sekvenování nové generace)
<i>NIPBL</i>	Nipped-B-Like gen
NMDA	N-metyl-D-aspartate receptor excitačních synapsí
NNSPLICE	Neural Network Splice Site prediction (predikční software)
nt	nukleotid
ORF	Open Reading Frame
ORL	Otorinolaryngologie
PAS	Porucha Autistického Spektra
PF	Passing Filter (% spolehlivých čtení)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerázová řetězová reakce)
PRC2	Polycomb repressor complex 2 (proteinový komplex)
<i>RAB3GAP1</i>	RAB3 GTPase Activating Protein Catalytic Subunit 1
RNA	ribonukleová kyselina
RT-MLPA	Reverse Transcriptase MLPA
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (jednonukleotidový polymorfismus)
ÚBLG	Ústav Biologie a Lékařské Genetiky UK 2.LF a FN Motol (www.fnmotol.cz/ublg)
VO	vzácné onemocnění
VUS	Variant of Unknown Significance (varianta nejasného klinického významu)

WES	Whole Exome NGS Sequencing (celoexomové sekvenování nové generace)
WMA	Warburg Mikro Syndrom
WSS	Wiedemann-Steiner syndrom
XL	X-vázané onemocnění (X-linked)
XLD	X-vázané onemocnění dominantní
XLMR	X-vázaná mentální retardace
XLR	X-vázané onemocnění recesivní

Úvod

Molekulární syndromologie

Molekulární syndromologie se zaměřuje na zjištění molekulární příčiny, většinou genetické mutace, která vede k rozvoji klinicky popsaného syndromu / fenotypu. Tento obor se začal uplatňovat zejména díky snaze lépe porozumět vzácným dědičným onemocněním (VO; “rare/orphan/Mendelian diseases”), jejich dědičnosti, výskytu, včetně jejich primární, sekundární a terciární prevence. Prozatím je popsáno okolo 6000 takovýchto onemocnění (www.omim.org; www.orpha.net). Pro získání názvu daného „VO“ stačí, aby byl popsán jeden pacient v celosvětovém měřítku.

V užším slova smyslu jde o onemocnění s definovaným fenotypem, které nespadá pod žádný dobře definovaný syndrom, a celosvětově tak existuje pouze několik rodin či jedinců s genetickou změnou v daném genu / genech. Ve snaze určit tuto genetickou změnu u pacienta s VO je důležitá celosvětová spolupráce a (anonymní) sdílení fenotypových a genotypových dat pacientů, s cílem najít shodný fenotyp s diagnostikovaným pacientem (www.matchmakerexchange.org). Dalším přístupem je celogenomové či celoexomové testování pacientovy DNA a identifikace patogenní či pravděpodobně patogenní varianty u daného pacienta. Patogenicita těchto variant musí být náležitě zhodnocena, musí přitom být brán v potaz klinický projev pacienta, srovnání s fenotypem jiných pacientů s patogenní variantou (dále mutací) v identifikovaném genu či v genu patřícím do stejné genové rodiny, dále aberantní proteinové interakce, které by mohly vést k danému klinickému projevu. Též je nutné zhodnotit populační výskyt dané varianty, její typ, identifikovat příslušnou postiženou proteinovou doménu, případnou chemickou změnu dané aminokyseliny a její evoluční konzervovanost.

V rámci molekulární syndromologie je nezbytná úzká spolupráce klinického genetika, který pacienta zná a mnohdy má možnost sledovat jeho klinický vývoj v průběhu několik let, a dále molekulárního genetika, který zhodnocením patogenicity detekovaných variant může předložit

klinickému genetikovi ke zvážení několik genetických variant, které by mohly být kauzální spolu s předpokládaným fenotypovým projevem onemocnění, a to podle aktuálních informací v mezinárodních genetických databázích či na základě publikovaných výzkumů. Klinický genetik pak při porovnání s projevy pozorovanými u pacienta může některé genetické varianty vyloučit či naopak potvrdit pravděpodobnou dvojici genotyp-fenotyp.

Intelektová nedostatečnost

Intelektovou nedostatečností („intellectual disability“ – ID; dříve také mentální retardací – MR) je celosvětově postiženo okolo 1% dětí (Maulik et al., 2011), chlapci jsou postiženi o 30% častěji než dívky (McLaren a Bryson, 1987). ID se rozumí snížená intelektuální schopnost jedince v porovnání s běžnou populací. Inteligence se vyjadřuje pomocí inteligenčního kvocientu - IQ. Dle závažnosti postižení IQ se ID historicky rozděluje na lehkou MR (LMR) s IQ: 50-70, středně těžkou MR (SMR) s IQ: 35-50 a těžkou MR (TMR) s IQ: 20-35. Příčiny ID mohou být genetické i negenetické povahy. Negenetickými příčinami mohou být komplikace při porodu či virové infekce a vystavení se teratogenům v těhotenství. Genetické příčiny ID zahrnují chromozómové aneuploidie slučitelné se životem (např. Down syndrom (MIM#190685), Edwards syndrom (MIM#300484), Patau syndrom (MIM# -) nebo mikrodeleční a mikroduplikační syndromy zahrnující celou skupinu genů v oblasti delece či duplikace (např. Williams-Beuren- (MIM#194050), Di-George- (MIM#188400), Prader-Willi- (MIM#176270) / Angelman syndrom (MIM#105830)), kde většinou jeden gen bývá zodpovědný za vznik ID. Častými genetickými příčinami ID jsou též genové mutace rozdělující se dle mechanismu způsobujícího onemocnění na autozomálně dominantní (AD), objevující se u pacienta většinou *de novo*, autozomálně recesivní (AR), které jsou často spojeny s metabolickými poruchami, a dále pak zejména u chlapců X-vázaná MR (XLMR), tedy mutace na X chromozómu, který je děděn od matky- přenašečky, která bývá nepostižená nebo má

pouze mírně snížený IQ. Mezi XLMR patří vedle mutací v mnoha genech i nejčastější typ ID - nadpočetné trinukleotidové expanze v genech *FMR1/FMR2* u syndromu fragilního chromozómu X (MIM#300624 / MIM#300806). Mutace XLMR se mnohdy tak přenáší po několik generací, než mohou být identifikovány. V Evropě a USA jsou většinou příčinou geny zodpovědné za AD (většinou *de novo* mutace u starších otců) a XL formy ID, zatímco v zemích s vysokou konsanguinitou jsou to geny zodpovědné za AR formy ID. Ve většině případů se geneticky podmíněná ID projevuje již během prvních let života.

ID se může objevovat sama o sobě, jako jediný (izolovaný) klinický příznak u pacienta, či jako syndromová ID v rámci samostatného syndromu, spolu s vnějšími fenotypovými příznaky, které ve většině případů zahrnují dysmorfní rysy v obličejovém fenotypu pacienta, včetně přítomnosti dalších orgánových vad, neurologických či metabolických poruch. Nejčastějšími syndromy s ID jsou Down syndrom a syndrom fragilního X chromozómu.

Tato dizertační práce se zaměřuje na VO u pacientů se syndromovou ID jako např. Kabuki syndrom. Dále ukáže využití molekulární syndromologie při identifikaci kauzální genetické změny u pacientů, kteří některé již popsané VO připomínají, ale po genetické analýze k němu nemohou být přiřazeni, a tak postiženým rodinám nemůže být poskytnuta konkrétní diagnóza, návrh lékařského managementu daného onemocnění, a ani nabídnuta preimplantační či prenatální diagnostika.

Geny spojené s intelektovou nedostatečností

K dnešnímu dni bylo popsáno více než 600 genů spojených s ID, přičemž další zhruba stejné množství genů je považováno za pravděpodobně asociované (Martinez et al., 2017), přičemž jejich kauzalita ještě čeká na potvrzení. Předpokládá se, že mnoho genů ještě nebylo vůbec identifikováno. Musante a Ropers (2014) publikovali předpoklad, že existuje více než 2500 genů spojených s autosomálními ID geny, kdy v Evropě by 13-24% z nich mělo být přenášeno AR způsobem. Často bývají ve spojení s ID nově identifikovány geny původně spojené s jiným typem onemocnění, jako například s nádorovými onemocněními. Největší

rozmach v objevování nových kauzálních genů nastal posledních zhruba 8-10 let v souvislosti s používáním metody aCGH a obzvláště pak se zavedením resekvenování lidského genomu metodami sekvenování nové generace (NGS; nebo také masivně paralelního sekvenování – MPS), tj. přibližně od roku 2010.

Proteiny kódované geny pro ID se většinou účastní prenatálního vývoje centrální nervové soustavy (CNS), stavby neuronu, nebo jsou důležité pro správnou funkci nervového spojení. Mnohé AR děděné ID geny kódují enzymy, které jsou důležité pro syntézu či degradaci proteinů, a mutace v těchto genech tak způsobují akumulaci jinak nedegradovatelného produktu v neuronech (a i jiných buňkách).

Kabuki syndrom

Kabuki syndrom (KS) byl poprvé popsán autory Kuroki a Niikawa v roce 1981, patří mezi syndromově asociovanou ID. Jedná se o syndrom mnohočetných malformací objevujících se u každého pacienta v různé kombinaci v závislosti na věku a závažnosti onemocnění. KS má dominantní dědičnost, většinou se sporadickým výskytem (v důsledku *de novo* mutací). Je popsáno pouze cca. 20 familiálních případů, kde přenos z generace na generaci byl umožněn především díky variabilní expresivitě, která je pro toto onemocnění typická. Prevalence syndromu je odhadována 1/32 000 v Japonsku a 1/86 000 v Austrálii a na Novém Zélandě. Data z jiných populací dosud nejsou k dispozici.

Kabuki make-up syndrom je pojmenován podle obličejového fenotypu připomínajícího tvar „make-upu“, tj. namaskování, používaného v tradičním japonském divadle „Kabuki“. Obličejový fenotyp zahrnuje vysoko pasazené klenuté obočí (někdy s prořídlou laterální částí), evertovanou laterální třetinu spodního víčka, dlouhé oční stěrby, velké dysplastické uši, široký kořen nosu, krátkou columelu, ploché filtrum, abnormální chrup, úzký horní ret a příležitostně modré skléry, ptózu, strabismus nebo kolobom duhovky. Mezi další typické projevy tohoto onemocnění patří vývojové opoždění, problémy s výživou v kojeneckém věku, malý vzrůst,

mikrocefalie, hypotonie, vrozené vývojové vady srdce a ledvin, dysplastické kyčle a kloubní laxicita, persistující fetální polštářky na prstech, brachydaktýlie a/nebo klinodaktýlie, hypoplastické prsty nebo nehty.

Molekulární příčiny Kabuki syndromu

V roce 2010 objevil Ng et al. pomocí exomového sekvenování **KMT2D** (lyzin/K/ specifická metyl transferáza 2D) (MIM#602113) jako kauzální gen pro rozvoj **Kabuki syndromu 1** (MIM#147920). Tento gen byl původně spojován s folikulárním lymfomem, kde byl mutován až u 82% případů jako „driver mutace“ spolu s mutacemi v genech *EZH2* a *CREBBP*. Původní název genu byl proto *MLL2* (Myeloid/Lymphoid Leukemia 2). Gen *KMT2D* se nachází v chromozómové oblasti 12q13.12, je to dlouhý gen o velikosti 36.350 kbp, obsahuje 54 exonů s ORF (Open Reading Frame – otevřený čtecí rámec) o délce 16.614 bp a tvoří enzym o velikosti 5.537 aminokyselin (AA). Mutace v tomto genu jsou detekovány u 44-76% pacientů s KS (Makrythanasis et al., 2013, Ng et al., 2010, Paulussen et al., 2011, Banka et al., 2012, Micale et al., 2011, Miyake et al., 2013, Courcet et al., 2013, Bogershausen et al., 2013, Micale et al., 2014, Li et al., 2011, Banka et al., 2013). Typy mutací v tomto genu zahrnují bodové mutace (např. typu missense – způsobující záměnu aminokyseliny, stop – nonsense či sestřihové), „indel“ způsobující posun čtecího rámce a zavedení stop kodonu, delece celého genu nebo několika exonů, duplikace exonů a mozaikové formy všech těchto typů mutací (Banka et al., 2012). Doposud bylo popsáno okolo 300 různých mutací v rámci celého genu, a to častěji na 3'konci, který kóduje terminální SET doménu proteinu, která je zodpovědná za metyltransferázovou funkci tohoto proteinu. Většina mutací je jedinečná, velice málo je rekurentních, nejčastější mutace p.Tyr2199Ilefs*65 v exonu 31 byla celosvětově popsána u 7 pacientů. Většina mutací zkracuje celkovou délku tohoto proteinu. Většina missense mutací se nachází v exonu 48 (Bogershausen et al., 2013).

V roce 2012 Lederer et al. asociovali gen **KDM6A** (lysine /K/ demetyláza

6A) (MIM#300128) s diagnózou KS, když zkoumali geny interagující s *KMT2D*. Tento gen leží v oblasti Xp11.3 a uniká X-inaktivaci. Velikost genu je 239.426 kb, ORF o velikosti 4.206 bp je sestaven z 29 exonů. Kódovaný enzym je 1.401 AA dlouhý. Mutace v tomto genu se nacházejí u 1-6% KS pacientů a jsou příčinou **Kabuki syndromu 2** (MIM#300867) (Lederer et al., 2014, Miyake et al., 2013, Banka et al., 2015). Popsané mutace zahrnují delece celého genu (v rámci CNV zahrnující více genů) nebo i několika exonů (Lederer et al., 2012). Dále jsou nalézány mutace typu missense, nonsense, splice a indel (Miyake et al., 2013, Micale et al., 2013).

Funkce KMT2D a KDM6A proteinů

Geny *KMT2D* a *KDM6A* kódují enzymy, které epigeneticky modifikují histony navázané na regulačních oblastech regulovaných („downstream“) genů, a tak pozitivně ovlivňují zahájení jejich transkripce. *KMT2D* metyluje 4. lysin od N-konce histonu H3 oktamerového jádra, což představuje aktivační epigenetickou modifikaci. *KDM6A* demetyluje di-/tri-metylovaný 27. lysin histonu H3, což je též prokázaná aktivační epigenetická modifikace. Oba geny jsou součástí aktivačního multiproteinového ASCOM komplexu (tzv. *KMT2D*-komplexu). Inaktivní (tj. reprimovaný) chromatin regulovaných genů je navázán na Polycomb repressor complex 2 (PRC2), jehož hlavním komponentem je EZH2 protein, a ten udržuje H3K27 trimetylovaný. Chromatin se změní v aktivní po navázání ASCOM komplexu, který odstraní represivní metylové značky z H3K27 a vloží aktivační metylovou značku na H3K4, umožní navázání RNA polymerázy, a tím počátek transkripce (Bogershausen 2013). *KMT2D* gen patří do genové rodiny Trithoraxové skupiny genů, které jsou obzvláště důležité při aktivaci HOX genů v průběhu vývoje embrya. Z funkce proteinů *KMT2D* a *KDM6A* lze pak odvodit celkový negativní multisystémový efekt aberantního proteinu nebo jeho haploinsuficienci na vývoj plodu vyúsťující v ID, zde s fenotypem Kabuki syndrom.

Diferenciální diagnostika Kabuki syndromu a další geny studované v souvislosti s Kabuki syndromem

Vzhledem k tomu, že u 24-57% pacientů s KS nebyla odhalena molekulární příčina tohoto onemocnění, byly v souvislosti s rozvojem tohoto onemocnění zkoumány další geny: geny ASCOM komplexu (*ASC2*, *ASH2L*, *RBBP5*, *WDR5*, *DPY30*, *PTIP*, *SMAD1*, *CXXC1*), *KMT2A* (dříve *MLL*), *KMT2D* – asociované geny *DKK1* (Li et al., 2011), *HOXC6*, *S100A4* a *KMT2D* vazebné geny - *ERA*, *ERB*. Dále gen *MACROD2*, který byl přerušen chromozomální přestavbou u jednoho pacienta s KS (Maas et al., 2007) a geny *TRPM3*, *KLF9*, *SMC5*, *MAMDC2* deletované v oblasti 9q21 u dalšího pacienta s KS (Kuniba et al., 2009). Ani jeden z výše uvedených genů nebyl alterován oproti normě u pacientů s KS, a proto kauzalita u KS nebyla potvrzena.

Z hlediska diferenciální diagnostiky byly u jednotlivých pacientů s KS publikovány CHARGE syndrom (MIM#214800) (u pacienta s fenotypickou dg. CHARGE syndromu byla nalezena mutace v genu *KMT2D*), Sotos syndrom (MIM#117550) (u pacienta s fenotypem KS byla nalezena 1,87 kb delece zahrnující gen *NSD*), včetně 977 kb delece v imprintované oblasti 19q13, mozaika +12, delece v oblasti 2q37 a 1,27 Mb delece v oblasti 9q21.11-q21.12 (Verhagen et al., 2014, Hannibal et al., 2011, Maas et al., 2007, Cusco et al., 2008, Kuniba et al., 2009). U většiny delecí se však fenotypové znaky daných syndromů překrývaly s KS jen částečně. U CHARGE a Sotos syndromů lze předpokládat, že šlo o ojedinělé náhodné případy, jelikož tyto syndromy jsou si obecně s KS velmi nepodobné, např. pro Sotosův syndrom je typický velký vzrůst a makrocefalie, zatímco pro KS je typický malý vzrůst a mikrocefalie. Žádný z výše uvedených syndromů nemůžeme proto považovat za jasnou diferenciální diagnózu KS.

Variabilní expresivita a fenotypové “MLL2-skóre”

Jak již bylo zmíněno výše, pro KS je typická variabilní expresivita a různé kombinace fenotypových znaků u rozdílných KS pacientů. Navíc jsou určité znaky více patrné v určitém věku a naopak méně výrazné v jiném věkovém období. Existuje též předpoklad, že KS je všeobecně poddiagnostikován a

není včas zachycen spádovými zdravotnickými zařízeními. Klinická diagnóza KS je tak velmi obtížná a ani nejzkušenější kliničtí genetici si nemohou být touto diagnózou jisti, dokud není potvrzena na molekulární úrovni. Je tedy snahou zavést objektivní fenotypové zhodnocení znaků tak, aby mohla být pravděpodobnost KS škálována a stanovena „preselekcce“ pacientů pro analýzu kauzálních genů. Až do zavedení NGS do výzkumu a diagnostiky KS byla takováto sekvenční analýza DNA dle Sangera nákladná, časově i finančně náročná z důvodu dlouhého čtecího rámce studovaných genů, a tak preselekcce pacientů by byla výhodou.

Makrythanasis et al. publikovali v roce 2013 využití fenotypového „MLL2-skóre“ k objektivizaci klinického fenotypu KS. V rámci této dizertační práce jsme se rozhodli testovat využití tohoto fenotypového skóre pro naše pacienty a jeho případné zavedení do diagnostického algoritmu. „MLL2-skóre“ nabývá hodnot 0 – 10. Toto fenotypové skóre se vyznačuje tím, že každý znak přispívá k finálnímu fenotypovému skóre pacienta jinak velkou hodnotou, např. vývojové vady srdce a ledvin mají vysokou hodnotu, zatímco vady končetin naopak nízkou hodnotu. Některé typické KS znaky, které však nejsou specifické pouze pro KS, nejsou započítávány vůbec, jako např. hypotonie. Způsob výpočtu fenotypového skóre u našich pacientů je uveden v kapitole Materiál a Metody.

Vybraná vzácná onemocnění s intelektovou nedostatečností

Vzácná onemocnění způsobená mutacemi v genu *HUWE1*

Gen *HUWE1* (MIM#300697) (HECT, UBA a WWE domain containing protein 1) se nachází v chromozomové oblasti Xp11.22 a je spjat s rozvojem X-vázané ID „Turnerovského“ typu. Tento gen kóduje E3 ubiquitin ligázu a tak reguluje stabilitu mnoha proteinů, což je nezbytné pro mnoho fyziologických procesů. *HUWE1* ubiquitínuje a tím reguluje například histony H1, H2A, H2B, H3 a H4 a také antiapoptotický protein - Mc11. *HUWE1* se také váže k proteinu p53. Snížení hladiny proteinu

HUWE1 tedy E3 ubiquitin ligázy (např. v důsledku mutací) vede k akumulaci p53 a Mc11 (Friez et al., 2016). *HUWE1* tak reguluje apoptózu, která je důležitým procesem při vývoji embrya. Původně byl tento gen spojen s intelektovou nedostatečností (Froyen et al., 2008). Díky zavedení celoexomového NGS a přístupu trio analýzy (tj. analýza pacienta a jeho rodičů) pak bylo od roku 2015 publikováno několik pacientů se syndromově asociovanou ID a kauzálními mutacemi v tomto genu (Zhu et al., 2015, Taylor et al., 2015, Friez et al., 2016, Miller et al., 2017). Všechny dosud popsané mutace jsou charakteru missense nacházející se v doméně HECT (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus) nebo v doménách s neznámou funkcí (DUF – domain of unknown function), které se však nachází i u jiných vysoce konzervovaných ubiquitin ligáz (DUF913) či u jiných DNA-vazebných proteinů (DUF4414). Prokázalo se, že též Jubergův-Marsidiho (Juberg a Marsidi et al., 1980) a Brooksův syndrom (Brooks et al., 1994) jsou stejná genetická onemocnění patřící k této skupině „XLMR“ spojené s mutacemi v genu *HUWE1* (Friez et al., 2016). Fenotypově se onemocnění s mutacemi v genu *HUWE1* projevují různě, lze pozorovat vysoký stupeň variabilní expresivity, ale i společné klinické charakteristiky: ID a růstovou retardaci. Někteří pacienti jsou popisováni bez dysmorfních změn, jiní naopak mají mikrocefalii nebo makrocefalii. Často se mezi pacienty objevují kraniosynostózy, trojúhelníkový tvar hlavy, vysoké čelo, výrazné obočí, dolu směřující oční štěrby, nízko položené uši, poruchy sluchu, úzký horní ret nebo rozštěp patra. Rozdílné mutace v doméně HECT mají za následek u jednoho pacienta hyperflexibilní klouby (Gly4310Arg) a u druhého naopak omezenou hybnost kloubů (Arg4063Gln) (Friez et al., 2016).

Vzácná onemocnění způsobená mutacemi v genu *EFTUD1*

V roce 2006 popsal Guion-Almeida et al. U čtyř pacientů sporadický syndrom kombinující mandibulofaciální dysostózu (MFD), mikrocefalii, růstové a vývojové opoždění, rozštěp patra a anomálie vnějšího ucha (MIM#610536). Lines et al. v roce 2012 popsali dalších 12 pacientů a nazvali tento syndrom jako MFDM – mandibulofaciální dysostóza s

mikrocefalií a k fenotypovým rysům přidali ještě mikrognácií a hypoplázií střední části obličeje. U některých pacientů byly pozorovány vrozené srdeční vady, opožděná myelinizace na MRI (magnetic resonance imaging), převodní ztráta sluchu a rozštěp patra. Lines et al., 2012 použili exomovou NGS k určení kauzálního genu a identifikovali gen *EFTUD2* (Elongation Factor Tu GTP-binding Domain-containing 2) (MIM#603892) jakožto kauzální pro rozvoj syndromu MFDM. Gen *EFTUD2* kóduje splisozomální GTPázu specifickou pro U5-snRNP majoritního splisozóm, s důležitými protein-protein a protein-GTP vazebnými doménami. Kódovaný protein je klíčový pro stabilitu a sestřih pre-mRNA a je prvním proteinem majoritního splisozómu spojeného s ID. U pacientů s MFDM byly v genu *EFTUD2* nalezeny heterozygotní mutace (např. typu SNP či indel), delece několika exonů, či mikrolečční syndrom zahrnující několik genů. Doposud bylo s tímto syndromem popsáno přes 100 pacientů a okolo 80 různých mutací v genu *EFTUD2* (43% sestřihových, 38% protein zkracujících, 18% typu missense), včetně 7 různých mikrolecí. Většina (75%) mutací vzniklo *de novo*, 18% bylo AD zděděno od rodičů a u zbylých je dědičnost neznámá (Huang et al., 2016). K výčtu fenotypových projevů přibyly: abnormality palce, poruchy dentice, anomálie ledvin, atrofie bílé hmoty, skolióza a strabismus.

Vzácná onemocnění způsobená mutacemi v genu *GRIN1*

Gen *GRIN1* (Glutamate Receptor, Ionotropic, N-methyl-D-aspartate, subunit 1) (MIM#138249) kóduje podjednotku 1 glutamátového receptoru (kalciového kanálu) aktivovaného agonistou N-methyl-D-aspartátem. Tento receptor je důležitý pro funkci nervových synapsí. mRNA je ubikvitěrně exprimována v mozku, nejvíce však v hipokampu, mozečku a mozkové kůře. Hamdan et al., 2011 popsali *de novo* heterozygotní missense mutace v genu *GRIN1* u dvou pacientů s AD neurovývojovým onemocněním s nebo bez hyperkinetických pohybů a záchvatů. Gen byl nalezen při sekvenaci 197 genů kódujících glutamátové receptory u 95 pacientů s nesyndromovou ID a onemocnění bylo označeno jako Mentální retardace, autozomálně dominantní 8 (MIM#614254). Obě missense mutace měly za následek sníženou funkci glutamátového kanálu. Ohba et al.,

2015 posléze identifikovali další 4 pacienty a Zhu et al., 2015 jednoho pacienta s podobným fenotypem a heterozygotní missense mutací v genu *GRIN1* pomocí exomového NGS sekvenování. Lemke et al., 2016 popsali dalších 14 pacientů s heterozygotní mutací, jejichž důsledkem byl nefunkční kanál nebo kanál se sníženým potenciálem indukovaným agonistou. Dále však identifikovali i dvě nepříbuzné rodiny s missense, respektive stop mutací homozygotního charakteru, kde heterozygotní nosiči byli nepostiženi. Detekovaní pacienti měli výrazné vývojové opoždění, závažnou ID (spojenou s absencí řeči) a svalovou hypotonií. Rovněž tak trpěli stereotypickými pohyby, okulomotorickými abnormalitami a epilepsií, avšak dysmorfnní rysy byly většinou mírné.

Wiedemann-Steiner syndrom (mutace v genu *KMT2A*)

Wiedeman et al. popsali v roce 1989 u jednoho pacienta syndrom s abnormálním obličejovým fenotypem, malým vzrůstem, psychomotorickou retardací a nadměrným ochlupením, obzvláště pak v loketní oblasti (hypertrichosis cubiti). Druhý případ tohoto syndromu byl pak popsán Steinerem et al. v roce 2000. Visser et al. provedli v roce 2002 revizi literatury a identifikovali 26 dalších pacientů s nadměrně ochlupenými lokty "Hairy elbow syndrome" (MIM#139600), kde 75% pacientů mělo pouze nadměrně ochlupené lokty a malý vzrůst, zatímco zbytek měl navíc ID a obličejovou dysmorfii – tj. Wiedemann-Steiner syndrom (MIM#605130).

V roce 2012 pak byly celoexomovým sekvenováním NGS stanovena molekulární příčina tohoto syndromu mutace v genu *MLL* (myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia gene) (Jones et al., 2012), který byl podobně jako *MLL2* (*KMT2D*) gen původně pozorován jako fúzní gen v leukemických buňkách. *MLL* gen je homologem trithorax genu u *Drosophila melanogaster*. Dle své molekulární funkce byl *MLL* gen přejmenován na *KMT2A* (lyzin/K/ specifická metyl transferáza 2A; NM_001197104.1) (MIM#159555). *KMT2A* leží v oblasti 11q23.3 a podobně jako *KMT2D* pomocí své SET domény metyluje čtvrtý lyzinový zbytek histonu 3, čímž pozitivně reguluje transkripci cílových genů, mezi něž patří též *HOX* geny. Protein *KMT2A* je součástí transkripčního

komplexu spolu s transkripčním faktorem TFIID a váže se na promotorovou oblast genu *HOX9A* (Nakamura et al., 2002).

Změny v histonových modifikacích pak způsobují globální změny genové exprese mnoha genů v průběhu vývoje embrya a vedou k multisystémovým abnormalitám. Většina pacientů má narušený vývoj mozku, který vede k vývojovému opoždění a/nebo ID. Tento syndrom je velmi vzácný a je charakterizovaný hypertrichosis cubiti a/nebo hypertrichózou zad a dolních končetin, malým vzrůstem, ID a výraznými obličejovými znaky zahrnujícími dlouhé řasy, husté obočí, dolů směřující a vertikálně úzké oční štěrbinu, široký kořen nosu, široká a potlačená špička nosu, úzký horní ret, klindaktýlie malíčku a hypotonie v ranném věku, u některých pacientů pak agresivní chování a poruchy autistického spektra (Miyake et al., 2014). Většina mutací v genu *KMT2A* má charakter protein zkracujících variant, některé mutace jsou typu missense jiné delece celých exonů (Mendelsohn et al., 2014 a Miyake et al., 2014).

Použité metody

Metoda Sangerova DNA sekvenování

DNA sekvenační analýza dle Sangera (tj. „sekvenování první generace“) je nejčastěji používanou technikou molekulárních laboratoří ke zjištění přesného nukleotidového složení fragmentu DNA amplifikovaného metodou polymerázové řetězové reakce (PCR). Tato metoda byla vyvinuta v roce 1977 Sangerem et al. a od to doby byla široce používána další čtvrtstoletí, než začalo docházet k jejímu postupnému nahrazování metodou NGS. Metoda Sangerova sekvenování je známá též jako „metoda ukončení řetězce“, jelikož využívá inkorporace řetězec-ukončujících dideoxynukleotidů (ddNTP), kterým chybí 3'OH skupina k formování další fosfodiesterové vazby ke spojení s dalším nukleotidem. Klasické Sangerovo sekvenování vyžaduje jednořetězcovou templátovou DNA (ssDNA), DNA polymerázu, DNA primer, klasické dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a modifikované ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Prodlužováním primeru dle ssDNA templátu se tvoří inkorporací dNTP (které jsou v nadbytku nad ddNTP) do řetězce DNA, které

jsou pak v různých pozicích zakončovány vždy komplementárním ddNTP. Každý se 4 druhů ddNTP nese odlišnou fluorescenční značku (dříve též radioaktivní značku), která je pak detekována pomocí kapilární elektroforézy a návazných zobrazovacích metod. Řetězce lišící se délkou vždy o jeden nukleotid tak procházejí postupně za sebou detekcí laserem a typ signálu je zaznamenán a je mu přiřazen konkrétní nukleotid, který je přítomen v dané pozici. Na tomto principu dosud pracují kapilární sekvenátory DNA (např. LifeTechnologies – ThermoFisher (www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing.html)).

Metoda MLPA

MLPA (Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification) je metoda multiplexové PCR detekující abnormální počet kopií u až 50 různých DNA nebo RNA sekvencí. Pro každou genomovou sekvenci DNA je designován pár sond, které jsou umístěny těsně vedle sebe a po hybridizaci na templátovou ssDNA jsou ligovány pouze v případě, že daná sekvence komplementární k sondám je v testované templátové DNA přítomna. Na rozdíl od klasické multiplexové PCR není amplifikována cílová DNA, ale pár ligovaných sond hybridizujících k testované DNA. PCR produkty jsou detekovány na kapilární elektroforéze a porovnávány s normální kontrolou. Pokud jsou přítomny testované sekvence na obou alelách, relativní množství produktu (po normalizaci) odpovídá kontrole. Pokud je cílová sekvence přítomna pouze na jedné alele (heterozygotní delece), bude relativní množství produktu poloviční. Pokud cílová sekvence nebude přítomna na žádné z obou alel (monozygotní delece), nevznikne žádný PCR produkt. Obdobné je pak vyhodnocení duplikací a triplikací, atd. Každá z dvojice sond v rámci jedné multiplexové PCR nese různě dlouhou vyplňující („stuffer“) sekvenci DNA, která umožňuje na kapilární elektroforéze oddělit jednotlivé PCR produkty dle své unikátní délky.

Metoda MLPA byla vyvinuta Schoutenem et al. v roce 2002. V současné době je komerčně nabízeno více než 300 různých setů sond, většinou pro dané exony jednoho genu, případně na několik cílových oblastí různých genů či genomových lokusů souvisejících s určitým onemocněním. Tato metoda optimálně doplňuje

Sangerovo sekvenování, jelikož mnoho monogenních chorob je způsobeno jak mutacemi (SNP či indel), tak delecemi (v mírnější formě též duplikacemi) jednotlivých exonů daných kauzálních genu. Tato metoda má i podobné analytické zaměření jako aCGH (viz dále), ale umožňuje detekci i krátkých cílových sekvencí, které jsou pod rozlišovací schopností aCGH. Na druhou stranu aCGH podává hrubou informaci o celém genomu, zatímco MLPA je zacílena na konkrétní „kandidátní“ gen či skupinu genů. Existuje též varianta MLPA nazvaná Reverse Transcriptase MLPA (RT-MLPA) pro mRNA profilování a Methylation-Specific MLPA (MS-MLPA) sloužící jak ke kvantifikaci CNV, tak i k metylačnímu profilování př. pro Prader-Willi/Angelmanův syndrom. Jelikož „povinná“ ligace sond, pokud je správně zacílena, rozpozná i SNP, lze tuto metodu použít i pro SNP či indel mutaci, resp. mutaci typickou pro dané onemocnění př. p.Phe508del u cystické fibrózy (MIM#219700). Z tohoto důvodu je též možné navrhnout vlastní diagnostickou soupravu, dle příslušné diagnostické či výzkumné potřeby.

Metoda aCGH

V roce 1992 Kallioniemi et al. publikovali metodu komparativní genomové hybridizace (CGH; Comparative Genomic Hybridization), která umožňovala detekci delecí a duplikací v celém genomu s rozlišovací schopností okolo 5 Mb, tj. obdobně jako G-pruhování. Principem této metody byla kompetitivní hybridizace shodného množství normální DNA značené jedním fluorochromem a shodného množství testované DNA značené jiným fluorochromem k normálním metafázním chromozómům na mikroskopickém sklíčku. Hybridizované metafázní chromozómy pak byly digitálně nahrány pomocí fluorescenčního mikroskopu a byl analyzován fluorescenční signál obou fluorochromů podél jednotlivých chromozómů. Pokud byla v některém lokusu chromozómu detekována převaha jednoho fluorochromu, byla to indikace delece, respektive duplikace.

V roce 1997 pak Solinas-Toldo et al. představili první verzi aCGH (array based Comparative Genomic Hybridization – komparativní genomová hybridizace na čipu), kde místo k hybridizaci na metafázní chromozómy dochází k hybridizaci ke genomovým úsekům vázaným na pevný substrát. Genomovými sondami

vázanými na sklíčko byly v prvních verzích čipů DNA BAC (Bacterial Artificial Chromosome) klonů a později až unikátní 60-merové sekvence cíleně syntetizovaných sond. Klasická aCGH detekuje CNV v celém genomu s rozlišením závislejícím na hustotě pokrytí genomu jednotlivými sondami, kterou jsou nejčastěji okolo 100 kbp dlouhé. Dále byla vyvinuta metoda SNP aCGH, která obsahuje 2 druhy sond a umožňuje jak detekci CNV, tak i oblastí s absencí heterozygoty (AOH), které mohou indikovat onemocnění s chybou imprintingu (obzvláště pak na chromozómech 6, 7, 11, 14 a 15) a nebo též příbuzenský vztah rodičů, jehož znalost je důležitá ať už z etických důvodů či z důvodu možnosti rozvoje AR podmíněného VO.

U každého jedince je zpravidla detekováno několik variant CNV, a proto je důležité zhodnotit jejich patogenicitu. Zpravidla se CNV klasifikují jako benigní, pravděpodobně benigní, s neznámým klinickým významem, pravděpodobně patogenní a patogenní. Ke zhodnocení benigního či patogenního charakteru variant využíváme několik přístupů:

- 1/ statut varianty u nepostižených rodičů či naopak u rodičů s určitými fenotypovými příznaky
- 2/ rozsah nalezené delece/duplikace
- 3/ umístění či překryv s oblastí známého mikrolečného/mikroduplikačního syndromu
- 4/ genový obsah dané aCGH aberace
- 5/ přítomnost/nepřítomnost v mezinárodních databázích populačních (benigních) variant
- 6/ přítomnost v mezinárodních databázích patogenních variant
- 7/ předešlá detekce varianty u námi vyšetřených pacientů (z "in house" databáze)
- 8/ analýza publikací v Medline (www.pubmed.com)

Mezi databáze populačních variant patří DGV (Database of Genomic Variants; dgv.tcag.ca) založená a spravovaná Hospital for Sick Children v Torontu (MacDonald et al. 2014). DGV obsahuje okolo 550 tisíc CNV a také inzerce. Další podobnou databází je dbVar spravovaná NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar), která obsahuje CNV, inzerce a inzerce mobilních elementů. Mezi databáze obsahující publikované patogenní varianty pak patří i ECARUCA (European Cytogeneticists Association register of Unbalanced

Chromosome Aberrations; umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca), DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources, decipher.sanger.ac.uk/) a ISCA (International Standards from Cytogenomic Arrays, dbsearch.clinicalgenome.org/search/), dnes zaštiťovaná databází ClinGen (Clinical Genome Resource; www.clinicalgenome.org). Posledně zmiňovaná databáze však již není pravidelně aktualizována.

Metoda NGS

Metoda NGS (Next Generation Sequencing – Sekvenování Nové Generace nebo také MPS Massive Parallel Sequencing - vysokokapacitní masivně paralelní sekvenování) využívá miniaturní platformy k simultánní amplifikaci a sekvenaci 1 miliónu až 43 biliónů sekvencí, každý o délce 50-400 bp (obojí v závislosti na platformě, přístroji atd.) v rámci jednoho experimentu (tj. jednoho běhu instrumentu). Miniaturní platforma bývá nazývána “flowcell” (“průtoková komůrka”) a 50-400 bp sekvence “read” (“čtení”). NGS byla vyvinuta v letech 1994-1998 a komerčně je používána zhruba od roku 2005 a postupně nahrazuje Sangerovo sekvenování DNA. Firmy poskytující chemikálie, flowcellly a instrument pro NGS využívají různých sekvenačních a detekčních principů (např. www.illumina.com). Prvním využívaným přístupem bylo pyrosekvenování firmy Roche na přístroji „454“, která využívala detekce záblesku při uvolnění pyrofosfátu po přidání správného komplementárního dNTP (www.ebi.ac.uk/training/online/course/ebi-next-generation-sequencing-practical-course/what-next-generation-dna-sequencing/454-seque). Výhodou tohoto typu sekvenování NGS bylo čtení dlouhých sekvencí, nevýhodou časově náročná příprava knihovny (tj. souboru sekvencí DNA vhodné délky a cílové sekvence genomu připravená pro sekvenaci na NGS analyzátoru) pomocí emulzní PCR.

Dalším přístupem, a to dnes nejčastěji používaným, je sekvenace pomocí syntézy, kdy je DNA amplifikována v mnoha bodech (klastrech) na pevném substrátu (flowcell) tzv. “bridge” amplifikací, kdy je řetězec sekvenované DNA je syntetizován rozdílně značenými dNTP a v každém cyklu snímán. Snímaný

signál je převeden na informace o konkrétním nukleotidu readu (klastru) v dané pozici. Jednotlivé osekvenované sekvence jsou pak bioinformaticky přiřazeny ke známé sekvenci analyzovaného organismu, v klinické genetice tedy k referenční lidské DNA (jedná se o směs několika jedinců). U sekvenování patientských vzorků jde tak tedy o tzv. resekvenování genomové DNA. Získané sekvence jsou porovnávány s referenční sekvencí a všechny homozygotní (objevující se ve 100% čtení) i heterozygotní (objevující se ve 50% čtení) varianty jsou informaticky označeny. Pomocí NGS je možné odhalit i mozaikové formy daných variant. Mutace detekované NGS jsou většinou ověřovány Sangerovým sekvenováním DNA pro případ, že by se jednalo o sekvenační artefakt. Pokud je hloubka pokrytí (tj. počet čtení přiřazených k dané referenční sekvenci) dostatečná (např. 100x), od ověření Sangerovým sekvenováním se již ustupuje.

Dle množství a typu cílových sekvencí rozdělujeme NGS na panelové, celoexomové a celogenomové. V diagnostice se nejčastěji používá panelové sekvenování, kde je cílen pouze jeden gen, většinou však více genů souvisejících s určitou skupinou onemocnění, tj. např. nádorový panel, kardiomyopatický panel, panel pro intelektovou nedostatečnost. Mezi panelovou NGS patří též sekvenování klinického exomu (CES – clinical exome sequencing), které cílí na geny, u kterých bylo prokázáno spojení s VO nebo u kterých se předpokládá, že nějaké spojení s VO mohou mít. V podstatě by se dalo říci, že jde o geny přítomné v databázi OMIM.org, o geny, u kterých se předpokládá, že způsobují mendelovsky dědičné VO, CES bývá tak nazýván též „Mendeliomem“. V závislosti na výrobci pak pokrývá exonové oblasti a exon-intronová rozhraní ve množství cca. 4000-6000 genů. Celoexomové sekvenování (WES – Whole Exome Sequencing) získává sekvence všech exonů všech genů jaderného genomu. Úspěšnost tohoto sekvenování však není 100 %, jelikož některé na CG dinukleotidy bohaté sekvence (např. promotorové či prvních exonů genů) či repetitivní sekvence je obtížné pokrýt vzhledem k nespecifičnosti či špatné přístupnosti hybridizačních či PCR metodiky. Tento problém pak řeší celogenomová NGS (WGS – Whole Genome Sequencing), při které se nevyvazují sondami jen určité sekvence, ale celá testovaná DNA je rovnoměrně sekvenována. Pokrytí celého genomu je tak rovnoměrnější než pokrytí např. u WES či CES.

NGS (CES, WES, WGS) původně umožňovala celegenomový screening SNP a indel až do cca 30 bp a optimálně doplňovala aCGH. V současné době nové bioinformatické přístupy umožňují též analýzu CNV obzvláště u malých dobře pokrytých sekvencí a u WGS. WGS (která je však nejdražší z hlediska použité sekvenační chemie) umožňuje pomocí vyvíjených bioinformatických postupů detekovat rovněž chromozómové přestavby typu translokace, inverze a inserce, kde mezi indikátory patří zakončení čtených sekvencí ve stejné pozici.

Data získaná pomocí NGS hodnotíme jednak z kvalitativního hlediska, abychom byli schopni zhodnotit věrohodnost experimentu a získaných variant, pravděpodobnost, s jakou je varianta opravdu přítomna a jaká je možnost nezachycení varianty. Hodnotíme tak datový objem určitého sekvenačního běhu („run“) v porovnání s běžným objemem (typický pro panel, počet sekvenačních cyklů a sekvenační platformu), hloubku pokrytí, průměrnou hloubku pokrytí, kolik % cílové sekvence bylo pokryto požadovanou či minimální hloubkou pokrytí. Parametr Q30 pak hodnotí pravděpodobnost, s jakou byl daný nukleotid správně přiřazen na určité dané místo v sekvenci. Hodnotíme též průměrnou délku readů vypovídající o kvalitě přípravy knihovny a tzv. „passing filter“ (PF - % klastrů/readů, které byl program po snímání kamerou s jistotou schopen vyhodnotit), který vypovídá o vhodnosti molarity analyzované knihovny (White SJ et al., 2017).

Nejdůležitější je však hodnocení získaných variant a vyhodnocení jejich patogenicity. Podobně jako u CNV i zde je již víceméně celosvětově uznávaný konsensus o hodnocení variant do 5 kategorií – „classes“. Class 1 varianty jsou benigní, class 2 pravděpodobně benigní, class 3 varianty nejasného významu (VUS – Variant of Unknown Significance), class 4 pravděpodobně patogenní a class 5 patogenní (Richards et al., 2015).

Každá laboratoř si však většinou definuje kritéria pro náležitost ke každé skupině jinak. Při hodnocení patogenicity je nutné využít širokého spektra informací, mezi které patří:

1/ populační frekvence variant ve zdravé populaci – MAF (Minor Allele Frequency), která se liší dle databáze: db SNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/), 1000Genomes (www.internationalgenome.org), EVS (Exome Variant Server-

evs.gs.washington.edu/EVS), ExAC (<http://gnomad.broadinstitute.org/> a <http://exac.broadinstitute.org/>). EVS má nejvíce pokrytých chromozómů a rozděluje frekvenci dle původu populace. Největší výhodou bývají “in-house” databáze, které sbírají data již analyzovaná v dané laboratoři či konzorciu laboratoří a jsou získána na populaci s nejbližším evolučním původem;

2/ povaha varianty (např. záměnová - missense, sestřihová - splice site, terminační - protein truncating);

3/ typ dědičnosti známý pro daný gen a onemocnění pacienta (AD, AR, XL, imprinting, mitochondriální dědičnost);

4/ segregace alely s onemocněním, přítomnost varianty u zdravých nebo naopak postižených rodičů či geneticky příbuzných osob;

5/ evoluční konzervovanost domény a nukleotidu u missense mutací;

6/ „chemická závažnost“ změny aminokyseliny (AA) u missense mutací

7/ predikční softwary u substitucí AA např. Polyphen-2 (genetics.bwh.harvard.edu/pph2/), SIFT (sift.bii.a-star.edu.sg), Provean (provean.jcvi.org/index.php), Align GVGD (agvgd.iarc.fr), Mutalyser (mutalyzer.nl), Mutation Taster (www.mutationtaster.org), MutPred2 (mutpred.mutdb.org), PMUT (mmb.pcb.ub.es/PMut/) a PANTHER (www.pantherdb.org/tools/)

8/ predikční softwary sestřihových donorových a akceptorových míst např. Human Splicing Finder v3.1(HSF) (www.umd.be/HSF3/), Fruit Fly Splice predictor (www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html), ESEfinder (Exone Splicing Enhancers finder - rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home), MaxEntScan (genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html) nebo GeneSplicer (ccb.jhu.edu/software/genesplicer/). Pozn: množství a kvalita tohoto software se neustále vyvíjí a je aktualizován (github.com/nmdp-bioinformatics/ngs);

9/ přítomnost/nepřítomnost dané varianty v mutačních databázích např.

ClinVar (www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/NCBI), ClinVitae

(<http://clinvitae.invitae.com>), LOVD (Leiden gene specific mutation database;

www.lovd.nl/3.0/home), HDMD (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php) a HGMD

Professional, placená nicméně dobře reflektující nové publikace

([portal.biobase-international.com/cgi-](http://portal.biobase-international.com/cgi-bin/portal/login.cgi?redirect_url=/hgmd/pro/start.php?)

[bin/portal/login.cgi?redirect_url=/hgmd/pro/start.php?](http://portal.biobase-international.com/cgi-bin/portal/login.cgi?redirect_url=/hgmd/pro/start.php?)), pro nádorové

germinální či somatické varianty pak COSMIC

<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>

10/ nové publikace v Medline (PubMed - NCBI);

11/ v případě nulové populační frekvence a nepřítomnosti v mutačních databázích srovnání typu mutace a typu dědičnosti se známými kauzálními mutacemi v dané proteinové doméně (www.uniprot.org/);

12/ předpokládaný vliv varianty na funkci kódovaného proteinu (snížení funkce či ztráta celého nebo polovičního množství proteinu

Cíle práce

Práce se zaměřuje na molekulární syndromologii u pacientů s intelektovou nedostatečností a široké spektrum vzácných onemocnění, které tato skupina zastřešuje. Tato práce prezentuje zjišťování molekulární příčiny onemocnění u pacientů s ID se speciálním zaměřením na pacienty s Kabuki syndromem a s Kabuki-like fenotypem a dále ID syndromy spojené s histonovými metyltransferázami a demetylázami, glutamátovými receptory a další.

Mezi dílčí cíle této dizertační práce patří:

Cíl 1: Cílené testování mutací v genech *KMT2D* a *KDM6A*

Zavedení molekulárně genetického testování Kabuki syndromu, tedy mutací v genech *KMT2D* a *KDM6A* pomocí Sangerova sekvenování a intragenových přestaveb v těchto genech pomocí metody MLPA, nověji pak pomocí panelového NGS sekvenování.

Potvrzení diagnózy Kabuki syndromu na molekulární úrovni u pacientů syndromicky odpovídajících fenotypu Kabuki syndromu a zjištění dědičnosti mutace, které by pak rodině umožnily vhodný management onemocnění a vhodné reprodukční možnosti u dalších členů rodiny.

Zjištění genotypového spektra mutací v *KMT2D* a *KDM6A* genech v české populaci.

Zhodnocení korelace genotypu s fenotypem u pacientů s Kabuki a Kabuki-like syndromy.

Zhodnocení využití fenotypového “MLL2-skóre” publikovaného Makrythanasis a kol. 2013 pro indikaci k molekulárnímu testování *KMT2D* genu.

Vyhodnocení nejvhodnějšího testovacího algoritmu u pacientů s Kabuki a Kabuki-like syndromy.

Cíl 2: Zjištění molekulární příčiny vzácného onemocnění u pacientů s Kabuki-like fenotypem

Determinace molekulární příčiny onemocnění u pacientů s Kabuki-like syndromy, u kterých nebyla nalezena kauzální příčina onemocnění ve známých kauzálních genech (*KMT2D* a *KDM6A*) pomocí celogenomových screeningových metod jako aCGH a exomová NGS.

Detekce genomových lokusů, které by mohly být zodpovědné za rozvoj Kabuki-like fenotypu, a mohly by tak reprezentovat diferenciální diagnózu Kabuki syndromu.

Cíl 3: Využití vyšetření klinického exomu pomocí NGS u pacientů se syndromově asociovanou intelektovou nedostatečností k detekci dalších potenciálně kauzálních genů

Zhodnocení využití metody NGS s panelem pro klinický exom při identifikaci molekulárních příčin u vzácných onemocnění s intelektovou nedostatečností.

Molekulární syndromologie u vzácných onemocnění s ID způsobených mutacemi v genech kódujících histonové metyltransferázy/demetylázy, glutamátové receptory a další proteiny zahrnuté ve vývoji centrální nervové soustavy (CNS), v apoptóze, v mRNA sestřihu.

Materiál a Metody

Soubory pacientů

Pacienti s Kabuki a Kabuki-like fenotypem

Skupina 1

Pro Cíl 1 této studie, tedy ve stručnosti k potvrzení diagnózy Kabuki syndromu (KS) na molekulární úrovni, byl použit reprezentativní soubor 43 pacientů z různých genetických center v České republice (Praha, Hradec Králové, Ústí nad Labem, Brno, Ostrava), kteří byli doporučeni k molekulárnímu KS testování na našem pracovišti v letech 2013-2017. Pacienti byli ve věku 1-24 let, průměrný věk 8 let, 23 chlapců a 20 dívek. Výčet pacientů je uveden v Tabulce 6 v sekci Výsledky. Všichni pacienti prošli jednou nebo několika genetickými konzultacemi a dle klinického fenotypu byla jejich diagnóza stanovena jako Kabuki syndrom nebo byl tento syndrom zvažován alespoň jako jedna z nejpravděpodobnějších diagnóz. Někteří pacienti měli tuto diagnózu několik let, ale v České republice (ČR) nebylo dostupné molekulární testování tohoto syndromu. U 41 pacientů byla mutace v genech *KMT2D* a *KDM6A* zjišťována pomocí Sangerova DNA sekvenování v obou genech, přičemž u dvou pacientů (KS42 a KS45) bylo mutační testování těchto dvou genů provedeno pomocí panelové NGS. Ke zjištění spektra mutací v genech *KMT2D* a *KDM6A* v ČR byla do souboru přidána mutace v genu *KMT2D* nalezená při NGS (CES) plodu ženského pohlaví se srdeční vadou patrnou na ultrazvuku (KS39).

Skupina 2

Pro Cíl 2, tedy ve stručnosti pro zjištění molekulární příčiny VO u pacientů s Kabuki-like syndromem (KLS) sekvenčním testováním metodou aCGH a NGS (CES), byl použit soubor 18 pacientů (ze 43 pacientů ve skupině 1), kteří prezentovali klinicky Kabuki syndrom, ale nebyla u nich prokázána mutace v žádném z kauzálních genů *KMT2D* a *KDM6A* (*KMT2D*-/*KDM6A*-) a rodiče podepsali souhlas s NGS. V této souvislosti je nutno uvést, že u 8 *KMT2D*-/*KDM6A*- KLS pacientů jsme souhlas k provedení NGS neobdrželi. V testované skupině 18 *KMT2D*-/*KDM6A*- KLS pacientů bylo 8 chlapců a 10 dívek ve věku 1-

31 s průměrným věkem 9 let. Pacienti z tohoto souboru jsou uvedeni v Tabulce 6 v sekci Výsledky a označeni symbolem “*”.

Pacienti se se syndromově asociovanou ID

Skupina 3

Pro Cíl 3, tedy ve stručnosti pro zjištění molekulární příčiny onemocnění u pacientů se syndromově asociovanou ID pomocí CES a ověření využití NGS trio analýzy panelem CES, byl vytvořen soubor 60 pacientů bez nálezu cíleným molekulárně genetickým testováním kandidátních genů a bez nálezu na aCGH. Rodiče pacientů byli zdraví a pacienti nebyli přesněji zařazeni k určitému syndromu, vykazovali dysmorfické obličejové rysy, ID a případně další vrozené vady či abnormality. Seznam všech pacientů podrobených CES testování je shrnut v Tabulce 12.

Metody

Sangerovo DNA sekvenování

Pro určení nukleotidové sekvence DNA v genech *KMT2D* a *KDM6A* u Skupiny 1 (pacienti s KS a KLS fenotypem) bylo použito Sangerovo DNA sekvenování. Primery pro Sangerovo sekvenování genu *KMT2D* byly použity dle publikace Ng et al., 2010. Ty z nich, které neposkytovaly dostatečně kvalitní sekvenační produkt, byly navrženy v roce 2013 pomocí programu Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome).

Vzhledem k tomu, že se jedná o dlouhý gen (36,35 Mb) s dlouhou kódující sekvencí (ORF 16,6 kb), bylo celkem využito 23 PCR produktů o velikosti 568-2193 bp, a následně byly ještě navrženy primery pro kvalitnější čtení 3' konce exonu 10 a celý exon 15. Celkem bylo tedy sekvenováno 25 PCR produktů pro gen *KMT2D* u každého pacienta. Jako sekvenační primery byly použity PCR primery pro 3' a 5' konce PCR produktů (F a R PCR a sekvenační primery) a dále sekvenační primery umístěné uvnitř PCR produktů pro dosekvenování celé délky ampliconu (SF, SR, SF2 a SR2 sekvenační primery). Seznam použitých primerů je uveden v Příloze 1.

Primery pro Sangerovo sekvenování genu *KDM6A* byly opět navrženy pomocí Primer-BLAST a byla k nim připojena univerzální sekvence (UNIF pro 5' konec a UNIR pro 3' konec PCR produktu) odvozená od fága M13. Navržené primery tak byly použity pouze k získání specifických PCR produktů zahrnujících exonové sekvence, včetně exon/intronového rozhraní tohoto genu. K sekvenaci PCR produktů pak byly použity UNIF a UNIR primery sestávající pouze z univerzální M13 sekvence. Gen *KDM6A* je celkově poměrně dlouhý (239,43 Mb), ale jeho kódující sekvence je krátká (ORF 4,2 kb). Pro 29 krátkých exonů tak bylo využito 20 PCR produktů pro následnou sekvenaci DNA. Seznam použitých primerů je uveden v Příloze 2.

Sangerovo DNA sekvenování bylo použito též pro ověření veškerých nálezů CES sekvenování u Skupiny 2 (pacienti fenotypem KLS) a Skupiny 3 (pacienti se syndromově asociovanou ID). Primery byly navrženy vždy 100-300 bp od místa mutace pomocí program Primer BLAST. Navržené primery byly vizualizovány vzhledem k sekvenci a uchovávány pro daný gen pomocí softwaru SnapGene Viewer (www.snapgene.com).

Veškeré oligonukleotidy byly syntetizovány firmou Eurofins Genomics AT (Ebersberg, SRN). PCR produkty byly namnoženy pomocí PCR mixu PCR BIO HS Taq mix Red (PCR Biosystems, London, UK; www.pcrbio.com/) obsahujícího Taq polymerázu, MgCl₂ a všechny čtyři dNTP. Do PCR reakce byly přidány 10 pmol/μl PCR primery a pacientova DNA o koncentraci 30ng/μl. PCR produkty byly přečištěny pomocí FastAP Thermosensitivní Alkalické Fosfatázy a Exonukleázy I (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA; www.thermofisher.com/cz/en/home.html). PCR produkty byly osekvenovány pomocí sekvenačních primerů (2.5 pmol/μl) a dideoxynukleotidové terminační metody pomocí BigDye Terminator v3.1 Cycle (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA; home.appliedbiosystems.com/about/contact/). Sekvenační produkty byly přečištěny a vysráženy pomocí 3M acetátu sodného a 70 %, resp. 100 % etanolu, rozpuštěny ve formamidu a následně analyzovány pomocí kapilární elektroforézy na analyzátoru ABI3130XL a programu Sequencing Analysis v5.3 (vše Applied Biosystems, Forster City, CA, USA; home.appliedbiosystems.com/about/contact/).

Nalezené varianty byly hodnoceny nejprve dle MAF (NCBI) a dle zastoupení v ExAC, zvažovány jako patogenní byly pouze mutace s populační frekvencí 0 % v obou databázích. Dále byla hodnocena povaha mutace. Protein zkracující varianty a varianty v nuleotidu -1, -2, +1, +2 byly považovány za patogenní. Varianty typu missense a inframe deletion / duplication byly hodnoceny pomocí softwaru Alamut v2.3 (Interactive Biosoftware, Rouen, Francie; www.interactive-biosoftware.com), zahrnujícího predikční softwaru pro záměnu aminokyseliny SIFT, PolyPhen-2, Align GVGD a sestřihové predikční softwaru HSF, MaxEntScan, GeneSplicer a dále vyhodnocujícím konzervovanost nukleotidu, aminokyseliny, závažnost chemické změny aminokyseliny, vliv na funkci proteinové domény. Varianty a mutace nalezené v genu *KMT2D* byly pak porovnávány s mutacemi publikovanými Ng et al. 2010, Paulussen et al. 2010, Hannibal et al. 2011, Banka et al. 2011, Micale et al. 2011, Li et al. 2011, Makrythanasis et al. 2013, Miyake et al. 2013, Borgenshausen et al. 2013 a Micale et al. 2014 a po získání placeného přístupu (v roce 2016) pak i s databází HGMD Professional (QIAGEN, Hilden, SRN; www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php).

Metoda MLPA

Padesát ng DNA od jednotlivých pacientů bylo denaturováno a hybridizováno se sondami pro jednotlivé exony genu *KMT2D* (diagnostická souprava P389-A1), respektive se sondami pro jednotlivé exony genu *KDM6A* (P445-A1) (MRC Holland, Amsterdam, NL). Seznam sond pro gen *KMT2D* je uveden v Příloze 3, přičemž MLPA kit neobsahuje sondy pro exony: 2, 3, 5, 6, 8, 9, 12, 13, 16-18, 20, 21, 23-25, 27-29, 32, 36-38, 40, 42, 44, 46, 48 a 50-53. Seznam sond pro gen *KDM6A* je uveden v Příloze 4, kit neobsahuje sondu pro exon 14.

Páry sousedně hybridizovaných sond byly následně ligovány a cílené sekvence byly amplifikovány pomocí PCR, vše dle instrukcí výrobce. Výsledné DNA fragmenty byly analyzovány kapilární elektroforézou na sekvenátoru ABI 3130XL. Intenzita signálů jednotlivých fragmentů u patientské DNA byla porovnávána s tou u kontrolní DNA a výsledky byly získány pomocí in-house softwaru E-mlpa (emlpa.lf2.cuni.cz/) a paralelně i pomocí softweru Coffalyser (MRC Holland, Amsterdam, NL; support.mlpa.com) – viz. Obrázky 3 a 4.

Korelace fenotypu vyšetřovaných pacientů s jejich genotypem

V rámci této dizertační práce byl vypracován “Kabuki fenotypový dotazník FN Motol” zahrnující 38 fenotypových znaků pozorovaných často či méně často u pacientů s KS. Pacienti byli přijati k vyšetření genů *KMT2D/KDM6A* pouze s vyplněným dotazníkem od indikujícího klinického genetika. Tento Dotazník je uveden v Příloze 5.

Fenotypové “MLL2-skóre”

Uvedené fenotypové skóre bylo vyvinuto a publikováno Makrythanasisem et al. 2013 a zahrnuje 23 fenotypových znaků, z nichž každý přispívá k výslednému fenotypovému skóre jinak velkou hodnotou. Maximální hodnota tohoto skóre je 10. Výpočet je uveden v následující tabulce:

Skupina klinických znaků	Možné skóre	Započítávané klinické znaky
Faciální znaky	0–5 bodů (0–3 znaky = 1 bod; 4–6 = 2 body; 7–9 = 3 body; 10–12 = 4 body; 13–15 = 5 bodů)	Dlouhé oční stěrbiny; evertované spodní víčko; velké dysplastické uši; klenuté obočí, prořídlá laterální třetina; plochá špička nosu; abnormální dentice; vysoké patro/rozštěp patra; strabismus; modré skléry; malá mandibula; plůza; široký kotén nosu; oligodontie; úzký horní a plný spodní ret; noduly na rtech
Abnormality končetin	Max 1 bod (0–1 znaky = 0 bodů; 2–4 = 1 bod)	Perzistentní polštářky na prstech; brachy- nebo klinodaktylie; kloubní laxicita; dysplázie kyčelních kloubů
Mikrocefalie	1 bod	
Malý vzrůst	1 bod	
Špička	1 bod	
Leďviny	1 bod	
Celkem	0–10 bodů	

Všechny tyto znaky jsou barevně označeny ve fenotypovém KS dotazníku FN Motol pro usnadnění výpočtu (faciální znaky modře, abnormality končetin zeleně, 4 znaky s vysokou hodnotou červeně) viz. Příloha 5.

Pro každého pacienta bylo vypočítáno výsledné “MLL-2 skóre”, bylo zjištěno průměrné skóre pro skupinu pacientů s mutací v genu *KMT2D* a pro skupinu pacientů bez mutace v genu *KMT2D*. Výpovědní hodnota tohoto skóre u českých KS pacientů pak byla zhodnocena Wilcoxonovým rank sum testem pomocí statistického softwaru R-project (www.r-project.org).

Porovnání fenotypových vlastností

Přítomnost 38 fenotypových vlastností sledovaných u pacientů s KS pomocí

našeho fenotypového dotazníku byla porovnána mezi pacienty s mutací v genu *KMT2D* a pacienty bez mutace v genu *KMT2D*. U každého fenotypového znaku bylo vypočítáno jeho procentuální zastoupení ve skupině *KMT2D+* resp. *KMT2D*. Statisticky byl zhodnocen každý fenotypový znak probitovým modelem, zda předpovídá více než jiné znaky přítomnost mutace v genu *KMT2D*. Získané p-hodnoty byly korigovány statistickými metodami dle Benjaminiho a Hochberga (www.statisticshowto.com/benjamini-hochberg-procedure).

Komparativní genomová hybridizace aCGH

DNA 18 pacientů ze Skupiny 2 (tj. *KMT2D/KDM6A* mutačně negativních případů) byla dále testována metodou aCGH pro zjištění změn v počtu kopií v rámci celého genomu za použití platformy CytoChip ISCA 8x60K (Illumina, San Diego, USA; www.illumina.com). Jeden čip obsahuje 8 hybridizačních oblastí pro 8 pacientů. DNA každého pacienta hybridizuje s 60 tisíci 60-merových oligonukleotidových sond. Šedesát tisíc jednotlivých sond je na tomto čipu z úsporných důvodů umístěno pouze v jedné kopii. „Backbone“ (tj. průměrný rozestup sond) tohoto čipu je 50 kb, v cílových genových oblastech („ISCA oblastech“) je hustší, mimo tyto oblasti je však řidší – cca. 75 kb. Metoda aCGH byla provedena dle doporučení výrobce, s výjimkou enzymatického značení DNA pomocí kitu od firmy Bluegenome (Fluorescent Labelling System [dUTP]) nebo OGT (CytoSure™ Genomic DNA Labelling Kit; www.ogt.com/products/469_cytosure_genomic_dna_labelling_kits).

Při použití značícího kitu firmy BlueGnome bylo dodrženo doporučení výrobce a DNA byla před samotným značením enzymaticky naštepena (enzymy *Alu I* a *Rsa I* od firmy Promega; www.promega.com). Jako kontrolní DNA byla použita komerčně dodávaná směs DNA sta jedinců od firmy Kreatech – MegaPool Reference DNA (www.diagnosticttechnology.com.au/products/megapool-reference-dna-male-100-individuals) stejného pohlaví jako vyšetřovaný vzorek. Testovaná DNA značená fluorochromem Cy3 a kontrolní DNA fluorochromem Cy5 byla hybridizována na 8x60K chip. Nenavázaná DNA byla z čipů následně odmyta sérií odmyvacích procesů. Signál značené DNA hybridizované na chip byl detekován na skeneru G2565CA Microarray Scanner firmy Agilent

(www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2505-90019_ScannerC_User.pdf). Výsledky testu byly analyzovány pomocí softwaru BlueFuse Multi version v4.0 (Illumina, San Diego, USA; support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/software_documentation/bluefuse-multi-software/BlueFuseMultiv4.4ReleaseNotes-1000000027872_02.pdf).

Patogenicita nalezených variant byla hodnocena dle velikosti CNV, obsažených genů, přítomnosti v databázi benigních variant DGVA (www.ebi.ac.uk/dgva) či naopak v databázích patogenních variant jako je Decipher (decipher.sanger.ac), ISCA (dbsearch.clinicalgenome.org/search) nebo Ecaruca, případně dle publikací v literatuře (Medline).

Next Generation Sequencing (NGS)

NGS klinický exom (CES)

U 18 pacientů ze Skupiny 2, kteří byli jak KMT2D/KDM6A mutačně negativní, tak negativní na nález pomocí array CGH, byla provedena NGS analýza se zacílením na klinický exom („mendeliom“), tedy na geny dříve spojené s genetickým onemocněním, většinou geny obsažené v databázi OMIM (www.omim.org). Tato analýza byla provedena též u všech 60 pacientů ze Skupiny 3. U pacientů, kde byli dostupni oba rodiče, bylo využito přístupu trio-analýzy ke zjištění původu mutací nalezených u probanda. U některých pacientů byly nalezené předpokládané patogenní varianty ověřovány u rodičů až následným Sangerovým sekvenováním.

Sekvenační panel Focused Exome (Agilent, Santa Clara, USA), pokrývající 5.888 klinicky významných genů, byl použit k přípravě knihoven se dvěma indexy pro každého pacienta dle návodu výrobce. Seznam genů Focused Exome kitu je uveden v Příloze 6. Stručně, testovaná DNA byla kvantifikována pomocí spektrofotometru Nanodrop ND-2000 a v ředěné koncentraci okolo 5 ng/ul pak pomocí fluorimetru Qubit 2.0 za použití broad range kitu (Qubit BR). 50ng DNA bylo enzymaticky štěpeno tagmentázou, následně byla provedena selekce fragmentů vhodné délky a délka fragmentů byla analyzována pomocí mikrofluidiky na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer za použití chipu 1000 (Agilent, Santa Clara, USA). Fragmentovaná DNA byla dále hybridizována se sondami pro 5.888 OMIM

genů. Poté byly selektovány nahybridizované fragmenty vhodné délky, a dále byly přečištěny a kvantifikovány pomocí fluorimetru Qubit za použití high sensitivity kitu (Qubit HS) a přístroje Agilent 2100 Bioanalyzer za použití chipu HS (High Sensitivity). Knihovny byly následně sekvenovány syntézou 100 bp dlouhých čtení, za použití pair-end sekvenování v2 Illumina sekvenační chemie na platformě HiSeq2500 (obojí Illumina, USA). Data byla stažena do „klaudového prostředí“ BaseSpace (Illumina, USA) a zde byla též získána kvalitativní sekvenační data jednotlivých sekvenačních běhů a jednotlivých pacientů, jako je průměrná hloubka pokrytí, procento cílové sekvence pokryté minimálně 10x, průměrná délka čtení, pravděpodobnost přiřazení správného nukleotidu do dané pozice (Q30), procento čtení, které lze využít k analýze (PF – passing filter), zastoupení určitého indexu a jiné.

Následné bioinformatické zpracování dat začalo přiřazením jednotlivých čtení k lidské referenční sekvenci dle genomové verze GRCh37 (NCBI)/hg19 (UCSC). Data byla zpracována pomocí Burrows-Wheeler Aligner (BWA) algoritmu následovaném GATK analýzou <https://software.broadinstitute.org/gatk/> a výsledné varianty byly filtrovány pomocí Variant Studio Software 3.0 (Illumina, USA). Možné patogenní varianty byly hodnoceny na základě dědičnosti v rodině resp. vzniku de novo, populační frekvence, fenotypových znaků známých při poruše daného genu, na základě typu mutace, u záměnových mutací dle závažnosti změny aminokyseliny, dle proteinové domény a konzervovanosti nukleotidu a aminokyseliny, dále na základě predikčních záměnových a sestřihových softwarů a na základě publikací v LOVD a HGMD professional databázích a publikací v literatuře.

Patogenicita mutací byla hodnocena v 5-stupňové škále obdobně s doporučeními publikovanými ACMG – American College of Medical Genetics (Richards et al., 2015):

Class/Třída 5: Patogenní varianta (opakovaná v literatuře či ověřena funkčními studii)

Class/Třída 4: Pravděpodobně patogenní varianta

Class/Třída 3: Varianta nejasného významu (VUS – Variant of Unknown Significance)

Class/Třída 2: Pravděpodobně benigní varianta

Class/Třída 1: Benigní varianta

Dle evropských konvencí byly reportovány pouze varianty třídy 4 a 5. Varianty třídy 3 byly reportovány jen pokud se jevíly relevantní, ale zatím neexistoval průkaz patogenicity.

Všechny předpokládané patogenní varianty byly ověřeny Sangerovým sekvenováním u probandů a jejich rodičů.

NGS panel pro Kabuki syndrom

U 2 pacientů ze skupiny 1 byl k testování přítomnosti mutace v genech *KMT2D/KDM6A* použit in-house genový panel NGS vyvinutý pro účely této dizertační práce a pro účely testování genetické příčiny onemocnění u pacientů s hluchotou, slepotou (pouze geny předního segmentu oka) a rozvojem syndromu Kabuki, syndromu Cornelia de Lange a nefrotického syndromu. Panel obsahoval celkem 247 genů a byl navržen pro použití kitu pro přípravu NGS knihoven SeqCap EZ choice library (Nimblegen-Roche, Basel, Švýcarsko) pro sekvenování na NGS sekvenátoru MiniSeq (Illumina, USA) se 150 bp délkou čtení. Seznam genů je uveden v Příloze 7. Příprava knihoven byla principiálně obdobná jako u klinického exomu, pouze knihovny jednotlivých pacientů obsahovaly pouze 1 index. Bioinformatické zpracování dat, filtrování genomových variant i hodnocení patogenicity variant probíhala shodně s postupy u klinického exomu.

Výsledky a diskuze

Cíl 1: Cílené testování mutací v genech *KMT2D* a *KDM6A*

Zavedení molekulárně genetického testování Kabuki syndromu

Pro všech 54 exonů a exon/intronových rozhraní genu *KMT2D* bylo celkem navrženo či převzato z publikace Ng et al. 2010 25 sekvenačních úseků o délce 568 - 2193 bp. Přítomnost PCR produktů pro jednotlivé exonové úseky byla ověřena na 2% agarózovém gelu (Obrázek 1).

Pro všech 29 exonů a exon/intronových rozhraní genu *KDM6A* bylo celkem navrženo 20 PCR produktů. Přítomnost PCR produktu pro jednotlivé exonové úseky byla rovněž ověřena na 2% agarózovém gelu (Obrázek 2).

Sekvence obou genů byla validována na kohortě 6 zdravých náhodně vybraných (anonymizovaných) jedinců a bylo zajištěno, že je s vysokou kvalitou přečtena veškerá kódující sekvence a dále minimálně 10 nt do obou sousedních intronů pro každý vyšetřovaný exon.

Komerčně dostupný MLPA kit pro gen *KMT2D* (P389-A1) byl validován na kohortě zdravých jedinců a bylo zjištěno, že všeobecně dvojice sond pro exon 34 poskytuje nižší signál, přestože je exon 34 přítomen v obou alelách. Z tohoto důvodu a s vědomím daného technického artefaktu byl pak test využit u pacientů s podezřením na KS. Komerčně dostupná MLPA diagnostická souprava pro gen *KDM6A* (P445-A1) byl uvedena na trh až v roce 2015 a naše úvodní publikace výsledků (Paděrová et al., 2016) byla první uvádějící použití tohoto kitu. Bohužel ani pro jednu z diagnostických souprav nebyla dostupná žádná pozitivní kontrola, jelikož CNV v oblasti těchto genů jsou velmi vzácné, pouze s několika publikovanými případy u *KMT2D* genu (Banka et al., 2013) a *KDM6A* genu (Banka et al., 2015).

U dvou pacientů z naší kohorty KS42 a KS45 byla mutace nalezena pomocí NGS panelu 247 genů (mezi nimi *KMT2D* a *KDM6A*; seznam těchto genů je

uveden v Příloze 7). Tento panel byl námi navržen částečně pro účely této práce v roce 2017, kdy finanční a časové požadavky na panelové NGS sekvenování začaly být nižší než u klasického Sangerova sekvenování. Kvalitativní parametry panelového NGS testu jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tímto panelem bylo analyzováno celkem 20 vzorků DNA testovaných na různé choroby a geny, 2 z nich byli pacienti s podezřením na KS (a klinicky doporučení k molekulárně genetickému testování až v době zavádění panelové NGS). Run se 151 sekvenačními cykly pair-end sekvenování fragmentů o délce cca 500 bp došel s objemem 8,68 Gb, passing filtr čtení PF 94,85 %, průměrným kvalitativním score Q30 = 93,58 %, průměrným pokrytím okolo 100 čtení a 77 % cílových bazí bylo pokryto alespoň 20x. Z těchto kvalitativních hodnot vyplývá, že získaná sekvenační data jsou vysoce kvalitní a spolehlivá. Vzhledem k tomu, že NGS metody však stále ještě mohou vytvářet určité artefakty, varianty nalezené pomocí NGS byly pak následně ověřeny bodově cíleným Sangerovým sekvenováním DNA u pacienta a pokud možno i u jeho rodičů / sourozenců.

Potvrzení diagnózy Kabuki syndromu na molekulární úrovni a zjištění genotypového spektra mutací v *KMT2D* a *KDM6A* genech v české populaci

Metodou MLPA nebyla nalezena žádná delece ani duplikace v pokrytých exonech genů *KMT2D* ani *KDM6A*, negativní výsledky jsou ukázány vždy na příkladu jednoho pacienta na Obrázcích 3 - 4 pro každý gen. Priolo et al. 2012 též použili MLPA analýzu pro gen *KMT2D* ve své kohortě KS pacientů a též nenalezli CNV. Oproti tomu Banka et al. 2013 našli CNV v genu *KMT2D* u 3/64 pacientů. Lederer et al. 2014 a Banka et al. 2015 detekovali částečnou a kompletní deleci genu *KDM6A*.

Metodou Sangerova DNA sekvenování genu *KDM6A* nebyla u žádného z pacientů nalezena mutace, stejně tak jako ve studiích Hannibal et al. 2011 a Courcet et al. 2013. Toto zjištění není neočekávané vzhledem k tomu, že záchyt mutací v tomto genu byl stanoven ve velkých kohortách pacientů KS

na cca. 1-6% (Lederer et al. 2014 a Banka et al. 2015).

U 40 % (17/43) pacientů s podezřením na KS byla nalezena kauzální mutace v genu *KMT2D*. Tento mutační záchyt je srovnatelný s publikovanými mutačními záchyty 44 % (Micale et al. 2013), 48 % (Borgershausen et al. 2013 a Banka et al. 2012, 52 % (Makrythanasis et al. 2013) a 56 % (Li et al. 2011). V klinickém prostředí jsou toto pravděpodobně reálnější hodnoty než ty, které publikovali Paulussen et al. 2011 (75,6 %) a Hannibal et al. 2011 (74,0 %).

Mezi našimi pacienty s potvrzenou diagnózou KS je 11 chlapců a 6 dívek. Přestože se zdá, že v naší kohortě je téměř dvojnásobné množství chlapců než dívek, obdobné publikace takovéto trendy neuvádějí. Jde tedy pravděpodobně o chybu malých čísel vzhledem k menší velikosti studované kohorty.

Seznam všech nalezených mutací je uveden v Tabulce 2 a příslušné sekvenační elektroferogramy mutací na Obrázku 5. Ke zhodnocení spektra mutací v genu *KMT2D* byla do tabulky přidána též mutace v genu *KMT2D* (KS39 / NG82), která byla nalezena pomocí celoexomového NGS ve vzorku plodové vody u plodu ženského pohlaví s detekovanou srdeční vadou.

Šest z 18 mutací bylo již dříve publikováno či uvedeno v mezinárodních mutačních databázích, včetně nejčastější celosvětově rekurentní frameshiftové mutace c.6594delC. Dvanáct mutací bylo poprvé popsáno v naší kohortě, přičemž 3 z nich byly publikovány v publikaci Paděrová et al. 2016 a další 3 pak v publikaci Paděrová et al. 2018.

Mutace jsou rozloženy v různých exonech genu *KMT2D* (tak jak je graficky znázorněno na Obrázku 6): intron 2, exon 8, 2x exon 10, exon 16, exon 25, 2x exon 31, exon 34, 2x exon 39, exon 40, 3x exon 48, exon 51 a 2x exon 52. Vyšší počet mutací ve většině exonů je dán jejich větší délkou, tj. exony 10, 31, 39 a 48.

Většina mutací (15/18) v genu *KMT2D* je protein zkracujícího typu, 7 typu stop a 8 posunu čtecího rámce, předpokládáme tudíž jejich zřejmou patogenicitu pro rozvoj KS. Nebyla nalezena žádná mutace typu missense a nebyla tak

nutnost hodnocení funkční domény či závažnosti záměny aminokyseliny či nukleotidu (chemické vlastnosti, konzervovanost). Jedna mutace byla sestřihového typu v pozici +1, proto předpokládáme též její patogenicitu dle konsenzuálních kritérií pro sestřihové mutace. Konečně jedna duplikace (nepřerušující čtecí rámeček tohoto genu) byla již dříve publikována u pacienta s KS, a proto se též přikláníme k její patogenicitě i u našeho pacienta.

Mutační spektrum v genu *KMT2D* v naší kohortě je obdobné jako ve všech publikacích se stejným zaměřením (Borgershasen et al. 2013, Li et al. 2011, Paulussen et al. 2010, Miyake et al. 2013, Micale et al. 2013, Hannibal et al. 2011, Banka et al. 2012, Makrythanasis et al. 2013), kdy naprostá většina mutací je protein zkracujícího typu s tím, že mutace posunu čtecího rámce převažují nad stop mutacemi, záměnových mutací je zhruba 2x méně a nejmenší procento připadá na sestřihové mutace a indel mutace nemění čtecí rámeček tohoto genu. Je zajímavé, že v české kohortě jsme nezachytili žádnou patogenní missense mutaci. Veškeré SNP, které jsme zachytili v tomto genu, měly buďto malou populační frekvenci či byly zachyceny též u našich českých náhodných populačních kontrol.

Makrythanasis et al. 2013 a Miyake et al. 2013 shodně uvádějí, že protein zkracující mutace jsou náhodně rozmístěny ve všech exonech genu, tak jak je tomu i v naší kohortě, zatímco pravděpodobně patogenní missense mutace jsou umístěny v místě funkčních domén proteinu, tj. především v exonu 48 - funkční domény PHD (plant homeo domain finger), FYRN (N-terminal phenylalanine/tyrosine rich domain), FYRC (C-terminal phenylalanine/tyrosine rich domain) a v exonech 52 a 53 – SET (metyltransferázová) doména.

U 6 našich pacientů s mutací v genu *KMT2D* byli testováni též rodiče, tak aby mohl být zjištěn původ mutace. U žádného z rodičů nebyla mutace nalezena a byl tak potvrzen vznik mutace *de novo*. U ostatních pacientů nebyli prozatím rodiče dostupní, avšak vzhledem k jejich normálnímu fenotypu a IQ u nich výskyt mutace nepředpokládáme. Shodně všechny publikace uvádějí vznik mutací v genu *KMT2D de novo*, což logicky vyplývá z negativních reprodukčních možností pacientů se syndromově asociovanou ID. Pouze několik případů AD dědičnosti bylo pozorováno celosvětově, např. Brazilská

rodina (Kokitsu-Nakata et al. 2012), kde matka s mutací v genu *KMT2D* byla postižena pouze mírně (pouze snížené IQ) v porovnání se svou výrazněji postiženou dcerou, což je pravděpodobně důsledkem variabilní expresivity a v tomto případě též missense povahy mutace, kde defektní protein je pravděpodobně alespoň částečně funkční.

Korelace fenotypu s genotypem a zhodnocení využití fenotypového „MLL2-skóre“ a vhodný testovací algoritmus pro diagnostiku KS

Fotografie dokumentující obličejové znaky některých pacientů s mutací v genu *KMT2D*, u kterých dali rodiče povolení s publikací fotografie, jsou součástí Obrázku 7, tak jak byl publikován v článku Paděrová et al. 2016. Obličejové fotografie několika pacientů bez mutace v genu *KMT2D*, u kterých dali rodiče povolení s publikací fotografie, jsou součástí Obrázku 8 ve výsledcích Cíle 2 této dizertační práce.

Před zahájením molekulárně genetického testování byly klinickými genetiky vyplněny fenotypové KS dotazníky (viz Příloha 5) a fenotypové znaky jednotlivých pacientů pak byly převedeny do Tabulky 3 pro pacienty, u kterých byla posléze zjištěna mutace v genu *KMT2D*, a do Tabulky 4 pro pacienty s KS bez mutace v genu *KMT2D*. V tabulkách je uvedeno procentuální zastoupení daného znaku v dané skupině pacientů s KS.

Všeobecně lze shrnout, že naprosto všichni pacienti s mutací v genu *KMT2D* (*KMT2D+*) nesli 3 shodné rysy: ID, dlouhé oční štěrbiny a široký kořen nosu. Většina *KMT2D+* pacientů pak měla rysy zahrnující malou postavu, mikrocefalii, hypotonii, klenuté obočí a dlouhé oční štěrbiny, velké dysplastické uši a vrozenou srdeční vadu. Některé znaky se však zdají být zastoupeny zhruba stejně často v obou skupinách a tím nejsou významnými „*KMT2D* mutačními klinickými prediktory“, jako například dlouhé oční štěrbiny, velké dysplastické uši, klenuté obočí, kloubní laxicita nebo fetální polštářky na prstech rukou.

Třicet šest fenotypových znaků (nezahrnujících znaky specifické pro pohlaví jako telarché u děvčat a abnormality testes u chlapců) bylo statisticky

hodnoceno, zda více než jiné znaky koreluje určitý znak s přítomností mutace v genu *KMT2D*. Bylo zjištěno, že 7 znaků ($p < 0,05$) výrazněji predikuje přítomnost mutace v genu *KMT2D*: hypoplastické nehty a prsty, vrozená vada ledvin, ptóza, růstová retardace, strabismus a abnormality patra. Výsledek statistické analýzy je uveden v Tabulce 5.

Makrythanasis et al., 2013 dělal obdobné srovnání fenotypových znaků ve skupině 86 pacientů s KS a zjistil, že přítomnost znaků jako dlouhé oční štěrbiny, fetální polštářky na prstech, evertované spodní víčko, brachy/klinodaktýlie nevykazují signifikantní rozdíl mezi skupinami *KMT2D+* a *KMT2D-*, zatímco statisticky významně ($p < 0.05$) se tyto 2 skupiny liší ve znacích jako jsou plochá špička nosu, široký kořen nosu, klenuté obočí s prořídou laterální třetinou, ID a malým vrůstem. Tyto nálezy se shodují v růstové retardaci s porovnáním v našich skupinách *KMT2D+* a *KMT2D-*.

Shodně s našimi výsledky, též Borgenshausen et al. 2013 a Courcet et al. 2013 shledali statisticky významný rozdíl přítomnosti renálních malformací u *KMT2D+* případů. Courcet et al. 2013 našel renální malformace u 28 % *KMT2D+* a u žádného *KMT2D-* pacienta. V naší kohortě jsme našli renální abnormality u 47 % *KMT2D+* a u 12 % *KMT2D-* pacientů.

Fenotypové „MLL2-skóre“ bylo vypočteno pro všech 43 pacientů s podezřením na KS a je uvedeno v Tabulkách 3 a 4. Průměrné skóre ve skupině *KMT2D+* bylo 7.44 (rozmezí 6-9), ve skupině *KMT2D-* pak bylo 5 (rozmezí 2-7). Wilcoxonovým rank testem bylo zjištěno, že „MLL2 skóre“ je statisticky významně vyšší ve skupině *KMT2D+* než ve skupině *KMT2D-*, a to na hladině statistické významnosti $p = 1,451 \times 10^{-6}$.

Makrythanasis et al. 2013, kteří toto fenotypové skóre navrhli, určili toto skóre pro svou kohortu 86 KS pacientů a shledali, že *KMT2D+* pacienti měli průměrné „MLL2-skóre“ 6.1, zatímco *KMT2D-* pacienti 4.5, což je statisticky významný rozdíl ($p < 0.0014$).

Záchytnost mutací v genu *KMT2D* u všech pacientů s podezřením na KS je 40%, a to bez ohledu na fenotypové skóre. Nicméně u pacientů s fenotypovým skóre minimálně 6 se zvedá záchytnost na 63%, přičemž by měli být zachyceni

všichni pacienti s mutací v tomto genu. Doporučujeme proto algoritmus testování začínající fenotypovým hodnocením a u pacientů se skóre vyšším nebo rovným 6 pak pokračování cílenou analýzou genů *KMT2D* / *KDM6A*. U pacientů se skóre 5 a nižším doporučujeme začít rovnou testováním v rozsahu CES, jak bude dále podpořeno výsledky Cíle 2 této dizertační práce. Simultánní využití MLPA testu je doporučeno, tak jako u jiných diagnosticky testovaných genů, jelikož se předpokládá, že určité malé procento pacientů s monogenním syndromem ponese CNV v daném genu. Panelové sekvenování pomocí NGS by však postupným zdokonalováním bioinformatických algoritmů mělo být schopno detekovat jak SNP a indel mutace, tak i CNV.

Na základě našich výsledků též navrhuje, že by bylo možné využít 7 fenotypových znaků, které nejvíce diferencují mezi pacienty s mutací a bez mutace v genu *KMT2D* ke zpřesnění již zavedeného a dobře fungujícího fenotypového skóre, tak aby byl překryv ve výsledné hodnotě skóre mezi oběma skupinami pacientů minimální.

Konečně nebyl nalezen žádný vztah mezi typem či umístěním mutace a fenotypem pacienta. Toto je pravděpodobně způsobeno faktem, že většina mutací je protein zkracujícího typu a dochází k degradaci mRNA transkriptu s předčasným terminačním kodonem pomocí mechanismu nonsense-mediated decay a fenotypový efekt je pak obdobný pro všechny pacienty. Variabilní expresivita znaků pravděpodobně závisí na jiných faktorech působících v době vývoje plodu.

Cíl 2: Zjištění molekulární příčiny vzácného onemocnění u pacientů s Kabuki-like fenotypem

aCGH poskytla u všech 18 pacientů kvalitní profily počtu kopií pokrývajících celý genom.

NGS (CES) sekvenování proběhlo s vysokou kvalitou u všech běhů, ve kterých bylo zařazeno 16 pacientů, kteří i po provedení array CGH analýzy zůstali bez diagnostikované molekulární příčiny onemocnění. CES poskytlo u všech pacientů průměrnou hloubku pokrytí minimálně 66x. Pro všechny pacienty

bylo minimálně 10x pokryto 95% cílových sekvencí (tedy exonových sekvencí a sekvencí exon/intron rozhraní u 5.888 klinicky významných genů).

Z 18 KMT2D- pacientů s Kabuki-like fenotypem byla objasněna molekulární podstata onemocnění sekvenčním testováním aCGH a CES celkem u 6 pacientů tj. u 33% KS-like pacientů. U 2 pacientů byla nalezena kauzální CNV pomocí aCGH a u 4 pacientů byla nalezena kauzální mutace pomocí CES. Seznam nálezů v této skupině je uveden v Tabulce 6 a 7. Nalezené genomické změny tak reprezentují onemocnění, která se mohou projevovat podobným fenotypem jako Kabuki syndrom, u některých pacientů a někdy pouze v určitém věkovém období. Následující detekované genetické změny tak mohou prezentovat diferenciální diagnózu pro Kabuki syndrom. Porovnání fenotypových rysů jednotlivých pacientů s fenotypovými rysy popsány u Kabuki syndromu lze vyvodit z Tabulky 4 u pacientů KS9, KS10, KS11, KS17, KS23 a KS25.

Pacientka KS9 (MLL2-skóre 4)

U 3eté pacientky KS9, která nemá nejtypičtější znaky KS jako růstovou retardaci, mikrocefalii ani vrozenou vadu srdce či ledvin, avšak má typický faciální fenotyp KS a hypotonii, jsme našli **6,6 Mb de novo duplikaci** v chromozomové oblasti **Xp21.3p21.2**. Tato oblast zahrnuje **37 genů**. Zejména významné z hlediska intelektové nedostatečnosti je nabytí extra kopie genů **ARX (MIM# 300382)** a **IL1RAPL1 (MIM#300206)** a z hlediska hypotonie pak přerušení genu **DMD (MIM# 300377)** místem zlomu duplikované oblasti. **ARX** je homeoboxový transkripční faktor zodpovědný za vývoj embryonálního mozku a udržování subpopulace kortexových neuronů. **IL1RAPL1** reguluje tvorbu synapsí a synaptický přenos. Různé typy mutací v genech **ARX** a **IL1RAPL1** jsou spojované s intelektovou nedostatečností (Bienvenu et al., 2002, Shen et al., 2014, Carrie et al., 1999, Behnecke et al., 2014). Přerušení jedné kopie genu **DMD**, které má za následek haploinsuficienci proteinu, může způsobovat hypotonii u pacientky. U některých ženských přenašeček nefunkčního **DMD** genu se změnou v X-inaktivaci projevuje svalová slabost

(Hoffman et al., 1992, Heide et al., 2015, Hu et al., 1988). Pokud X chromozóm postižený genetickou přestavbou není plně subjektem náhodné X-inaktivace ve všech tkáních, lze předpokládat, že ID a hypotonie by mohly být následkem. Kolegyně RNDr. Miroslava Hančárová, PhD. potvrdila dalšími testy, že inaktivace u této pacientky byla opravdu změněna a postižený chromozóm zůstal ve větší míře aktivně transkribovaným chromozómem (data nejsou prezentována v této práci). V databázi DECIPHER (decipher.sanger.ac.uk) jsme našli duplikaci podobného rozsahu jako u pacientky KS9, přítomnou u pacientky postižené celkovým vývojovým opožděním (ID:292724). Nicméně v tomto případě byl gen *DMD* zahrnut v duplikované oblasti a neobsahoval místo zlomu. Další ženská pacientka (ID: 262074) uvedená v této databázi prezentovala duplikaci distálně od duplikace pozorované u pacientky KS9 s překryvem v genu *ARX*. Tato pacientka měla ID, nízko posazené uši, malou postavu a dolů směřující oční štěrby. Rozdíly mezi těmito pacienty jsou zjevně dány posunem v místech zlomu a pravděpodobně též variabilní expresivitou a různou X-inaktivací.

Pacient KS10 (MLL2-skóre 7)

4letý chlapec se závažnou ID a celkovým vývojovým opožděním, centrální hypotonií, postnatální růstovou retardací, mikrocefalií, trigonocefalií, metopickou synostózou, srdečním a renálním defektem, hypoglykemií, sluchovou vadou a dysmorfickými rysy zahrnujícími nízko posazené uši, abnormality vnějšího ucha, řídké vlasy, vysoké a klenuté obočí, hypotelorismus, dolů směřující mandlové a podlouhlé oční štěrby, potlačený kořen nosu, úzký nos, dlouhé filtrum, široká kolumela, mikrognázie, otevřená ústa a úzký horní ret. Některé KS znaky byly lépe patrné ve věku 1 roku, kdy byl pacient poprvé konzultován klinickým genetikem (mikrognázie, klenuté obočí, potlačený kořen nosu) v porovnání s fenotypem ve 4 letech. V obou věkových obdobích byla pacientova váha, výška i obvod hlavy pod 3. percentil. Pacientova fotografie je umístěna na Obrázku 8.

U tohoto pacienta jsme diagnostikovali X-vázané onemocnění **MR XL Turner**

type (MIM# 300706), jelikož je hemizygotním přenašečem záměnové mutace v X-vázaném genu spojeném s ID: **HUWE1 (MIM# 300697) – NM_31407.5:c.328C>T (p.Arg110Trp)**. Mutace byla přidána do LOVD databáze pod ID:0000170305. U matky probanda byla mutace potvrzena v heterozygotním stavu a byla vyloučena u nepostiženého otce, bratra a sestry. Tato varianta má nulovou populační frekvenci (ExAC NFE – Exome Aggregation Consortium databáze, Ne-Finská Evropská populace) a je predikčními softwary hodnocena jako patogenní. Tato mutace byla popsána již u několika pacientů s ID a vývojovým opožděním – Zhu et al., 2015, Taylor et al., 2015, Miller et al., 2017, zatímco jiné mutace v tomto genu byly popsány u několika dalších pacientů s ID – Froyen et al., 2008, Friez et al., 2016. Porovnání fenotypů jednotlivých dříve publikovaných pacientů s mutacemi v genu *HUWE1* a našeho pacienta je uvedeno v Tabulce 8. Všichni pacienti s missense mutací v genu *HUWE1* (včetně našeho pacienta) měli střední až závažnou ID, navývin řeči nebo limitovaný vývoj řeči a růstovou retardaci. Většina pacientů má sluchovou vadu, nízko posazené uši, vysoké čelo a mikrocefalii, podobně jako náš pacient, nicméně u jiných pacientů s mutací v *HUWE1* genu byl pozorován normální obvod hlavy, u jednoho pacienta (s mutací p.Arg4013Trp) dokonce makrocefalie (Froyen et al., 2008). Kraniosynostóza je přítomna u všech 4 pacientů s mutací v aminokyselinovém zbytku AA 110 (vysoce konzervovaná doména neznámé funkce DUF908), včetně našeho pacienta KS10. Většina těchto pacientů (všichni mužského pohlaví) nese mutaci Arg110Trp, nicméně mutace Arg110Gln byla pozorována u ženské pacientky s kraniosynostózou a obtížemi učení, u níž byla prokázána preferenční inaktivace normálního X chromozómu (Taylor et al., 2015). Za zmínku stojí i další fenotypové změny, které byly pozorovány jak u našeho pacienta, tak u jiných pacientů s *HUWE1* mutací, jako dolů směřující oční štěrbin, prořídle vlasy, hypotonie, neobratnost a ataktické pohyby. Jak se dá očekávat u X vázané choroby, většina pacientů je mužského pohlaví. Pacientky ženského pohlaví s mutacemi v tomto genu se nacházejí kdekoli v rozmezí od nepostižených pacientek, pacientek s mírnými poruchami učení až po postižené pacientky s poruchou učení a kraniosynostózou (u mutací v AA 110), pravděpodobně v závislosti na X-inaktivaci. Žádné protein zkracující mutace v tomto genu nebyly doposud popsány.

Pacient KS11 (MLL2-skóre 6)

7letý chlapec s mírnou ID, opožděným vývojem řeči, prenatálně započatou růstovou retardací, epilepsií, mírnou mikrocefalií, úzkým drobným obličejem, středně těžkou převodní poruchou sluchu, úzkými externími sluchovými kanály, hypotonií, krátkým krkem a faciální dysmorfii (nízko posazené uši, hypertelorismus, klenuté laterálně prořídlé obočí, laterální everze spodního víčka, dlouhé řasy, široký kořen nosu, široká ústa, úzký horní ret, široce rozmístěné zuby), s mírně perzistujícími fetálními polštářky na prstech, kratším malíčkem a bez anomálií vnitřních orgánů. Výška chlapce je pod třetí percentil a obvod hlavy pod normálem. Pacientova faciální fotografie je na Obrázku 8.

U pacienta KS11 jsme detekovali **de novo heterozygotní stop mutaci NM_004247.3:c.876T>G (p.Tyr292*) v genu EFTUD2 (MIM#300697)**, který je spojen s **mandibulofaciální dysostózou (MFD) a mikrocefalií (MIM#610636)**. Mutace byla přidána do LOVD databáze pod ID:0000170306. Přestože tato stop mutace nebyla dosud publikována, jiné mutace typu stop, záměnové, posunu čtecího rámce a sestřihové včetně parciálních genových delecí byly již dříve publikovány (Huang et al., 2016, Lines et al., 2012) u pacientů s MFD, mikrocefalií a celkovým vývojovým opožděním. Nejčastějším typem mutace v genu *EFTUD2* jsou protein zkracující mutace (38%) a sestřihové mutace (43%), s tím že 75% mutací se objevuje *de novo* (Huang et al., 2016). Mutace u našeho pacienta se nachází v proteinové doméně vážící elongační faktor Tu GTP a je pravděpodobně patogenní, jelikož zkracuje kódovaný protein více než o polovinu. Tvrzení, že protein zkracující *EFTUD2* mutace jsou patogenní, je podpořeno obdobným fenotypem pacientů nesoucích tento typ mutace. Náš pacient se shodoval s publikovanými pacienty v nejčastěji reportovaných rysech, jako je mikrocefalie, vývojové opoždění, malá postava, převodní ztráta sluchu, abnormality vnějšího ucha a zúžení vnějších sluchových kanálů. Nicméně náš pacient neprezentuje mikrognácii, malární hypoplázii, rozštěp patra a abnormality palce, které jsou často popisovány u pacientů s tímto typem MFD. Hypotonie a epilepsie, které nejsou běžné u MFD, jsou přítomny u našeho pacienta. Absence mikrognácie

a malární hypoplázie nemohou být v tento moment korelovány s genotypem, jelikož jiní pacienti s protein zkracujícími mutacemi tento fenotyp prezentovali (Lines et al., 2012). Porovnání fenotypových znaků typických pro MFD a fenotyvu našeho pacienta (též dalšího pacienta z Cíle 3 této práce) je uvedeno v Tabulce 9.

Pacient KS17 (MLL2-skóre 6)

9letý chlapec s vážnou ID a motorickým opožděním, autismem, opožděným růstem, hypotonií, mírnou mikrocefalií, klinodaktýlií malíčku, krátkými prsty, prominentními polštářky na prstech, kloubní laxicitou a faciálním dysmorfismem (dlouhé úzké nahoru směřující oční štěrby, modré skléry, strabismus, vysoké a úzké patro, široce rozmístěné zuby, abnormality brady, makrócie, abnormální vnější ucho, nízko posazené). Chlapec se narodil s normální váhou a výškou, ve věku 6 let byl však již na 9. percentilu výškově a 21. percentilu z hlediska obvodu hlavy.

Pacient je nosičem **heterozygotní de novo záměnové mutace NM_001185090.1:c.2470A>T (p.Asn824Tyr) v genu GRIN1 (MIM# 138249)**, který je spojen s rozvojem syndromjově asociované ID – **Neurovývojové onemocnění (MIM# 614254)**. Mutace byla přidána do LOVD databáze pod ID:0000170304. Tato mutace nebyla dosud publikována, má nulovou populační frekvenci v databázi ExAC NFE a všemi dostupnými predikčními softwary je hodnocena jako patogenní. Mutace se nachází ve vysoce konzervované transmembránové doméně M4 poblíž C-konce kódovaného proteinu. Popsané patogenní mutace v tomto genu mají tendenci klastrovat v transmembránových úsecích proteinu, což vede ke ztrátě funkce kanálu (Lemke et al. 2016).

Většina patogenních mutací v genu *GRIN1* jsou záměnového typu, nicméně stop mutace a duplikace zachovávající čtecí rámec byly též popsány. V rámci M4 proteinové domény jsou popsány pouze záměnové mutace (Lemke et al. 2016). Dosud nebyla popsána mutace v aminokyselině 824, tak jak je pozorována u našeho pacienta, minimálně 5 záměnových mutací je popsáno

v blízkosti, ve stejné funkční doméně, v rámci aminokyselin 817 a 827. Funkční studie těchto mutací potvrdily kompletní (827) nebo částečnou (817) ztrátu funkce (Lemke et al. 2016). Fenotyp popsany u našeho pacienta byl shodně pozorován i u předešlých publikovaných případů (Lemke et al. 2016, Zhu et al. 2015), tedy výrazné vývojové opoždění a závažná ID, hypotonie, růstové opoždění, nízká váha, mikrocefalie, abnormální pohyby, okulomotorické abnormality nebo “Angelman-like” fenotyp.

Náš pacient, stejně tak jako většina publikovaných pacientů, nikdy nezačal chodit či mluvit. Nicméně náš pacient nemá kortikální oční vadu. Dysmorfické rysy u těchto pacientů jsou reportovány spíše jako mírné, nicméně u našeho pacienta jsou dysmorfické rysy výrazné, viz popis výše. Rodiče pacienta nesouhlasili s publikací jeho fotografie.

Pacient KS23 (MLL2-skóre 6)

V době genetické konzultace 10letý pacient s růstem na 10.- 25. percentilu, s opožděným psychomotorickým vývojem a autistickými rysy, předčasnou pubertou dle ochlupení na mons pubis, hypotrofií, lehkou hypoplázií ledvin, polštářky na prstech, klinodaktýlií malíčku a dysmorfickými faciálními rysy (prodloužené oční štěrby, hypertelorismus, epikanty, vysoké patro, malpozice zubů, velikost ušních boltců na 90. percentilu). V tomto věku se obličejový fenotyp zdál nejvíce typický pro Kabuki syndrom.

U pacienta jsme našli **heterozygotní protein zkracující *de novo* mutaci NM_001197104.1:c.8206delA (p.Thr2736Glnfs*21) v genu KMT2A (MIM#159555) spojeným s Wiedemann-Steiner syndromem (WSS) (MIM#505130)**. Wiedemann-Steiner syndrom je autozomálně dědičné onemocnění, vznikající nejčastěji (podobně jako u Kabuki syndromu) *de novo* mutacemi v genu, který kóduje histonovou lyzin matyltransferázu a tak ovlivňuje transkripci embryonálně exprimovaných genů (včetně *HOX* genů) podílejících se na embryonálním vývinu mnoha orgánových soustav, včetně nervové. Gen *KMT2A* byl původně detekován jako aberantní u myeloidních a lymfoidních leukémií (podobně jako *KMT2D*), je totiž častým fúzním genem u

získaných chromozomálních přestaveb (transkripce a inverze) u těchto onemocnění. Tento gen je nicméně exprimován ve většině lidských tkání a podobně jako u *KMT2D* i zde je zásadní metyltransferázová SET doména umístěná v blízkosti 5' konce genu, udělující tak všem protein zkracujícím mutacím patogenní efekt a má za následek haploinsuficienci kódovaného proteinu.

WSS syndrom je typicky charakterizován psychomotorickým opožděním, pre- a postnatální růstovou deficiencí, chlupatými lokty (někdy též zády a dolními končetinami) a dysmorfickými obličejovými rysy jako hypertelorismus, husté obočí, dlouhé dolů směřující oční štěrby. Dle zpětné vazby klinických genetiků a zpětném zhodnocení fenotypových znaků pacienta v souvislosti se znaky typickými pro WSS bylo shledáno, že diagnóza WSS je v souladu s fenotypem pacienta. Nadměrné pubické ochlupení v ranném věku bylo pravděpodobně variací nadměrného ochlupení typického pro WSS. Ochlupení předloktí mohlo být v tomto věku opomenuto, či zapadalo do celkového zvýšeného ochlupení. Sun et al., 2017 publikovali nalezení dvou stop variant u dvou čínských chlapců, u kterých nebylo ochlupení loktů přítomno i přesto, že jinak nesli všechny rysy typické pro WSS. Nejvýraznější faciální rysy pro WSS jsou velmi podobné těm u KS, speciálně klenuté či husté obočí a dlouhé oční štěrby a mohou být těžko rozlišitelné, alespoň jistě v určitém věkovém období. Porovnání fenotypových znaků typických pro WSS s těmi dále pozorovanými u pacienta KS23 je uvedeno v Tabulce 10. Pro srovnání jsou přidány další naše dvě pacientky NG28 a CDL2, které byly molekulárně diagnostikovány v rámci Cíle 3 této práce a byly původně testovány pro podezření na Cornelia De Lange syndrom. Z tabulky je patrné, že podobně jako u KS i u WSS se projevuje výrazná variabilní expresivita, a to bez ohledu na umístění mutace. Jistou shodu genotypu s fenotypem lze však pozorovat, jelikož základní charakteristické rysy WSS se projevují u všech pacientů a všichni pacienti mají též mutace protein zkracujícího typu či změny sestřihového místa, která jistě výrazně zasahuje do velikosti a konformace kódovaného proteinu.

Strom et al., 2014 našli pomocí CES mutaci v genu *KMT2A* u dvou pacientů, u jednoho záměnovou u dalšího pak sestřihovou. Jones et al., 2012 našli 4 stop

mutace a jednu mutaci posunu čtecího rámce. Miyake et al., 2016 detekovali pomocí WES 2 záměnové mutace, 2 stop mutace a 2 mutace posunu čtecího rámce. 5 pacientů z této kohorty bylo suspektních pro WSS, jeden byl původně diagnostikován jako Kabuki syndrom, podobně jako v případě našeho pacienta. Je tedy zřejmé, že fenotypový překryv obou syndromů je významný obzvláště pak faciálně. Rozlišitelným vodítkem by zde mohlo být důkladné zhodnocení míry a rozmístění ochlupení u pacienta, jelikož nadměrné ochlupení zejména v oblasti lokte je typické pro WSS na rozdíl od KS. Variabilní expresivita však přesto může zapříčinit nemožnost tohoto rozlišení.

Pacient KS25 (MLL2-skóre 4)

10letá dívka s mírnou ID, autistickým chováním, vrozenou srdeční vadou, Arnold Chiari malformací I, prominentními polštářky na konečcích prstů, krátkými články prstů, krátkými malíčky na rukách, krátkými palci na nohu, faciální dysmorfii (široké čelo, velké dysplastické uši, vysoce klenuté obočí, hypertelorismus, dlouhé dolů směřující oční štěrbiny mandlového tvaru, ekotropion, prominentní řasy, modré skléry, široký kořen nosu, široká špička nosu, silná kolumela, krátké a hladké filtrum, vysoké a úzké patro, nepravidelné zuby). Ve věku 5 let byla pacientka výškově na 13. percentilu a obvodem hlavy na 44. percentilu., a v tomto věku take nejvíce připomínala rysy Kabuki syndromu, viz. Obrázek 8. Ve věku 10 let byly její faciální dysmorfické rysy již méně patrné.

Pacientka nese zhruba **200 kb** dlouhou **heterozygotní *de novo* delecí v oblasti 14q11.2**, která zahrnuje **5 protein kódujících genů**, včetně ***CHD8* (MIM#610528)** a ***SUPTH16H* (MIM#605012)**. Tato CNV byla vložena do databáze ECARUCA pod ID: 5284. Tato heterozygotní delece byla již dříve publikována kolegyní Drábovou et al., 2015 a Zahirem et al., 2007. Podobně jako u publikovaných případů s delecí v této oblasti, naše pacientka prezentovala stejné dysmorfické rysy jako široce posazené oči, dolů směřující oční štěrbiny, široký kořen nosu a abnormality zubů. Za povšimnutí nicméně stojí, že u pacientů s delecí v 14q11.2 a s mutacemi v genu *CHD8* byla přítomna makrocefalie, zatímco naše pacientka má obvod hlavy v normálním

rozmezí. Fenotyp pacienty by mohl být spojen se dvěma z pěti genů deletované oblasti: *CHD8* a *SUPTH16H*. Protein zkracující mutace v genu *CHD8* byly dříve spojeny s autismem (ORoak et al., 2012). Genem *SUPTH16H* kódovaný protein se účastní DNA oprav, replikace a transkripce, nicméně mutace v tomto genu nabyly dosud spojeny s žádnou klinickou jednotkou.

Cíl 3: Využití vyšetření klinického exomu pomocí NGS u pacientů se syndromově asociovanou intelektovou nedostatečností k detekci dalších potenciálně kauzálních genů

Z 60 pacientů se syndromově asociovanou ID, u kterých byla provedena CES analýza, jsme zachytili patogenní, pravděpodobně patogenní či VUS (možná patogenní) mutaci u **15 pacientů**, tj. diagnostický výtěžek metody 25%. Seznam nelezenných mutací je uveden v Tabulce 11. Seznam všech pacientů podrobených CES testování a jejich nálezů je sumarizován v Tabulce 12.

Obdobné diagnostické výtěžky exomového sekvenování byly publikovány v několika studiích. Evropské vedoucí NGS centrum v Nijmegenu uvádí diagnostický výtěžek 16% pro 21.000 genů pro blíže nezařazené ID (de Ligt et al., 2012), FORGE projekt Kanada (www.care4rare.ca) pak 29% pro WES u dětí se vzácným onemocněním, které byly již na konci své diagnostické odysey (Sawyer et al., 2016). Retterer et al., 2016 uvádějí 28.8% záchytnost u různých klinických monogenních chorob, Wright et al., 2015 27% pro syndromickou a nesyndromickou ID, Zhu et al., 2015 24% u blíže nediodnostikované ID a u různých fenotypově předpokládaných syndromů (též nálezy v genech *KMT2D*, *GRIN1*, *GRIN2A*, *HUWE1*), Rump et al., 2016 29% u ID s mikrocefalií, Martinez et al. 2017 dokonce 39% pro syndromickou ID (zahrnujíce 3x *KMT2D* gen, 2x *KMT2A* a 1x *NIPBL* gen). Diagnostický výtěžek beze sporu závisí na tom, v jaké fázi diagnostického procesu pacienta bylo exomové sekvenování použito. Retterer et al., 2016 dále uvádí signifikantní rozdíl v záchytnosti pomocí WES v závislosti na testování probanda samotného (23.6%) či probanda zároveň s nepostiženými rodiči – trio analýza (31%). Tento fakt podporuje správnost našeho rozhodnutí

provádět veškeré CES vyšetření pouze v triích, pokud jsou rodiče dostupni.

Co se týká spektra mutací v naší kohortě, u **4 pacientů původně diagnostikovaných jako Kabuki syndrom** byly nalezeny mutace v genech *KMT2A*, *EFTUD2*, *GRIN1* a *HUWE1*, jak je podrobně popsáno v Cíli 2 této práce. U dalších **11 pacientů** (z 10 rodin) s **blíže nezařazenou syndromickou ID** byly nalezeny kauzální mutace v 10 různých genech. V této skupině pacientů byli diagnostikováni další dva pacienti s mutací v genu *KMT2A*, přestože nebylo u pacientů původní podezření na Wiedemann-Steiner syndrom, z důvodu nepřítomnosti kardinálního znaku syndromu – ochlupených loktů. Dále byla nově spojena histonová demetyláza *KDM6B* (ze stejné genové rodiny jako *KDM6A*) se syndromově asociovanou ID. Byl též identifikován další pacient s protein zkracující mutací v genu *EFTUD2* a pacientka s mutací v genu *GRIN2B* ze stejné skupiny genů jako *GRIN1*. U dalších dvou pacientů byla potvrzena AR povaha ID onemocnění – geny *RAB3GAP1* a *HERC2*. Musante a Ropers 2014 odhadli, že AR onemocnění tvoří 13-24% všech ID onemocnění, my jsme je detekovali v naší malé kohortě u 2 z 15 rodin tj. 13%. Stejní autoři odhadují podíl XL onemocnění u ID na 10-12%, kde my jsme detekovali pacienta s *HUWE1* a *ATRX* mutací maternálně přenášených tj. 2/15 – též 13%.

Všichni pacienti s nálezem jsou podrobně popsáni níže.

Pacient 1 (NG28)

2letá pacientka malého vzrůstu (pod 2. percentil), s mírnou hypotonií, poruchou hybnosti, dysplázií kyčlí, nepřítomností řeči, výraznějším drobným ochlupením na stehnech a v bederní oblasti a mírnou faciální stigmatizací (výrazné obočí, epikanty, úzké oční štěrby, široký kořen nosu). V rodině otce se objevuje sluchová vada. Rodina přichází ke genetické konzultaci z důvodu další gravidity.

CES prokázala, že pacientka i její otec jsou heterozygotní přenašeči nejčastější mutace způsobující AR hluchotu v genu kódujícím konexin 26 - *GJB2* (NM_004004.5): c.35delG, a dále prokázala, že pacientka je **heterozygotním nosičem sestřihové mutace c.3335-1G>C**, v intronu 4 genu *KMT2A*

(MIM#159555) (NM_001197104.1) v heterozygotním stavu. Nalezená mutace mění akceptorové kanonické sestřihové místo a má výrazný vliv na aminokyselinové pořadí a délku kódovaného proteinu. Mutace byla Sangerovým sekvenováním vyloučena u obou zdravých rodičů probanky, vznikla tedy *de novo*. Z výše uvedených faktů lze vyvodit, že mutace je pravděpodobně patogenní a je pravděpodobnou molekulární příčinou genetického onemocnění u probanky: **Wiedemann-Steiner syndrom (MIM#605130)**. Porovnání fenotypových znaků typických pro Wiedemann-Steiner syndrom s pacientkou NG28 a dále s pacientem KS23 (viz Cíl 2), u kterého byl též molekulárně diagnostikován tento syndrom, je uvedeno v Tabulce 10. Pro případ germinálního mozaicismu byla testována cíleným Sangerovým sekvenováním DNA z plodové vody sourozence probanky a ta vyloučila nosičství mutace v genu *KMT2A* u plodu. Diskuze ohledně genu *KMT2A* a onemocnění WSS je rozvinuta v Cíli 2 této práce u pacienta KS23.

NG28 <i>KMT2A</i> c.3335-1G>C, p.? / Patogenicita 4									
Gen	RefSeq Transkript	RefSeq Protein	Důsledek varianty	Exon	Zygotita	Související onemocnění	Dědičnost	Potvrzení Sangerem Segregace v rodině	ExAC - NFE (evropská populační frekvence)
<i>KMT2A</i> (Lysine Methyltransferase 2A)	NM_001197104.1: c.3335-1G>C	NP_001184033.1: p.?	Změna sestřihu	Intron 4	Het	Wiedemann-Steiner sy	AD	Ano; mutace neg. u matky i otce	0%
Vyplnit u missense mutací					Publikace				
Doména proteinu	Chemická změna aminokys.	Konzerv. amino kyseliny	SIFT	PolyPhen-2	Mutation Taster	Clinviteae db	ClinVar db	HGMD db	Publikované patogenní mutace
---	---	---	---	---	---	---	---	---	c.4086+1G>A (Strom 2014)

Pacient 2 (CDL2)

19letá pacientka s podezřením na Cornelia de Lange syndrom, dlouhodobě vedena pod touto diagnózou, která nebyla potvrzena na molekulární úrovni z důvodu nedostupnosti testování pro *NIPBL* gen v České republice, prezentuje klenuté dobře definované obočí, ptózu, hypertrichózu a růstové a intelektové opožďení.

Metodou NGS zaměřenou na klinický exom ani metodou MLPA nebyly u probanky nalezeny mutace v genech *NIPBL*, *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21* a *HDAC8* spojených s rozvojem Cornelia de Lange syndromu, byla však nalezena mutace

NM_001197104.1:c.8481T>G (p.Tyr2827Ter) v genu *KMT2A* (MIM#159555), který je spojen s fenotypem **Wiedemann-Steiner syndrom** (MIM#605130). Přítomnost mutace byla ověřena Sangerovým sekvenováním a bylo též ověřeno, že rodiče tuto mutaci nenesou. Fenotypové znaky a jejich porovnání s dalšími pacienty s *KMT2A* mutací, kteří jsou prezentováni v této dizertační práci jsou uvedeny v Tabulce 10.

Diskuze ohledně genu *KMT2A* a onemocnění WSS je rozvinuta výše v Cíli 2 této práce u pacienta KS23.

CDL2 <i>KMT2A</i> c.8481T>G, p.Tyr2827Ter / Patogenicita 4									
Gen	RefSeq Transkript	RefSeq Protein	Důsledek varianty	Exon	Zygozita	Související onemocnění	Dědičnost	Potvrzení Sangerem Segregace v rodině	ExAC - NFE (evropská populační frekvence)
<i>KMT2A</i> (Lysine Methyltransferase 2A)	NM_001197104.1: c.8481T>G	NP_001184033.1: p.Tyr2827Ter	stop	27	Het	Wiedemann-Steiner sy	AD	Ano; mutace neg. u matky i otce	0%
Vyplnit u missense mutací					Publikace				
Doména proteinu	Chemická změna aminokys.	Konzerv. amino kyseliny	SIFT	PolyPhen-2	Mutation Taster	Clinvita db	ClinVar db	HGMD db	Publikované patogenní mutace
Transaktivní doména	---	---	---	---	---	---	---	---	p.Arg2480*

Pacienti 3 a 4 (NG49A a NG49D)

Sourozenci 7letá dívka a 22letý chlapec postižení různým stupněm intelektové nedostatečnosti, opožděním vývoje, autismem, hypotonií, vrozenými vadami srdce, krátkými prsty, makrocefalií a faciální dysmorfii zahrnující široké čelo, hluboko posazené oči, široký kořen nosu a dysplastické uši. Dívka je intelektově výrazněji postižena než bratr, má též spastickou paraparézu, avšak její dysmorfické rysy narozdíl od bratra s věkem ustupují. Dívka je těžko vyšetřitelná a proto nelze s určitostí potvrdit diagnózu neurologa týkající se spastické paraparézy, jde možná pouze o poruchu stability. Porovnání fenotypu sourozenců je prezentováno v Tabulce 13.

U obou sourozenců jsme našli variantu zkracující proteinový produkt **NM_001080424.1:c.2041C>T (p.Gln681Ter) v genu *KDM6B* (MIM#611577),** která byla ověřena Sangerovým sekvenováním. U otce ani matky probanda nebyla přítomnost varianty potvrzena, pravděpodobně se jedná o germinální

mozaicismus u jednoho z rodičů probanda a vznik varianty u obou sourozenců *de novo*.

Tento gen nebyl doposud přesně spojen s rozvojem žádné klinické diagnózy, v literatuře se doposud objevily 3 potenciálně patogenní mutace v tomto genu pro rozvoj syndromické i nesyndromické ID a/nebo autismus, nalezené pomocí rozsáhlých WES studií (Najmabadi et al., 2011, lossifov et al., 2012). Nicméně Najmabadi et al., 2011 považují tento gen za příčinu autozomálně recesivní ID, jimi nalezená varianta je však povahy missense. lossifov et al., 2012 našli heterozygotní variantu posunu čtecího rámce u pacienta s autismem, kde zdraví rodiče a sourozenec tuto variantu nenesli.

KDM6B stejně jako *KDM6A* (Kabuki syndrom 2) je H3K27 demetyláza katalyzující demetylaci H3K27me_{2/3}. Trimetylace histonu 3 na lyzinu 27 je represivní značkou genové exprese. Redukce této trimetylace se objevuje v průběhu embryonálního vývoje a haploinsuficience kteréhokoli z proteinů kódovaných těmito demetylázami způsobuje snížení genové exprese v embryonálním vývoji. *KDM6B* reguluje posteriorní vývoj regulací genové exprese HOX genů. lossifov et al., 2012 řadí *KDM6B* mezi geny asociované s *FMRP* (protein fragilního X), což poukazuje na význam kódovaného proteinu v plasticitě synapse a dále na citlivost na dávku tohoto proteinu u kognitivních onemocnění.

KDM6B se přímo podílí na embryogenezi všech tří zárodečných listů (Burchfield et al., 2015), což by vysvětlovalo komplexní fenotyp probandů. Vyřazení tohoto genu u embryonických kmenových buněk vedlo k redukci diferenciaci endoteliálních buněk a srdečních progenitorových buněk (Ohtani et al., 2013). Kódovaný protein též přímo reguluje expresi klíčových regulátorů neurogeneze jako *PAX6*, *SOX1* a *NESTIN* a má tak pravděpodobně vliv na vývoj nervového systému, periferních nervů a mozku (Burgold et al., 2008). *KDM6B* je též klíčovým regulátorem *SHH* (Sonic HedgeHog gen) řízeného vývoje nervové trubice (Shi et al., 2014). Vyřazení genu *KDM6B* u myši způsobilo narušení indukce programu exprese genů nutných k vyžráním funkční synapse (Wijayatunge et al., 2018). U kravských embryí způsobilo vyřazení maternální *KDM6B* mRNA inhibici redukce množství H3K27me₃ a vedlo ke snížení počtu buněk vnitřní buněčné masy a buněk trofektodermu ve stádiu blastocysty a dále vedlo k downregulaci transkriptů

vztahujících se k regulaci transkripce, chromatinového remodeling a proteinového katabolismu (Chung et al., 2017). Dle ExAC databáze (na základě velké populační studie - minimálně 1,211 tisíc alel) se pLI (Probability of LOF Intolerance – pravděpodobnost intolerance k mutaci způsobující ztrátu funkce) pro *KDM6B* gen rovná 0,99, z čehož lze vyvodit, že dle této databáze je mutace zkracující tento protein pravděpodobně patogenní.

Na základě segregace analýzy v rodině, protein zkracující povahy mutace a nulového výskytu varianty v populaci a dle výše uvedených publikací předpokládáme, že tato **varianta může být patogenní pro rozvoj fenotypu u obou sourozenců**. Jedná se o první popsanou mutaci protein zkracujícího typu u *KDM6B* genu. Dále tato mutace u pacientů s daným fenotypem potvrzuje pravděpodobnost AD podstaty onemocnění a dále posiluje předpoklad, že *KDM6B* je silným kandidátním genem pro rozvoj ID.

NG49 <i>KDM6B</i> c.2041C>T, p.Gln681Ter / Patogenicita 3-4									
Gen	RefSeq Transkript	RefSeq Protein	Důsledek varianty	Exon	Zygozita	Související onemocnění	Dědičnost	Potvrzení Sangerem Segregace v rodině	ExAC - NFE (evropská populační frekvence)
<i>KDM6B</i> (Lysine Demethylase 6B)	NM_001080424.2: c.8481T>G	NP_001073893.1: p.Gln681Ter	stop	11	Het	Syndromická ID	AR/AD	Ano; mutace neg. u matky i otce	0%
Vyplnit u missense mutací					Publikace				
Doména proteinu	Chemická změna aminokys.	Konzerv. amino kyseliny	SIFT	PolyPhen-2	Mutation Taster	Clinvite db	ClinVar db	HGMD db	Publikované patogenní mutace
---	---	---	---	---	---	---	---	---	p.Q115* pro ASD (Yuen 2017)

Pacient 5 (NG47)

7,5letá pacientka prezentuje malý vzrůst, hluboké mentální opoždění, bez vývinu řeči (bez sluchové vady), lehký hypotonický syndrom, oboustranou paraparézu dolních končetin, asymetrický obličej, hypertelorismus, vrozenou kataraktu (a sekundární glaukom), mikrophthalmus pravého oka, mikrokorneu a dysmorfické ušní boltce. Podezření na Smith-Lemli-Opitz (SLO) syndrom nebylo molekulárně potvrzeno. V pozdějším věku bylo u pacientky vysloveno podezření na Warburg micro syndrom (WMS).

Vyšetřením NGS jsme u pacientky jsme našli 2 heterozygotní varianty v genu **RAB3GAP1** (MIM#602536), který je spojen s fenotypem: **Warburg micro syndrom 1** (MIM#600118). Varianta **NM_001172435.1:c.119delT (p.Ile40MetfsTer54)** byla ověřena Sangerovým sekvenováním. Tato varianta byla potvrzena u otce probandky. U matky probandky byla přítomnost této varianty vyloučena. Varianta nebyla dosud publikována. Varianta **NM_001172435.1:c.1380delG (p.Ala461LeufsTer6)** byla ověřena Sangerovým sekvenováním. Tato varianta byla potvrzena u matky probandky. U otce probandky byla přítomnost této varianty vyloučena. Varianta nebyla dosud publikována. Na základě protein zkracující povahy obou mutací, na základě nulové populační frekvence a AR segregace v rodině a na základě souhlasu s fenotypem předpokládáme, že obě tyto mutace jsou patogenní pro rozvoj WMS u probandky.

Micro Syndrom byl poprvé popsán v roce 1993 Warbugem et al. u konsanguinní rodiny, jako syndrom AR mikrocefalie, mikrokorney, vrozené katarakty, ID, atrofie optiku a hypogenitalismu. K dalším typickým fenotypovým znakům patří mikroptalmie, hypoplázie corpus callosum, malý vzrůst a kloubní deformity. Molekulární základy onemocnění byly popsány v roce 2005 Aligianisem et al. jako bialelické mutace v genu aktivujícím Rab3 GTP-ázu - *RAB3GAP1*. Handley et al., 2013 zjistil, že WMS a Martsolf syndrom (MS) tvoří fenotypické continuum podmíněné mutacemi v genech *RAB3GAP1* ve 41%, *RAB3GAP2* v 7% a *RAB18* v 5%, s tím, že více patogenní mutace způsobují WMS a méně závažné pak MS. WMS je extrémně vzácné onemocnění, které se většinou nachází v konsanguinních rodinách a mutace je ve většině případů homozygotní. Většina patogenních mutací je protein zkracujícího typu, pouze několik málo méně patogenních mutací typu missense bylo zachyceno. *RAB3GAP1* mutace byly publikovány Morris-Rosendahl et al. m 2010, Handley et al., 2013, Picfker-Minh et al., 2014, Imagawa et all., 2015, Rump et al., 2016 a dalšími.

U naší pacientky jde velmi vzácně o složeného heterozygota. Mutace jsou obě protein zkracujícího typu, které jasně svědčí pro WMS a též ve většině rysů odpovídají závažnému fenotypu pacientky. I u tohoto syndromu se však objevuje jistá variabilní expresivita, jelikož u pacientky nedošlo k atrofii nervu opticu, což je častým fenotypovým rysem WMS, a ani k typické dislokaci kyčlí. Rodině byla

nabídnuta preimplantační diagnostika, která by měla vyloučit narození dalšího postiženého dítěte.

1. NG47 <i>RAB3GAP1</i> c.119delT, p.Ile40MetfsTer54 pat / Patogenicita 5									
Gen	RefSeq Transcript	RefSeq Protein	Důsledek varianty	Exon	Zygozita	Související onemocnění	Dědičnost	Potvrzení Sangerem Segregace v rodině	ExAC - NFE (evropská populační frekvence)
<i>RAB3GAP1</i> (<i>RAB3 GTPase Activating Protein Catalytic Subunit 1</i>)	NM_001172.435.1: c.119delT	NP_001165906.1 : p.Ile40MetfsTer54	Frameshift	3	het	Warburg micro syndrom 1	AR	Ano; potvrzena u otce	0%
Vyplnit u missense mutací					Publikace				
Doména proteinu	Chemická změna aminokys.	Konzerv. amino kyseliny	SIFT	PolyPhen-2	Mutation Taster	Clinvatae DB	ClinVar DB	HGMD DB	Publikované patogenní mutace
---	---	---	---	---	---	---	---	---	c.131delT (Handley, 2013)

2. NG47 <i>RAB3GAP1</i> c.1380delG, p.Ala461LeufsTer6 mat / Patogenicita 5									
Gen	RefSeq Transcript	RefSeq Protein	Důsledek varianty	Exon	Zygozita	Související onemocnění	Dědičnost	Potvrzení Sangerem Segregace v rodině	ExAC - NFE (evropská populační frekvence)
<i>RAB3GAP1</i> (<i>RAB3 GTPase Activating Protein Catalytic Subunit 1</i>)	NM_001172.435.1: c.1380delG	NP_001165906.1 : p.Ala461LeufsTer6	Frameshift	15	het	Warburg micro syndrom 1	AR	Ano; potvrzena u matky	0%
Vyplnit u missense mutací					Publikace				
Doména proteinu	Chemická změna aminokys.	Konzerv. amino kyseliny	SIFT	PolyPhen-2	Mutation Taster	Clinvatae DB	ClinVar DB	HGMD DB	Publikované patogenní mutace
---	---	---	---	---	---	---	---	---	c.1353delA (Imagawa, 2015)

Pacient 6 (NG11)

6letý pacient s těžkou ID (psychologicky odpovídá 4 měsícům, komunikuje necílenými zvuky) a opožděným motorickým vývojem (sedí od 6 let, stojí jen s oporou), s drobným corposem calosum, vrozenou vývojovou vadou ledvin (ageneze levé ledviny, hypoplázie pravé ledviny), retencí varlete a hypospádií, mikrocefalií a faciálním dysmorfismem (mikromandibula, níže posazené uši, vyšší patro, úzké oční štěrby, epikanty, krátký zásuvkovitý nos, dlouhé filtrum, abnormální tvar rtů – horní ret vytažen do písmene M).

U pacienta jsme našli missense variantu **NM_000489.4:c.797A>G (p.Tyr266Cys)** v exonu 9 genu **ATRX** (MIM#300032), který je spojen s fenotypem: **ATRX syndrome - ID s alfa thalasií (XLD)** (MIM#301040) **nebo ID s hypotonickým obličejem (XLR)** (MIM#309580). XLR spektrum onemocnění spojených s mutací v genu *ATRX* zahrnuje též XLMR syndromy - Carpenter-Waziri syndrom, Holmes-Gang syndrom, Chudley-Lowry syndrom, XLMR se spastickou paraplegií, XLMR s epilepsií, a nesyndromickou XLMR (EGL Genetics, www.egleurofins.com/?approved symbol=ATRX) – všechny MIM#309580.

Přítomnost varianty byla ověřena Sangerovým sekvenováním, matka je přenašečka této varianty. Vzhledem k přítomnosti varianty u zdravé matky předpokládáme XLR dědičnost odpovídající dle současných znalostí onemocnění ID s hypotonickým obličejem. Tato varianta byla publikována Gibbons a Higgs v roce 2000 jako patogenní, nicméně byla publikována pouze jednou a jedná se o missense mutaci, proto její interpretace musí být provedena s opatrností. Predikční sestřihové softwary MaxEnt, NNPSPLICE ani HSF nepředpokládají změnu sestřihového místa způsobenou nalezenou mutací. Se současným stavem znalostí hodnotíme patogenicitu variant jako 3-4 (VUS, možná patogenní). K patogenitě se přiklání všechny predikční softwary, vysoká konzervovanost aminokyseliny i nukleotidu, výrazná chemická změna aminokyseliny, pozice varianty ve funkční doméně protein (Zn finger, PHD doména) a nulová populační frekvence. Zinc finger doména funguje jako transkripční faktor a mutantní ATRX protein downreguluje expresi alfa-globinu a zároveň potlačuje expresi mnoha genů narušením transkripce a chromatinového remodelingu, což vede následně k ID a vrozeným malformacím. Výrazná většina zjištěných patogenních variant v tomto genu je typu missense, což též podporuje patogenicitu námi nalezené mutace. Též veškeré publikované mutace v exonu 9 (zdroj Clinviteae - <http://clinvitae.invitae.com>) jsou vyhodnoceny jako patogenní či pravděpodobně patogenní (ACMG třída patogenicity 4 a 5). Je zatím popsáno celkem pouze 200 případů. Mutace v genu *ATRX* se mohou objevovat též jako získané (somatické) u myelodysplastického syndromu.

V případě našeho probanda bude důležité fenotypové srovnání, proband i jeho matka byly doporučeni k hematologickému vyšetření. Pro tento typ onemocnění

jsou typické inkluze hemoglobinu H patrné obrazem “golfového míčku” na erythrocytech. Molekulární syndromologie a přehodnocení pathogenicity mutace bude dále pokračovat po získání výsledků hematologického vyšetření.

NG11 <i>ATRX</i> c.797A>G, p.Tyr266Cys / Patogeničita 3-4									
Gen	RefSeq Transcript	RefSeq Protein	Důsledk varianty	Exon	Zygozita	Související onemocnění	Dědičnost	Potvrzení Sangerem Segregace v rodině	ExAC - NFE (evropská populační frekvence)
<i>ATRX</i> (Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked)	NM_000489.4 : c.797A>G	NP_000480.3 : p.Tyr266Cys	Missense	9	Hemizygot	MR (možná alfa thalasémie)	XL	Ano; matka přenašečka, mutace negativní u otce	0 %
Vyplnit u missense mutací						Publikace			
Doména proteinu	Chemická změna aminokys.	Konzerv. amino kyseliny	SIFT	PolyPhen-2	Mutation Taster	Clinvita DB	ClinVar DB	HGMD DB	Publikované patogenní mutace
Zinc finger motif, PHD doména	Výrazná	Silná	Škodlivá (score: 0)	Pravděpodobně poškozující (score: 1.0)	Způsobující onemocnění (p-value: 1)	---	Není	Patogenní pro ATRX syndrom	Tato (Gibbons, 2000)

Pacient 7 (CDL7)

4,5měsíční holčička s malým vzrůstem a stigmatizací – mikrocefalie, dysproporcionální zkrácení končetin obzvláště horních, nízká vlasová hranice vpředu i vzadu, výrazný hirzutismus s maximem na zádech, hrudníku a stehnech, zúžené čelo, výrazné klenuté obočí se synophrys, dlouhé filtrum, tenké rty, vysoké patro, krátký krk. V tomto věku připomíná Cornelia de Lange (CDL) syndrom.

CES vyšetřením byla nalezena jasná sestřihová mutace **NM_133433.3:c.5225+2T>A (p.?)** v genu **NIPBL** (MIM#608667), který je nejčastějším genem mutovaným u **CDL syndromu** (MIM#122470), čímž byl potvrzen předpoklad klinických genetiků a diagnóza byla potvrzena na molekulární úrovni. Přítomnost mutace byla ověřena Sangerovým sekvenováním a byla vyloučena v lymfocytech obou rodičů. Mutace nebyla dosud publikována. Vzhledem k tomu, že však narušuje povinný motiv (GU) kanonického donorového sestřihového místa, má naprosto jistě za následek aberantní sestřih NIPBL proteinu. Predikční sestřihové softwry SpliceSiteFinder, MaxEntScan, NNSPLICE, GeneSplicer a Human Splicing Finder predikují ztrátu sestřihového místa.

Gen *NIPBL* kóduje dimer proteinu MEU2, který je nutný ke spojení kohezinu k chromadidám v anafázi meiózy a mitózy. Byly prokázány dvě základní funkce tohoto proteinu, jednak při segregaci chromozómů v mitóze/meióze a jednak při skládání chromozómů v jádře a tak organizaci 3D struktury genomu, která má zásadní vliv na vzájemnou polohu enhancerů a jejich cílových genů (Schwarzer et al., 2017).

CDL7 <i>NIPBL</i> c.5225+2T>A / Patogenicita 4									
Gen	RefSeq Transcript	RefSeq Protein	Důsledek varianty	Exon	Zygozita	Související onemocnění	Dědičnost	Potvrzení Sangerem Segregace v rodině	ExAC - NFE (evropská populační frekvence)
<i>NIPBL</i> (Nipped-B-Like)	NM_133433.3: c.5225+2T>A		Splice site	26	Het	Cornelia de Lange sy	AD	Ano; rodiče bez mutace	0 %
Vyplnit u missense mutací						Publikace			
Doména proteinu	Chemická změna aminokys.	Konzerv. amino kyseliny	SIFT	PolyPhen-2	Mutation Taster	ClinVar DB	ClinVar DB	HGMD DB	Publikované patogenní mutace
Armadillo-type fold		---	---	---	---	---	---	---	c.5225+3A>C (Oliveira, 2010)

Pacient 8 (NG67)

4,5letá dívka s atypickým autismem, psychomotorickým onemocněním, hypotonií, nestabilní chůzí, váhou a výškou na 10. percentilu, strabismem a s obličejem bez nápadnější stigmatizace. U pacientky existovalo podezření na Rett nebo Rett-like syndrom, cílená molekulární vyšetření však diagnózu nepotvrdila. Z důvodu gravidity matky bylo provedeno NGS vyšetření v rozsahu klinického exomu.

Byla nalezena heterozygotní protein zkracující mutace **c.2533C>T (p.Gln845*)** v exonu 12 genu ***GRIN2B* (Ref.Seq. GenBank NM_000834.3)** (MIM#138252). Tato mutace nebyla dosud publikována.

2 podjednotky proteinu GluN2B (kódovaný genem *GRIN2B*) spolu s 2 podjednotkami proteinu GRIN1 (kódovaný genem *GRIN1*, viz pacient KS17 z Cíle 2 této práce) tvoří heterotetramerický N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. NMDA receptor je glutamátem aktivovaný iontový kanál permeabilní pro Na⁺, K⁺ a Ca²⁺ a nachází se v excitačních synapsích v rámci mozku.

Tento gen je spojován s diagnózou autozomálně dědičné nesyndromické ID pojmenované **MR AD 6** (MIM#613970). Varianta byla potvrzena Sangerovým

sekvenováním a rodiče variantu nenesou. Jedná se tedy o vznik mutace *de novo*. Dle literatury jsou v genu *GRIN2B* pozorovány nejčastěji missense mutace, které způsobují “gain of function” (získání funkce) fenotyp, některé výrazně zvyšují permeabilitu pro Mg²⁺, jiné značně redukuje průchodnost Ca²⁺ (Fedele et al., 2018). Funkční vliv protein zkracujících mutací nebyl dosud studován, nicméně lze předpokládat jejich značný vliv na kvalitu synapse, pokud i dopad missense mutací je takto výrazný. Všechny protein zkracující mutace v tomto genu uvedené v databázi ClinVitaie jsou označeny jako patogenní, s nejbližší mutací zkracující protein později o 2 aminokyselinové zbytky u pacienta s ID a autismem. Soto et al., 2018 publikovali případ 4leté pacientky s Rett-like syndromem a závažnou encefalopatií, u které byla nalezena missense mutace v tomto genu. Fenotyp naší probandky potvrzuje shodu s Rett-like fenotypem u publikovaných pacientů, encefalopatie se pak objevuje dle literatury a databáze OMIM pouze u některých pacientů. Může jít o korelaci fenotypu s genotypem, kde missense mutace způsobují encefalopatii na rozdíl od protein zkracujících mutací. Z literatury však zatím není dostupných dost klinických dat, která by tuto teorii mohla potvrdit či vyvrátit.

NG67 <i>GRIN2B</i> c.2533C>T, p.Gln845* / Patogenicita 4									
Gen	RefSeq Transkript	RefSeq Protein	Důsledek varianty	Exon	Zygozita	Související onemocnění	Dědičnost	Potvrzení Sangerem Segregace v rodině	EXAC - NFE (evropská populační frekvence)
<i>GRIN2B</i> (glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B)	NM_000834.3: c.2533C>T	NP_000825.2: p.Gln845*	stop	12	Het	MR AD 6	AD	Ano; mutace neg. u matky i otce	0%
Vyplnit u missense mutací						Publikace			
Doména proteinu	Chemická změna aminokys.	Konzerv. amino kyseliny	SIFT	PolyPhen-2	Mutation Taster	Clinvitaie db	ClinVar db	HGMD db	Publikované patogenní mutace
	---	---	---	---	---	---	---	---	p.Arg847* pro ID (Kruperberg 2016)

Pacient 9 (NG109)

7letý chlapec s těžkou ID, těžkou vývojovou retardací (absence řeči, není schopen stoje a chůze) a těžkou růstovou retardací, dále s axiální hypotonií, kongenitální arthrogryposis multiplex (s maximem na dolních končetinách), mikrocefalií,

výraznou faciální stigmatizací, výraznou suturou metopicu, strabismem, hypomimií a hypogonadismem. Byl zvažován defekt glykosilace a Allan-Herndon-Dudley syndrom, které však nebyly potvrzeny a po negativní aCGH bylo indikováno CES.

U pacienta byla nalezena heterozygotní protein zkracující varianta v genu *MAGEL2*, který je spojen s fenotypem: **Schaaf-Yang syndrom / Prader-Willi like syndrom** (MIM#615547). Varianta **NM_019066.4:c.1990_1991insT (p.Pro664Leufs*49) v genu *MAGEL2*** (15q11.2) (MIM#605283) byla ověřena Sangerovým sekvenováním a vyloučena u rodičů probanda, vznikla tedy *de novo*. Gen *MAGEL2* leží v maternálně imprintované oblasti a je exprimován z paternální alely. Mutace je patologického charakteru, pokud se nachází na paternální alele. Tuto informaci nebylo zatím možné získat, nicméně vzhledem k podobnosti fenotypu pacienta a fenotypu publikovaného pro mutace v genu *MAGEL2* lze předpokládat, že tato mutace je pravděpodobně patogenní a kauzální pro rozvoj fenotypu pacienta. Tato mutace má nulovou frekvenci výskytu celosvětově i v evropské populaci a nebyla dosud popsána. Mutace doposud nalezené u tohoto syndromu jsou dobře shrnuty v publikaci Fountain et al., 2017.

NG109 <i>MAGEL2</i> c.1990_1991insT, p.Pro664Leufs*49 / Class 5 jestliže paternální									
Gen	RefSeq Transcript	RefSeq Protein	Důsledek varianty	Exon	Zygozita	Související onemocnění	Dědičnost	Potvrzení Sangerem Segregace v rodině	ExAC - NFE (evropská populační frekvence)
<i>MAGEL2</i> (Mage-Like 2)	NM_019066.4:c.1990_1991insT	NP_061939.3:p.Pro664Leufs*49	frameshift	1	Het	Schaaf-Yang syndrom Prader-Willi like sy	AD	Ano	0 %
Vyplnit u missense mutací						Publikace			
Doména proteinu	Chemická změna aminokys.	Konzerv. amino kyseliny	SIFT	PolyPhen-2	Mutation Taster	Clinvite db	ClinVar db	HGMD db	Publikované patogenní mutace
---	---	---	---	---	---		---	---	c.1996dupC pro PWS-like (Soden 2014)

Pacient 10 (NG103)

11letý pacient s poruchou sluchu a řeči, atrézií zvukovodů, rozštěpem patra, lehkou ID, pyelonefritis, lehkou chlopenní vadou, níže nasedajícím palcem na ruku a faciální stigmatizací odpovídající spektru Treacher-Collins. Pacient

prezentuje obvod hlavy pod 3. percentil, mikrocií, hypertelorismus, antimongoloidní slant očních štěrbin, úzký obličej s dravčím profilem, velká ústa v pootevřeném postavení, nenápadnou bradu.

U pacienta byla nalezena heterozygotní stop mutace **NM_004247.3:c.1842T>G (p.Tyr614*)** v genu **EFTUD2** (MIM#603892), který je spojen s fenotypem: **mandibulofaciální dysostóza (MFD) s mikrocefalií** (Orphanet), dle jiných zdrojů (OMIM) mandibulofaciální dysostóza Guion Almeida typu (dědičnost AD) (MIM#610536). Mandibulofaciální dysostóza s mikrocefalií je vzácný syndrom, na kterém se podílí progresivní mikrocefalie, micrognacie, microcie, malformace uší, vývojové opoždění a opoždění řeči. Mnoho pacientů má atrézii choan, která má za následek dýchací obtíže, převodní ztrátu sluchu a rozštěp patra.

Fenotyp pacienta tedy odpovídá fenotypu pozorovanému u pacientů s mutacemi v tomto genu.

Námi nalezená mutace nebyla dosud publikována. Na základě protein zkracující povahy mutace a korelace s fenotypem klasifikujeme tuto variantu jako **třídu 4 – pravděpodobně patogenní**. Na základě tohoto NGS výsledku bylo u pacienta indikováno ORL vyšetření pro zjištění atrézie choan.

Fenotypové znaky našich dvou pacientů s protein zkracující mutací v genu **EFTUD2** (KS11 viz Cíl 2 a NG103) jsou uvedeny v Tabulce 9. Diskuze ohledně genu **EFTUD2** a onemocnění MFD s mikrocefalií je rozvinuta v Cíli 2 této práce u pacienta KS11.

NG103 EFTUD2 c.1842T>G, p.Tyr614* / Patogenicita 4									
Gen	RefSeq Transcript	RefSeq Protein	Důsledek varianty	Exon	Zygozita	Související onemocnění	Dědičnost	Potvrzení Sangerem Segregace v rodině	ExAC - NFE (evropská populační frekvence)
EFTUD2 (elongation factor Tu GTP binding domain containing 2)	NM_004247.3:c.1842T>G	NP_004238.3 : p.Tyr614*	Nonsense	18	het	Mandibulofaciální dysostóza	AD	Ano	0%
Doména proteinu	Chemická změna aminokys.	Konzerv. amino kyseliny	SIFT	PolyPhen-2	Mutation Taster	Clinvite	ClinVar DB	HGMD DB	Publikované patogenní mutace
---	---	---	---	---	---	---	---	---	p.Q719* (Lines 2012)

Pacient 11 (NG171)

8letý pacient s lehkou až střední ID, PAS, menším vzrůstem (25. percentil), asthenik, s deformitou hrudníku vpravo, vadným držením těla, delšími prsty na dolních i horních končetinách a s lehkou faciální stigmatizací – vyšší klenuté čelo, trojúhelníkový obličej, velké odstávající dysplastické uši, kratší hlouboké filtrum.

CES prokázala u pacienta 2 heterozygotní mutace typu missense **c.10460C>T, (p.Ser3487Leu) pat** a **c.10424C>T, (p.Ser3475Phe) mat** v genu **HERC2** (MIM#605837), který je spojen s rozvojem autozomálně dědičné ID označované **MR AR 38** (MIM#615516), které podle některých zdrojů spadá do AS-like (Angelman syndrome-like) syndromů. Jedna mutace je zděděna od matky a druhá od otce. HERC2 je ubiquitin protein ligáza ze stejné genové rodiny jako *HUWE1* (viz. pacient KS10 z Cíle 2 této práce), s funkční HECT doménou na 3' konci genu, která katalyzuje kovalentní připojení ubiquitinu k substrátu. Mutace v genu HERC2 jsou spojovány s ID, autismem a poruchami chůze. Mutace byly doposud pozorovány pouze v homozygotní kompozici a to většinou v populaci severoamerických Amishů a Mennonitů. V databázi HGMD jsou uvedeny pouze 3 mutace, 2 typu missense, kde jedna způsobuje celkové vývojové opoždění a autismus (Puffenger et al., 2012) a druhá neurologické onemocnění (Charng et al., 2016), 3. mutace je protein zkracující a způsobuje závažnější fenotyp – abnormality mozku, transpozici hlavních artérií, ventrikulární septální defect, renální anomálie a ztrátu sluchu (Yavarna et al., 2015).

Obě mutace nalezené u našeho pacienta mají velmi nízkou populační frekvenci (odpovídala by frekvenci patogenní alely u AR onemocnění), objevují se ve funkční doméně (RCC1 doména) proteinu, postihují vysoce konzervovaný nukleotid i aminokyselinu, u obou dochází k výrazné fyzikálně-chemické změně aminokyseliny a obě mutace jsou hodnoceny jako patogenní většinou predikčních softwarů. Dále patogenicitě mutace nasvědčuje i biparentální dědičnost a shoda s fenotypem u publikované missense mutace. Na druhou stranu jde stále o missense mutace, kde je patogenicita nejistá bez funkčních studií a u tohoto genu je prozatím málo dostupných informací. Též fenotyp je velmi stručný a obecný. Predikční sestřihové softwary MaxEnt, NNPSPLICE ani HSF nepředpokládají změnu sestřihového místa způsobenou nalezenou mutací a to ani pro jednu z

obou mutací. Dle současného stavu znalostí hodnotíme tedy obě varianty jako varianty nejasného významu a jejich vztah k onemocnění pacienta nelze s jistotou potvrdit.

1. NG171 <i>HERC2</i> c.10460C>T, p.Ser3487Leu pat / Patogenicita 3									
Gen	RefSeq Transcript	RefSeq Protein	Důsledek varianty	Exon	Zygozita	Související onemocnění	Dědičnost	Potvrzení Sangerem Segregace v rodině	ExAC - NFE (evropská populační frekvence)
<i>HERC2</i> (hect domain and RCC1-like domain-containing protein 2)	NM_004667.5: c.10460C>T	NP_004658.3: p.Ser3487Leu	Missense	68	het	MR AR 38	AR	Ano; potvrzena u otce	0.1%
Vyplnit u missense mutací					Publikace				
Doména proteinu	Chemická změna aminokys.	Konzerv. amino kyseliny	SIFT	PolyPhen-2	Mutation Taster	Clinvatae DB	ClinVar DB	HGMD DB	Publikované patogenní mutace
RCC1	velká	Vysoká	Poškovující (skóre 0)	Pravděpodobně poškovující (skóre 0.994)	Způsobující onemocnění (p=1)	---	---	---	p.P594L pro celkové vývojové opožďení (Puffenberger 2012)

2. NG171 <i>HERC2</i> c.10424C>T, p.Ser3475Phe mat / Patogenicita 3									
Gen	RefSeq Transcript	RefSeq Protein	Důsledek varianty	Exon	Zygozita	Související onemocnění	Dědičnost	Potvrzení Sangerem Segregace v rodině	MAF
<i>HERC2</i> (hect domain and RCC1-like domain-containing protein 2)	NM_004667.5: c.10424C>T	NP_004658.3: p.Ser3475Phe	Missense	68	het	MR AR 38	AR	Ano; potvrzena u matky	0.04%
Vyplnit u missense mutací					Publikace				
Doména proteinu	Chemická změna aminokys.	Konzerv. amino kyseliny	SIFT	PolyPhen-2	Mutation Taster	Clinvatae DB	ClinVar DB	HGMD DB	Publikované patogenní mutace
RCC1	velká	Vysoká	Poškovující (skóre 0.01)	Benigní (skóre 0.001)	Způsobující onemocnění (p=1)	---	---	---	p.D4267E pro neurologické onemocnění (Chang 2016)

TABULKY A OBRÁZKY

Tabulka 1: Kvalitativní výsledky panelového NGS sekvenování, v rámci kterého byla nalezena mutace v genu KMT2D u dvou pacientů

	% bazí kvality Q>=30	Průměrné pokrytí cílových oblastí	Uniformita pokrytí v cílových oblastech	% bazí s pokrytím >=20 v cílových oblastech	% bazí v duplikovaných čteních	Medián délky fragmentů
KS042A	93.895	107.196	76.171	77.107	3.41	494
KS045A	93.493	101.394	76.44	77.291	6.813	511
NG00X	92.955	30.876	76.186	76.998	3.878	490
NGXXA	93.662	105.646	76.344	77.404	4.139	512
NGXXXA	93.793	110.588	76.1	77.078	3.755	491
NGXXXXA	93.364	103.86	76.733	77.744	3.145	539
NG0XXXXA	93.798	97.37	76.337	77.21	5.87	508
NG0140A	93.637	103.831	76.364	77.218	3.887	508
NG0225A	93.688	101.037	76.269	77.193	3.971	505
NG0225D	94.7	96.907	74.609	75.522	5.461	382
NG0225E	92.693	96.841	76.251	77.133	4.475	506
NG0230A	94.156	108.817	75.622	76.406	4.803	447
NG0232A	93.733	103.005	76.046	76.958	4.182	493
NG0236A	93.514	102.002	76.377	77.275	3.258	504
NG0238A	93.533	101.568	76.388	77.31	3.224	510
NG0239A	93.724	104.769	76.45	77.341	3.341	511
NG0264A	93.597	103.339	76.385	77.326	5.597	517
NG0265A	93.756	104.593	76.214	77.182	3.33	501
NG0265B	93.567	108.316	76.393	77.342	3.381	508
NG0265C	93.723	107.451	76.371	77.27	3.606	503

Tabulka 2: Seznam patogenních mutací v genu *KMT2D* u českých KS pacientů

Vzorek/P ohlaví	Mutace cDNA úroveň Ref Seq NM_003482.3	Mutace Proteinová úroveň	Exon	Typ mutace	Rodiče testováni Otec/Matka	Dědičnost	Publikováno
KS1/M	c.16371_16374delTGAA	p.Glu5458Metfs*2	52	FS	ne	Předpoklad <i>de-novo</i>	Makrythanasís
KS3/M	c.8743C>T	p.Arg2915*	34	NS	ne	Předpoklad <i>de-novo</i>	Makrythanasís, Li
KS4/M	c.2488G>T	p.Glu830*	10	NS	O-/M-	<i>de-novo</i>	NOVEL (Paděrová)
KS5/M	c.4549_4549delG	p.Glu1517Argfs*4	16	FS	O-/M-	<i>de-novo</i>	NOVEL (Paděrová)
KS12/Z	c.6349_6350delinsA	p.Pro2117Thrfs*27	31	FS	O-/M-	<i>de-novo</i>	NOVEL (Paděrová)
KS13/M	c.5625_5628delAGAC	p.Asp1876Glyfs*38	25	FS	M-	Předpoklad <i>de-novo</i>	Makrythanasís, Banka
KS16/Z	c.16164 C>G	p.Tyr5388Ter	51	NS	ne	Předpoklad <i>de-novo</i>	NOVEL
KS20/M	c.15545delG	p.Gly5182Alafs*61	48	FS	O-/M-	<i>de-novo</i>	NOVEL
KS21/Z	c.16360delC	p.Arg5454Glufs*2	52	FS	O-/M-	<i>de-novo</i>	NOVEL
KS24/M	c.6594delC	p.Tyr2199Ilefs*65	31	FS	O-/M-	<i>de-novo</i>	Hannibal
KS33/Z	c.1090C>T	p.Gln364*	8	NS	ne	Předpoklad <i>de-novo</i>	NOVEL
KS36/M	c.13606C>T	p.Arg4536*	40	NS	ne	Předpoklad <i>de-novo</i>	Paulussen
KS39/Z	c.176+1delG	p.?	Int 2	SS	ne	Předpoklad <i>de-novo</i>	NOVEL

KS40/M	c.1967delT	p.Leu656Argfs*274	10	FS	O-/M-	<i>de-novo</i>	NOVEL
KS42/Z	c.15163_15168dupGACCTG	p.Asp5055_Leu5056dup	48	IFdup	ne	Předpoklad <i>de-novo</i>	Micale
KS43/Z	c.12406C>T	p.Gln4136*	39	NS	ne	Předpoklad <i>de-novo</i>	NOVEL
KS44/M	c.12304C>T	p.Glu4102*	39	NS	ne	Předpoklad <i>de-novo</i>	NOVEL
KS45/M	c.15226delG	p.Ala5076Hisfs*2	48	FS	ne	Předpoklad <i>de-novo</i>	NOVEL

M: pohlaví mužské, **Z:** pohlaví ženské, **FS:** frameshift mutace, **NS:** nonsense mutation, **IFdup:** in frame duplikace, **M-:** matka negativní na *KMT2D* mutaci, **O-:** otec negativní na *KMT2D* mutaci, **Makrythanasis** a kol 2013, **Li** a kol 2011, **Banka** a kol 2012. **Paděrová** a kol. 2016, **Hannibal** a kol. 2011, **Paulussen** a kol. 2010, **Micale** 2011.

Tabulka 3 Klinické znaky pozorované u českých KMT2D+ KS pacientů

Klinický znak / Pacient	KS1	KS3	KS4	KS5	KS12	KS13	KS16	KS20	KS21	KS24	KS33	KS36	KS40	KS42	KS43	KS44	KS45	Frekv. u KMT2D[+]	%
Věk v době diagnózy	7	7	4	2	1	4	6	15	4	10	10	20	3	7	1	1	24		
Všeobecné znaky / Pohlaví	M	M	M	M	Z	M	Z	M	Z	M	Z	M	M	Z	Z	M	M		
Postnatální růstová retardace	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	15/17	94
Mikrocefalie	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	13/17	81
Poruchy příjmu potravy		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	12/17	71
Faciální znaky																			
Klenuté obočí	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	15/17	88
Evertovaná dolní víčka	✓	✓	✓	✓		✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓		12/17	75
Dlouhé oční štěrby	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	17/17	100
Ptóza	✓	✓		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						11/17	69
Strabismus	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓			✓				9/17	56
Modré skléry				✓		✓				✓					✓			6/17	38
Kolobom			✓											✓				2/17	13
Velké dysplastické uši	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	16/17	94
Široký kořen nosu	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	17/17	100
Zploštělá špička nosu	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				13/17	81
Ploché filtrum		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓				11/17	69
Abnormální dentice	✓		✓				✓				✓	✓		✓				6/17	38
Oligodontie	✓										✓	✓	✓	✓			✓	6/17	35
Vysoké patro nebo rozštěp patra	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓	✓	✓		✓	✓		✓	13/17	76
Malá mandibula			✓	✓		✓	✓	✓		✓			✓	✓	✓	✓		10/17	63
Tenký horní ret a plný horní ret	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓		✓	✓	✓			✓	12/17	71
Anomálie končetin a skeletu																			
Brachy- nebo klinodaktýlie	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓		✓	✓	14/17	82
Hypoplastické prsty	✓	✓		✓	✓	✓					✓			✓				7/17	44
Hypoplastické nehty		✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓				✓				8/17	50
Perzistentní polštářky na prstech	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓		✓	✓	13/17	81
Dysplázie kyčelních kloubů				✓	✓									✓		✓		4/17	25
Kloubní laxicita	✓	✓		✓	✓			✓	✓	✓			✓	✓				9/17	56
Abnormality dermatoglyfů					✓					✓				✓			✓	4/17	24
Neurologické znaky																			
Intelektová nedostatečnost	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	17/17	100
Opožděný motorický vývoj	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	15/17	88
Hypotonie	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				✓	✓	✓	✓	14/17	82
Záchvaty / abnormální EEG	✓														✓			2/17	13
Viscerální anomálie																			
Vrozená srdeční vada	✓	✓	✓	✓	✓	✓				✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	13/17	76
Vrozená vada ledvin			✓	✓	✓	✓		✓			✓	✓				✓	✓	8/17	47
Další znaky:																			
Imunitní dysfunkce	✓	✓	✓	✓								✓						5/17	31
Ztráta sluchu / chron. otitis media	✓					✓				✓					✓			5/17	31
Abnormality testes	✓			✓	N/A	✓	N/A	✓	N/A	✓	N/A			N/A	N/A		✓	6/10	60
Předčasné telarché u děvčat	N/A	N/A	N/A	N/A		N/A		N/A		N/A	✓	N/A	N/A			N/A	N/A	1/6	17
Katarakta	✓																	2/17	12
Autismus	✓	✓				✓												3/17	20
MLL2-Kabuki score	7	8	9	8	8	8	8	7	6	7	6	7	7	9	6	8	6	7.44	

Frekv. in KMT2D[+]: frekvence fenotypového znaku u KMT2D-mutatačně-positivních pacientů; Frekv. in KMT2D[-]: frekvence fenotypového znaku u KMT2D-mutatačně-negativních pacientů;

M: male/muž; F: female/žena; N/A: neaplikovatelné

Tabulka 4 / I Klinické znaky pozorované u českých KMT2D- KS pacientů

Klinický znak / Pacient	KS2	KS6	KS7	KS8	KS9	KS10	KS11	KS14	KS15	KS17	KS18	KS19	KS22	KS23	KS25	KS26	KS27	KS28	KS29	KS30
Věk v době diagnózy	8	15	7	2	3	4	7	16	5	9	12	3	15	10	10	7	11	15	7	4
Všeobecné znaky / Pohlaví	M	M	Z	Z	Z	M	M	M	Z	M	M	M	Z	M	Z	Z	Z	Z	Z	Z
Postnatální růstová retardace	✓			✓		✓	✓			✓	✓		✓	✓		✓		✓	✓	
Mikrocefalie	✓					✓	✓			✓	✓		✓						✓	
Poruchy příjmu potravy	✓			✓		✓		✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓		✓		
Faciální znaky																				
Klenuté obočí	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓	✓	✓	✓		✓	
Evertovaná dolní víčka	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Dlouhé oční štěrby		✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ptóza			✓		✓			✓			✓	✓	✓				✓			
Strabismus			✓					✓		✓							✓	✓		
Modré skléry		✓		✓					✓	✓									✓	✓
Kolobom																	✓		✓	
Velké dysplastické uši	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Široký kořen nosu	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Zploštělá špička nosu		✓		✓				✓		✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ploché filtrum	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓				✓	✓	✓			
Abnormální dentice		✓					✓	✓		✓	✓				✓	✓	✓			
Oligodontie										✓							✓			
Vysoké patro nebo rozštěp patra		✓	✓		✓			✓		✓	✓									✓
Malá mandibula				✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓					✓		✓	
Tenký horní ret a plný horní ret		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				✓	✓	✓	✓	✓
Anomálie končetin a skeletu																				
Brachy- nebo klinodaktýlie			✓	✓	✓		✓			✓			✓	✓	✓		✓		✓	
Hypoplastické prsty										✓				✓						
Hypoplastické nehty											✓						✓			
Perzistentní polštářky na prstech	✓	✓	✓			✓	✓			✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓
Dysplázie kyčelních kloubů																				
Kloubní laxicita		✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓				✓	✓		✓
Abnormality dermatoglyfů		✓					✓	✓		✓				✓			✓		✓	
Neurologické znaky																				
Intelektová nedostatečnost	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Opožděný motorický vývoj	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Hypotonie		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Záchvaty / abnormální EEG							✓	✓	✓	✓			✓				✓			
Viscerální anomálie																				
Vrozená srdeční vada	✓	✓				✓					✓				✓	✓			✓	✓
Vrozená vada ledvin						✓							✓							
Další znaky:																				
Imunitní dysfunkce		✓		✓								✓								
Ztráta sluchu / chron. otitis media										✓	✓			✓			✓		✓	
Abnormality testes		✓	N/A	N/A	N/A				N/A		✓	✓	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Předčasná telarché u děvčat	N/A	N/A				N/A	N/A	N/A		N/A	N/A	N/A	✓	N/A			✓			
Katarakta															✓		✓			
Autismus		✓	✓							✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓		
MLL2-Kabuki skóre	5	5	4	4	4	7	6	4	2	6	6	4	5	6	4	4	6	5	7	3

Frekv. in KMT2D[+]: frekvence fenotypového znaku u KMT2D-mutatačně-positivních pacientů; Frekv. in KMT2D[-]: frekvence fenotypového znaku u KMT2D-mutatačně-negativních pacientů; M: male/muž; F: female/žena; N/A: neaplikovatelné

Tabulka 4 / II Klinické znaky pozorované u českých KMT2D- KS pacientů

Klinický znak / Pacient	KS31	KS32	KS34	KS37	KS38	KS41	Frekv. u KMT2D[-]	%
Věk v době diagnózy	10	4	3	4	8	7		
Všeobecné znaky / Pohlaví	M	Z	M	M	Z	Z		
Postnatální růstová retardace	✓	✓	✓	✓	✓	✓	16/26	62
Mikrocefalie	✓	✓	✓	✓	✓	✓	16/26	62
Poruchy příjmu potravy				✓	✓		13/26	60
Faciální znaky								
Klenuté obočí				✓	✓		16/26	62
Evertovaná dolní víčka		✓	✓				13/26	50
Dlouhé oční štěrby	✓	✓	✓	✓	✓		22/26	85
Ptóza	✓				✓		9/26	35
Strabismus	✓				✓		7/26	27
Modré skléry		✓	✓				8/26	31
Kolobom			✓				3/26	12
Velké dysplastické uši		✓	✓	✓	✓		22/26	85
Široký kořen nosu		✓	✓	✓	✓	✓	21/26	81
Zploštělá špička nosu	✓	✓	✓				15/26	58
Ploché filtrum			✓	✓			15/26	58
Abnormální dentice						✓	7/26	27
Oligodontie							2/26	8
Vysoké patro nebo rozštěp patra	✓	✓	✓			✓	11/26	42
Malá mandibula	✓	✓		✓		✓	12/26	46
Tenký horní ret a plný horní ret			✓	✓	✓		18/26	69
Anomálie končetin a skeletu								
Brachy- nebo klinodaktýlie	✓	✓	✓	✓			14/26	54
Hypoplastické prsty				✓			3/26	12
Hypoplastické nehty							2/26	8
Perzistentní polštářky na prstech	✓		✓				15/26	58
Dysplázie kyčelních kloubů							0/26	0
Kloubní laxicita				✓			13/26	50
Abnormality dermatoglyfů	✓						8/26	31
Neurologické znaky								
Intelektová nedostatečnost	✓					✓	21/26	81
Opožděný motorický vývoj	✓	✓	✓	✓		✓	21/26	81
Hypotonie	✓		✓				19/26	73
Záchvaty / abnormální EEG	✓						7/26	27
Viscerální anomálie								
Vrozená srdeční vada	✓		✓	✓			11/26	42
Vrozená vada ledvin	✓						3/26	12
Další znaky:								
Imunitní dysfunkce							3/26	12
Ztráta sluchu / chron. otitis media	✓						6/26	23
Abnormality testes		N/A			N/A	N/A	4/12	33
Předčasné telarché u děvčat	N/A		N/A	N/A			2/14	14
Katarakta							2/26	8
Autismus							9/26	35
MLL2-Kabuki score	7	5	7	5	5	3	5	

Frekv. in KMT2D[+]: frekvence fenotypového znaku u KMT2D-mutatačně-positivních pacientů; Frekv. in KMT2D[-]: frekvence fenotypového znaku u KMT2D-mutatačně-negativních pacientů; M: male/muž; F: female/žena; N/A: neaplikovatelné

Tabulka 5: Statistická významnost znaku u pacientů s KMT2D mutací

	KMT2Dmut
Hypoplastické nehty	0.0033767
Hypoplastické prsty	0.026326822
Vrozená vada ledvin	0.029420252
Ptóza	0.034532297
Postnatální růstová retardace	0.034909603
Strabismus	0.039718302
Vysoké patro nebo rozštěp patra	0.045510556
Oligodoncie	0.057770716
Vrozená srdeční vada	0.065545785
Brachy- nebo klinodaktýlie	0.08020047
Klenuté obočí	0.085834989
Evertovaná dolní víčka	0.106909712
Zploštělá špička nosu	0.117223611
Mikrocefalie	0.146937878
Imunitní dysfunkce	0.244283947
Záchvaty / abnormální EEG	0.252665472
Autismus	0.267812413
Poruchy příjmu potravy	0.283321422
Malá mandibula	0.318848228
Abnormality dermatoglyfu	0.351319374
Velké dysplastické uši	0.394322589
Perzistentní polštářky na prstech	0.395691834
Abnormální dentice	0.531626193
Hypotonie	0.556684834
Modré skléry	0.62108476
Ploché filtrum	0.685596102
Opožděný motorický vývoj	0.721450264
Kloubní laxicita	0.724678701
Tenký horní ret	0.831439399
Kolobom	0.847944503
Ztráta sluchu / chron. otitis media	0.958682145
Katarakta	0.983572077
Dysplázie kyčelních kloubů	0.991182813
Široký kořen nosu	0.993382621
Intelektová nedostatečnost	0.993623475
Dlouhé oční štěrby	0.993788046

Tabulka 6: Genetické příčiny onemocnění u pacientů s Kabuki syndromem a pacientů s Kabuki-like fenotypem a jejich fenotypové skóre.

Pacient	Věk v době dg.	Pohlaví	MS skóre	Kauzální genetická příčina
KS1	7	M	7	KMT2D: p.Glu5458Metfs*2 [Paderova 2016]
KS2 *	8	M	5	neznámá (NGS analýza provedena)
KS3	7	M	8	KMT2D: p.Arg2915* [Paderova 2016]
KS4	4	M	9	KMT2D: p.Glu830* [Paderova 2016]
KS5	2	M	8	KMT2D: p.Glu1517Argfs*4 [Paderova 2016]
KS6	15	M	5	neznámá (bez NGS souhlasu)
KS7 *	7	Z	4	neznámá (NGS analýza provedena)
KS8 *	2	Z	4	neznámá (NGS analýza provedena)
KS9 *	3	Z	4	6.6 Mb dup v Xp21.3p21.2 [Paderova 2016]
KS10 *	1	M	7	HUWE1: p.Arg110Trp [Paderova 2018]
KS11 *	4	M	6	EFTUD2: p.Tyr292* [Paderova 2018]
KS12	1	Z	8	KMT2D: p.Pro2117Thrfs*27 [Paderova 2016]
KS13	4	M	8	KMT2D: p.Asp1876Glyfs*38 [Paderova 2016]
KS14 *	16	M	4	neznámá (NGS analýza provedena)
KS15 *	5	Z	2	neznámá (NGS analýza provedena)
KS16	6	Z	7	KMT2D: p.Tyr5388*
KS17 *	8	M	6	GRIN1: p.Asn824Tyr [Paderova 2018]
KS18	12	M	6	neznámá (bez NGS souhlasu)
KS19 *	3	M	4	neznámá (NGS analýza provedena)
KS20	15	M	7	KMT2D: p.Gly5182Alafs*61
KS21	4	Z	6	KMT2D: p.Arg5454Glufs*2
KS22 *	15	Z	5	neznámá (NGS analýza provedena)
KS23 *	31	M	6	KMT2A: p.Thr2736Glnfs*
KS24	10	M	7	KMT2D: p.Tyr2199Ilefs*65
KS25 *	9	Z	4	200 kb del ve 14q11.2 [Paderova 2018]
KS26	7	Z	4	neznámá (bez NGS souhlasu)
KS27 *	11	Z	6	neznámá (NGS analýza provedena)
KS28 *	15	Z	5	neznámá (NGS analýza provedena)

KS29	7	Z	7	neznámá (bez NGS souhlasu)
KS30 *	4	Z	3	neznámá (NGS analýza provedena)
KS31	10	M	7	neznámá (bez NGS souhlasu)
KS32 *	4	Z	5	neznámá (NGS analýza provedena)
KS33	3	Z	6	KMT2D: p.Gln364*
KS34 *	3	M	7	neznámá (NGS analýza provedena)
KS35	NA	?	NA	neodůvodněná indikace (plod)
KS36	20	M	7	KMT2D: p.Arg4536*
KS37	4	M	5	neznámá (bez NGS souhlasu)
KS38	8	Z	5	neznámá (bez NGS souhlasu)
KS39	NA	Z	NA	KMT2D: c.176+1delG (plod)
KS40	3	M	7	KMT2D: p.Leu656Argfs*274
KS41	7	Z	3	neznámá (bez NGS souhlasu)
KS42	7	Z	9	KMT2D: p.Asp5055_Leu5056dup
KS43	1	Z	6	KMT2D: p.Gln4136*
KS44	1	M	8	KMT2D: p.Glu4102*
KS45	24	M	6	KMT2D: p.Ala5076Hisfs*2

* pacienti u nichž bylo použito testování metodou aCGH a v případě negativního výsledku pak metodou NGS klinický exom (CES)

Tabulka 7: Seznam kauzálních genetických změn u pacientů s Kabuli-like fenotypem

Pacient/ Pohlaví	Gen	Onemocnění/ Syndrom	Mutace - DNA úroveň	Mutace - Proteinová úroveň	Patoge nicita	Typ mutace	Dědičnost	Publikováno
KS9/Z	CNV (<i>ARX</i> , <i>IL1RAPL1</i> , <i>DMD</i>)	Syndromická intelektová nedostatečnost	6,6 Mb duplikace arr[hg19]Xp21.3p21.2 (24,942,199- 31315,935)x3		4	Large dup	AD, De- novo	ne
KS10/M	<i>HUWE1</i>	Syndromická intelektová nedostatečnost	NM_031407.5: c.328C>T	p.Arg110Trp	5	MS	XL, matka přenašečka	Zhu 2015, Taylor 2015, Miller 2017
KS11/M	<i>EFTUD2</i>	Mandibulofaciální dysostóza s mikrocefalií	NM_004247.3: c.876T>G	p.Tyr292*	5	NS	AD, De- novo	ne
KS17/M	<i>GRIN1</i>	Syndromická intelektová nedostatečnost	NM_001185090.1: c.2470A>T	p.Asn824Tyr	4	MS	AD, De- novo	ne
KS23/M	<i>KMT2A</i>	Wiedemann-Steiner syndrom	NM_001197104.1: c.8206delA	p.Thr2736Glnfs*	5	FS	AD, De- novo	ne
KS25/Z	CNV (<i>CHD8</i> , <i>SUPT16H</i>)	Syndromická intelektová nedostatečnost	200 kb delece arr[hg19]14q11.2 (21,819,647- 21,952,317)x1		5	Large del	AD, De- novo	Drábová 2015, Zahir 2007

M: pohlaví mužské, **Z:** pohlaví ženské, **FS:** frameshift mutace, **NS:** nonsense mutace, **SS:** splice site mutace, **MS:** missense mutace, **AD:** autozomálně dominantní onemocnění, **XL:** X-vázané onemocnění

Tabulka 8: Fenotyp pacientů se záměnovými mutacemi v X-vázaném *HUWE1* genu.

Pacient/ Rodina	Publication	Pohlaví	Mutace	Proteinová doména	Fenotyp
KS10	V této dizertační práci	M	Arg110Trp	DUF908	Závažná intelektová nedostatečnost, celkové vývojové opoždění, růstová retardace, hypotonie, mikrocefalie, metopická synostóza, trigonocefalie, prořídle vlasy, klenuté obočí, hypotelorismus, dolusměřující oční štěrby, potlačený kořen nosu, úzký nos, mikrognacie, úzký horní ret, oteřená ústa, nízko posazené uši, sluchová vada, hypoglykémie, gastroesofageální reflux, renální hypoplázie, nefrolitida, patent foramen ovale, trikspidální regurgitace.
Trio 99	Zhu, 2015	M	Arg110Trp	DUF908	Celkové vývojové opoždění, epileptické záchvaty, kraniosynostóza pravého koronálního švu, strabismus, ztráta sluchu, Chiari I malformace.
Fam14	Miller, 2017	M	Arg110Trp	DUF908	Středí intelektová nedostatečnost, faciální dysmorfismus, zubní anomálie, pectus excavatum, skolióza, dlouhé dlaně Chiari malformace.
Boy_UNID	Taylor, 2015	M	Arg110Trp	DUF908	Střední intelektová nedostatečnost, metopická kraniosynostóza, dysmorfické rysy.
CRS_4659	Taylor, 2015	F	Arg110Gln	DUF908	Problémy s učením, kraniosynostózy. De-novo mutace paternálního původu, u pacientky preferenční inaktivace maternálního X chromozómu.
A323	Froyen, 2008	M	Arg4013Trp	none	Mírná intelektová nedostatečnost, makrocefalie, dysmorfické rysy nejsou patrné
A323	Froyen, 2008	F	Arg4013Trp	none	Výrazná porucha učení, makrocefalie.
UK444	Froyen, 2008	M	Arg4187Cys	HECT	Mírná intelektová nedostatečnost, normální vývin řeči, normální obvod hlavy, růstové opoždění, dysmorfické rysy nejsou patrné.
UK106	Froyen, 2008	M	Arg2981His	DUF4414	Výrazné dysmorfické rysy nejsou patrné, jazykové schopnosti nevyvinuty, normální obvod hlavy, růstová retardace, flexní deformity v kolenou, zácpy.
K9149	Friez, 2016	F	Gly4310Arg	HECT	Normální intelekt, Bez fenotypických abnormalit. Zaznamenán posun v X inaktivaci (>90:10).
K9149	Friez, 2016	M	Gly4310Arg	HECT	Závažná intelektová nedostatečnost (IQ<20), řeč nevyvinuta, růstová retardace, snížená muskulatura distálně na končetinách, mikrocefalie, vysoké čelo, bifrontální zúžení, prominentní obočí, hypotelorismu, epikany, nahoru směřující oční štěrby, rozštěp rtu a patra, prominentní nos, plochý kořen nosu, velké uši, hluchota, brachydaktýlie, hyperflexibilní klouby, nesestouplá varlata, malý penis.
K9223	Friez, 2016	F	Gly4310Arg	HECT	Normální intelekt, normální fůst a faciální rysy. Zaznamenán posun v X inaktivaci (>90:10).
K9223	Friez, 2016	M	Gly4310Arg	HECT	Závažná intelektová nedostatečnost, limitovaný vývoj řeči, růstová retardace, trojúhelníkový obličej, bifrontální zúžení, nízká posteriorní vlasová linie, blepharophimoza, dolů směřující oční štěrby, kulatý nos, úzký horní ret, malá plochost, nízko posazené uši, ztráta sluchu, pectus excavatum, nystagmus, atrofie optiku, špatná koordinace, rozsáhlé kloubní kontraktury, hyperaktivita, malý mozek s zvětšené komory.
Fam 3	Friez, 2016	F	Arg4063Gln	HECT	Mírná porucha učení. Test X-inaktivace neinformativní.
Fam 3	Friez, 2016	M	Arg4063Gln	HECT	Závažná intelektová nedostatečnost, limitovaný vývoj řeči, růstová retardace, mikrocefalie, prořídle vlasy, hluboko posazené oči, dolusměřující oční štěrby, široký kořen nosu a špička nosu, úzký horní ret, prognacie, nízko posazené uši, ataxické pohyby, redukovaná hybnost kyčlí a kolenou, stažené Achilovy šlachy, normální sluch a zrak, normální genital, opožděný kostní věk, redukce bílé hmoty v parietální, occipitální a periventrikulární oblasti.

Tabulka 9: Fenotypové znaky pacientů s mutací v genu *EFTUD2*

Fenotyp	KS11	NG103
Pohlaví / Věk při vyšetření	M / 4	M / 11
Mutace	<i>EFTUD2</i> : p.Tyr292Ter	<i>EFTUD2</i> : p.Tyr614Ter
Diferenciální dg.	Kabuki syndrom	Syndromická hluchota
Malý vzrůst	x	x
ID	lehká	lehká
Opožděná řeč	x	x
Porucha sluchu	středně těžká, převodní porucha sluchu	x
Mikrocefalie	mírná	x
Metopic ridge	-	
Prominentní glabella	-	
Faciální asymetrie	-	
Malá brada	-	x
Mikrocie nebo abnormality vnějšího ucha	nízko posazené “cup-shaped” uši, úzké zvukovody	mikrocie
Atrézie choan	-	
Dolu směřující oční štěrby	-	x
Široký kořen nosu	x	x
Kulatá špička nosu		
Rozštěp patra	-	x
Evertovaný spodní ret	-	x
Klinodaktýlie malíčku	- kratší malíček	
Abnormality palce	-	x
Vrozená vada ledvin	-	pyelonefritis
Vrozená vada srdce	-	lehká chlopenní vada
Kryptorchidismus	-	x
Další	epilepsie, hypotonie, hypertelorismus, klenuté nadočnicové oblouky s prořídnutím laterální části obočí, široké ústa, širší mezizubní prostory	

Tabulka 10: Fenotypové znaky pacientů s Wiedemann-Steiner syndromem

Fenotyp	KS23	NG28	CDL2
Pohlaví / Věk při vyšetření	M / 10	Ž / 4	Ž / 19
Mutace	<i>KMT2A:</i> p.Thr2736GlnfsTer21	<i>KMT2A:</i> c.3335-1G>C	<i>KMT2A:</i> p.Thr2827Ter
Diferenciální dg.	Kabuki syndrom	Cornelia DeLange	Cornelia DeLange
Hypertrychóza předloktí			
Hypertrychóza dolních končetin	v 10 letech nadměrné pubické ochlupení	x	x
Hypertrychóza zad		x	x
Malý vzrůst	10-25 percentil	pod 3. percentil	pod 3. percentil
ID	x	x	x
Opožděná řeč	x	x	x
Hypotonie		x	
Poporodní hypotrofie	x	x	
Dolu směřující oční štěrbiny		x	
Úzké oční štěrbiny	x	x	x
Hypertelorismus	x		x
Epikanty	x	x	
Husté obočí		x	x
Klenuté obočí			
Dlouhé řasy			x
Široký kořen nosu		x	x
Široká špička nosu	x		x
Velké uši	x		
Vysoké patro	x		x
Tenký horní ret	x	x	x
Abnormality zubů	x		x
Husté vlasy			x
Klinodaktýlie malíčku	x	x	
Polštářky na prstech	x		
Hypoplázie ledvin	x		x
Předčasná puberta	x		
Dysplázie kyčlí	x	x	
Skeletální abnormality			
Další			

Tabulka 11: Seznam patogenních mutací u pacientů se syndromickou ID

Vzorek/Pohlaví	Gen	Onemocnění/Syndrom	Mutace cDNA úroveň	Mutace Proteinová úroveň	Patogenicita	Typ mutace	Dědičnost	Publikováno
NG28/Z	<i>KMT2A</i>	Wiedemann-Steiner syndrom	c.3335-1G	p.?	5	SS	AD, De-novo	ne
CDL2/Z	<i>KMT2A</i>	Wiedemann-Steiner syndrom	c.8481T>G	p.Tyr2827*	5	NS	AD, De-novo	ne
NG49A/Z	<i>KDM6B</i>	Regulace exprese HOX genů	c.2041C>T	p.Gln681*	3-4	NS	AD, De-novo	ne
KS49D/M	<i>KDM6B</i>	Regulace exprese HOX genů	c.2041C>T	p.Gln681*	3-4	NS	AD, De-novo	ne
NG47A/Z	<i>RAB3GAP1</i>	Warburg micro syndrom 1	c.119delT c.1380delG	p.Ile40Metfs*54 mat p.Ala461Leufs*6 pat	5 5	FS FS	AR	ne
NG11/M	<i>ATRX</i>	MR, hypotonický obličej	c.797A>G	p.Tyr266Cys	3-4	MS	XLR	Wada a kol. 2016 Gibbons a kol.2000
CDL7/Z	<i>NIPBL</i>	Cornelia de Lange syndrom	c.5225+2T>A	p.?	5	SS	AD, De-novo	ne
NG67/Z	<i>GRIN2B</i>	MR AD6	c.2533C>T	p.Gln845*	5	NS	AD, De-novo	ne
NG109/M	<i>MAGEL2</i>	Schaaf-Yang syndrom	c.1990_1991insT	p.Pro664Leufs*49	5 if pat	FS	AD, imprint paternální alely	ne
NG103A/M	<i>EFTUD2</i>	Mandibulofaciální dysostóza	c.1842T>G	p.Tyr614*	5	NS	AD, De-novo	ne
NG171/M	<i>HERC2</i>	MR AR38	c.10460C>T c.10424C>T	p.Ser3487Leu pat p.Ser3475Phe mat	3 3	MS MS	AR	ne

M: pohlaví mužské, **Z:** pohlaví ženské, **FS:** frameshift mutace, **NS:** nonsense mutace, **SS:** splice site mutace, **MS:** missense mutace
Růžově zvýrazněn nový gen s možným klinickým významem – *KDM6B*

Tabulka 12: Seznam pacientů se syndromickou ID zahrnutých do CES testování, včetně výsledků CES testování

Kód pacienta	Výsledek CES	Kód pacienta	Výsledek CES
KS2/M	0	NG30/M	0
KS7/Z	0	NG32/F	0
KS8/Z	0	NG37/M	0
KS10/M	HUWE1: p.Arg110Trp	NG45/M	0
KS11/M	EFTUD2: p.Tyr292*	NG47/F	RAB3GAP1:p.Ile40Metfs*54 RAB3GAP1:p.Ala461Leufs*6
KS14/M	0	NG49A/F	KDM6B:p.Gln681*
KS15/Z	0	NG49/D	KDM6B:p.Gln681*
KS17/M	GRIN1:p.Asn824Tyr	NG52/M	0
KS19/M	0	NG67/F	GRIN2B:p.Gln854*
KS22/Z	0	NG68/M	0
KS23/M	KMT2A:p.thr2736Glnfs*	NG73/M	0
KS27/Z	0	NG79/F	0
KS28/Z	0	NG84/Z	0
KS30/Z	0	NG85/M	0
KS32/Z	0	NG86/M	0
KS34/M	0	NG88/Z	0
CDL1/M	0	NG92/Z	0
CDL2/Z	KMT2A:p.tzr2827*	NG95/M	0
CDL3/Z	0	NG98/M	0
CDL4/M	0	NG99/M	0
CDL5/M	0	NG102/M	0
CDL6/Z	0	NG103/M	EFTUD2:p.Tyr614*
CDL7/Z	NIPBL:c.5225+2T>A	NG104/M	0
NG11/M	ATRX:p.Tyr266Cys	NG108/M	0
NG13/M	0	NG109/M	MAGEL2:p.Pro664Leufs*49
NG14/M	0	NG111/Z	0
NG20/M	0	NG120/M	0
NG24/M	0	NG127/M	0
NG27/M	0	NG153/F	0
NG28/F	0	NG171/M	HERC2:p.Ser3487Leu HERC2:p.Ser3475Phe

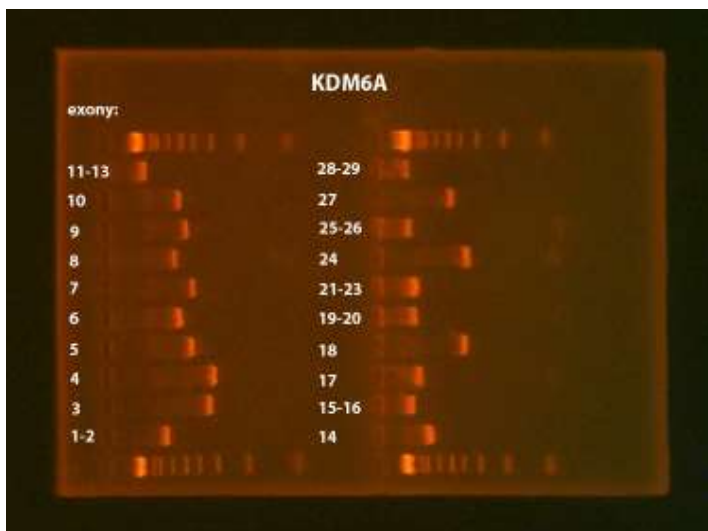
Tabulka 13: Srovnání fenotypu sourozenců s protein zkracující mutací v *KDM6B* genu

Fenotyp	NG49A sestra	NG49 bratr
Věk při vyšetření	7,5 let	22 let
Mutace	<i>KDM6B</i> :p.Gln681Ter	<i>KDM6B</i> :p.Gln681Ter
Hypotonie	+	+
Nevývin řeči	+	+
ID	těžká	střední
ADHD	+	+
Vrozená srdeční vada	Hypertrofie levé komory	Subvalvulární stonóza plicnice
Makrocefalie	++	+
Široké čelo	++	+
Hluboko posazené oči	++	+
Široký kořen nosu	+	+
Široká špička nosu	+	+
Dlouhý nos	+	+
Krátká kolumela	+	+
Krátké filtrum	+	+
Velké dysplastické antevertované uši	++	+
Výrazná brada	++	+
Krátké prsty	+	+
Klinodaktýlie malíčku	+	-
Obezita, dyslipoproteinemie, hypertriglyceridemie	-	+
Epilepsie	-	+
Spastická paraparéza	+	-
Enuresis, Encopresis	+	-

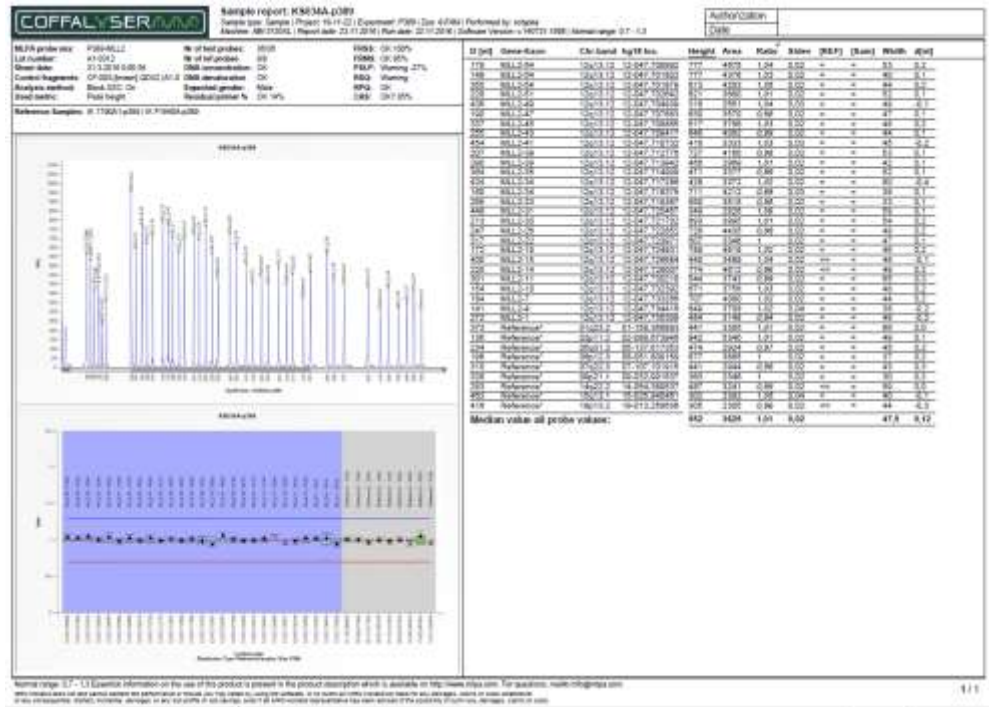
Obrázek 1: PCR produkty pro sekvenování KMT2D genu na 2% agarózovém gelu



Obrázek 2: PCR produkty pro sekvenování KDM6A genu na 2% agarózovém gelu



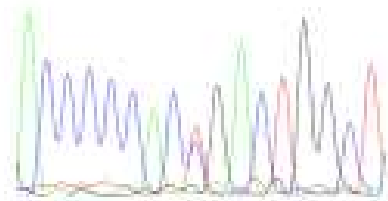
Obrázek 3: Normální nález MLPA anlyzou za použití kity P389 pro gen KMT2D na příkladu pacienta KS34



Obrázek 5 I: KMT2D mutace v České populaci



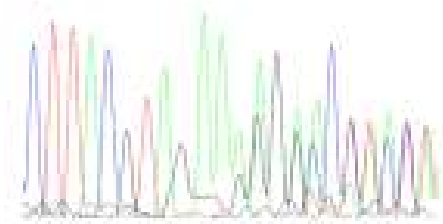
KS1: p.Glu5458Metfs*2 ex.52



KS3: p.Arg2915* ex.34



KS4: p.Glu830* ex.10



KS5: p.Glu1517Argfs*4 ex.16



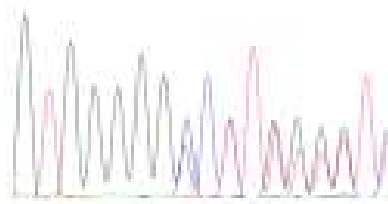
KS12: p.Pro2117Thrfs*27 ex.31



KS13: p.Asp1876Glyfs*38 ex.25



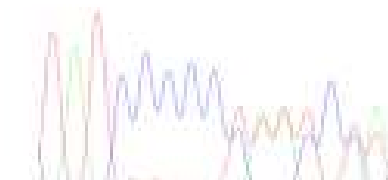
KS16: p.Tyr5388* ex.51



KS20: p.Gly5182Alafs*61 ex.48



KS21: p.Arg5454Glufs*2 ex.52



KS24: p.Tyr2199fs*65 ex.31

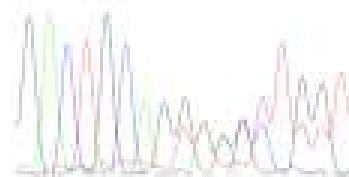
Obrázek 5 II: KMT2D mutace v České populaci



KS33: p.Gln364* ex.8



KS36: p.Arg4536* ex.40



KS39: c.176-1delG Int.2



KS40: p.Leu656Argfs*274 ex.10

Validace v procesu

KS42: p.Asp5055_Leu5056dup
ex.48



KS43: p.Gln4136* ex.39



KS44: p.Glu4102* ex.39



KS45: p.Ala5076Hisfs*2 ex.48

Obrázek 6: Umístění mutací v exonech genu KMT2D u českých Kabuki pacientů



Legenda:

Sestřihové mutace

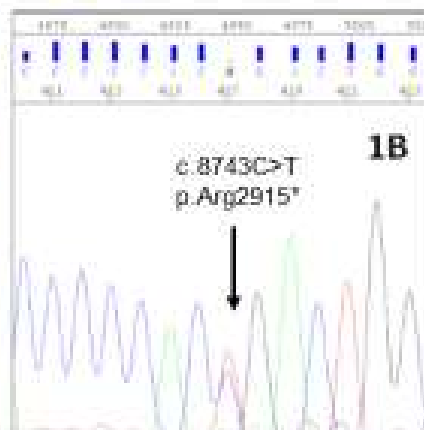
Indel mutace bez posunu čtecího rámce

Stop mutace

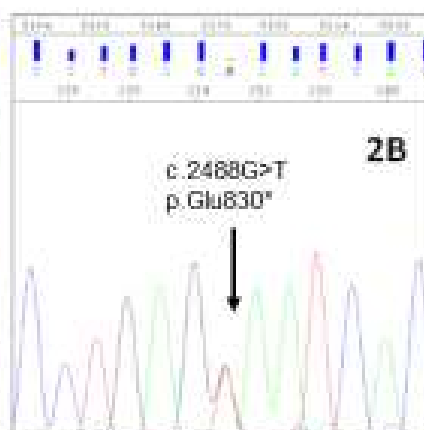
Mutace posunu čtecího rámce

Obrázek 7: Faciální fotografie vybraných českých KS pacientů s mutací v KMT2D genu a elektroferogram mutace

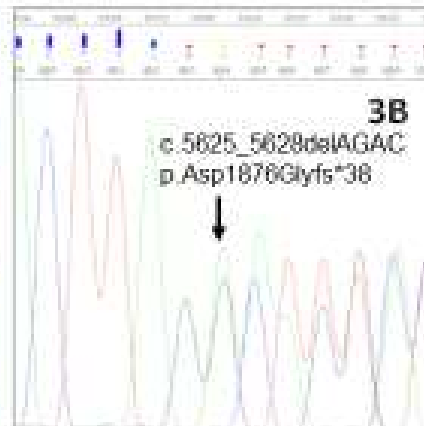
Pacient KS3



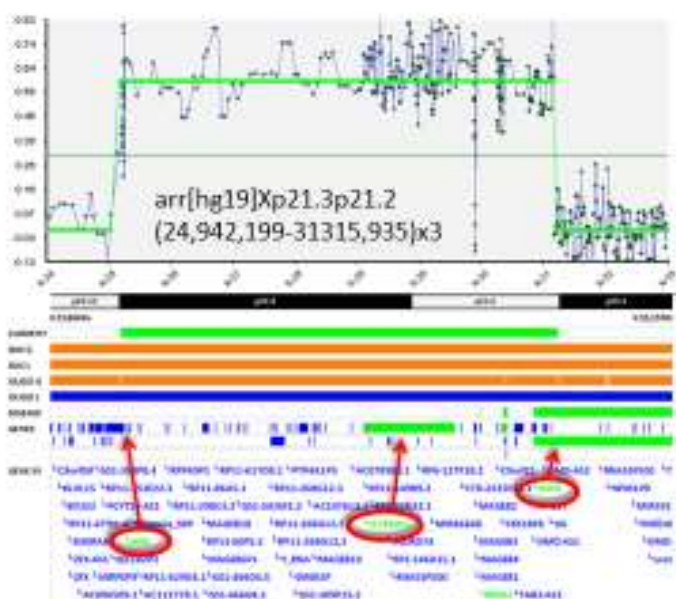
Pacient KS4



Pacient KS13



Pacient KS9



Pacient KS25



Obrázek 8 II: Pacienti s Kabuki-like syndromem a molekulární příčiny jejich onemocnění – CNVs

Závěr

V rámci této dizertační práce bylo úspěšně zavedeno molekulárně genetické testování genů *KMT2D* a *KDM6A* podmiňujících rozvoj Kabuki syndromu 1 resp. 2, a to pomocí Sangerova DNA sekvenování exonových oblastí a exon/intronových rozhraní, včetně MLPA analýzy obou genů. Z důvodu zlevňování testování NGS v porovnání se Sangerovým sekvenováním byl v roce 2017 v rámci této dizertační práce navržen NGS panel obsahující téměř 300 genů pro některé syndromy zahrnující geny asociované s ID, včetně genů pro hluchotu a slepotu a přední segment oka (tj. pro účely jiných projektů na pracovišti).

Kombinací metod Sangerova DNA sekvenování a MLPA bylo otestováno 41 pacientů s klinickým podezřením na KS a pomocí panelové NGS pak 2 další pacienti s tímto fenotypem, celkem tedy 43 pacientů s KS. U 17 pacientů (40%) byla zachycena patogenní mutace v genu *KMT2D* Sangerovým DNA sekvenováním nebo panelovým NGS vyšetřením. Testování genu *KDM6A* a testování metodou MLPA u obou genů nemělo pozitivní nálezy. Výsledkem této studie je stanovení celkového spektra 18 mutací v genu *KMT2D* v České populaci. Naprostá většina nalezených mutací byla protein zkracujícího typu (posunové – frameshit mutace převažovaly nad stop mutacemi), jedna mutace byla sestřihová a jedna typu indel bez posunu čtecího rámce, avšak již dříve publikovaná jako patogenní. Šest z těchto 18 mutací bylo již dříve popsáno včetně celosvětově nejčastější mutace c.6594delC a 12 mutací bylo pozorováno poprvé u našich pacientů. Tyto mutace byly nahlášeny do celosvětových databází. Většina z těchto nových mutací byla opublikována v publikacích Paděrová et al., 2016 a Paděrová et al., 2018. Mutace se nacházely naprosto náhodně rozprostřené po celé délce genu, shodně s jinými studiemi. Aberantní mRNA je v důsledku protein zkracujících mutací podrobena „nonsense-mediated decay“, jak bylo prokázáno Micale et al., 2013, což má za následek haploinsuficienci tohoto proteinu a rozvoj KS. Bez ohledu na umístění mutace v genu by výslednému proteinu chyběla základní funkční doména – metyltransferázová SET doména kódovaná jeho 3' koncem. Z tohoto důvodu by kódovaný protein pro žádnou z těchto mutací nebyl funkční. Fenotypově by tedy veškeré nalezené protein zkracující mutace (16/18) měly mít stejný dopad, pokud nebereme ovšem v úvahu variabilní expresivitu.

V souladu s tímto předpokladem nebyla nalezena žádná korelace fenotypu s genotypem mezi *KMT2D*⁺ (pozitivními) pacienty. Sestřihová mutace byla nalezena u plodu, nelze tudíž provést fenotypové porovnání. Fenotyp pacienta s delecí dvou aminokyselin byl obdobný fenotypu ostatních *KMT2D*⁺ pacientů.

Oproti tomu bylo však možné stanovit korelaci genotypu s fenotypem mezi skupinou pacientů s mutací v genu *KMT2D* (*KMT2D*⁺) a skupinou pacientů bez mutace (*KMT2D*⁻). Fenotypové „MLL2-skóre“ se statisticky signifikantně lišilo mezi oběma skupinami, průměrné skóre pro *KMT2D*⁺ skupinu bylo 5 (rozmezí 2-7) a pro *KMT2D*⁻ skupinu 7.4 (rozmezí 6-9). Tohoto výsledku lze využít k predikci přítomnosti mutace v genu *KMT2D* u pacientů s klinicky suspektním KS. Pacienti s „MLL2-skóre“ 6 a vyšším by měli být nejdříve podrobeni cílenému *KMT2D* testování, zatímco u pacientů s „MLL2-skóre“ 5 a nižším je z hlediska zjištění molekulární příčiny onemocnění strategicky výhodnější rovnou přejít k aCGH a při jeho negativě pak následně k CES, případně WES.

Porovnání jednotlivých fenotypových znaků vedlo k několika závěrům. Všichni pacienti s mutací v genu *KMT2D* měli dlouhé oční štěrby, široký kořen nosu, závažnou ID, převážná většina z nich pak měla růstovou retardaci, mikrocefalii, dysplastické uši, vysoké patro nebo jeho rozštěp, brachy- nebo klinodaktýlii, perzistující fetální polštářky na prstech nebo vrozenou srdeční vadu. V porovnání se skupinou KLS pacientů bez mutace v genu *KMT2D* se po provedení statistického zhodnocení významně více vyskytují ve skupině *KMT2D*⁺ hypoplastické prsty a nehty, vrozená vada ledvin, růstová retardace, strabismus a vysoké patro/rozštěp. Naopak ID, dlouhé oční štěrby, široký kořen nosu, dysplázie kyčelních kloubů a ztráta sluchu jsou naprosto nespecifickými rysy pro určení přítomnosti či nepřítomnosti mutace v genu *KMT2D*.

U 18 pacientů z 26 pacientů s KS, kteří nenesli mutaci v genech *KMT2D/KDM6A*, byl získán souhlas rodičů s testováním pomocí NGS a byli podrobeni kaskádovému testování pomocí aCGH/CES ke zjištění molekulární příčiny jejich onemocnění. U 6 z těchto 18 pacientů byla tato molekulární příčina zjištěna, u 2 pacientů byl záchyt pomocí aCGH a u 4 pacientů pak pomocí CES. Záchytnost metod aCGH/CES u *KMT2D/KDM6A* negativních pacientů s Kabuki-like fenotypem byla tedy 33%. Všechny zjištěné genetické změny byly rozdílné.

Pomocí aCGH byla u jedné pacientky nalezena 6.6 Mb *de novo* duplikace v oblasti Xp21.3p21.2 zahrnující 37 genů, mezi nimi jsou *ARX* a *IL1RAPL1*, které jsou zodpovědné za embryonální vývoj mozku, respektive tvorbu synapsí, což by mohlo vysvětlovat ID u dané pacientky. Navíc se zlom této přestavby nacházel v genu *DMD*, což by mohlo vysvětlovat hypotonii, obzvláště při změně X-inaktivace. U další pacientky aCGH odhalila 200 kb dlouhou delecii v oblasti chromozómu 14q11.2, která zahrnuje pět protein kódujících genů včetně *CHD8* a *SUPTH16H*, které byly dříve spojeny s poruchami autistického spektra, respektive s opravami DNA a regulací transkripce. Tato CNV byla již dříve publikována pro obdobný fenotyp.

U dalších 4 pacientů byly pomocí CES odhaleny mutace v genech *HUWE1*, *EFTUD2*, *GRIN1* a *KMT2A*. Fenotypový překryv KS a WSS, způsobených mutacemi v *KMT2D* respektive *KMT2A*, byl již dříve povšimnut Miyake et al., 2016. Z tohoto důvodu může být diagnóza zaměněna obzvláště pokud není přítomen kardinální znak Widemann-Steiner syndromu, tj. výrazně chlupaté předloktí, tak jako tomu bylo u našeho pacienta a bylo souladu s literaturou (Sun et al., 2017). Další 3 geny nebyly dosud vztaženy k rozvoji KS fenotypu, naše studie však ukazuje, že minimálně v určitém věkovém období připomíná faciální fenotyp těchto vzácných chorob fenotyp KS. U všech pacientů bylo provedeno porovnání s dříve publikovanými případy a shledána shoda ve většině fenotypových znaků. Mutace v genech *EFTUD2*, *GRIN1* a *KMT2A* byly nově popsány, a byly vloženy do mezinárodní databáze LOVD.

Vzhledem k tomu, že *HUWE1* je nově se objevujícím genem, bylo provedeno důkladné porovnání fenotypu našeho pacienta s dalšími publikovanými případy. V tomto ohledu u všech pacientů (včetně našeho pacienta) se záměnovou mutací v rámci aminokyseliny 110 (vysoce konzervovaná doména neznámé funkce DUF908) dochází ke vzniku kraniosynostóz a tento fakt byl poprvé publikován v práci Paděrová et al. 2018.

Vzácná onemocnění způsobená mutacemi v genech *HUWE1*, *EFTUD2*, *GRIN1* a *KMT2A*, stejně jako určitá CNV v chromozómových oblastech Xp21.3p21.2 a 14q11.2, mohou být zvažovány jako diferenciální diagnóza KS.

Další studií týkající se využití CES pro diagnózu syndromické ID bylo dále zjištěno, že dochází k fenotypovému překryvu mezi KS, Wiedeman-Steiner syndromem a syndromem Cornelia de Lange (gen *NIPBL*). U všech je přítomna ID, malý vzrůst, hypotonie, mikrocefalie, ale hlavně velmi podobný faciální fenotyp s prominentním hustým a/nebo klenutým obočím, dlouhými očními štěrbinami, někdy směřujícími dolů. Z hlediska molekulární patogeneze se všechny tři podmiňující geny (*KMT2A*, *KMT2D*, *NIPBL*) podílejí na regulaci transkripce embryonálního genomu, *KMT2A* a *KMT2D* pomocí epigenetických změn histonových oktamerů a *NIPBL* pomocí reorganizace 3D struktury genomu, a tak změnou vzájemné polohy enhancerů/silencerů a jejich cílových sekvencí (Schwarzer et al. 2017).

V rámci této práce bylo snahou zjistit molekulární příčinu VO u 60 pacientů se syndromově asociovanou ID. U této skupiny byly mimo již zmíněné mutace v genech *HUWE1 (XL)*, *EFTUD2 (AD)*, *GRIN1 (AD)* a *KMT2A (AD)* u KLS pacientů nalezeny další mutace v genu *KMT2A*. Dále byl diagnostikován další pacient s protein zkracující mutací v genu *EFTUD2*, pacient s mutací v genu *GRIN2* (ze stejné genové rodiny jako gen *GRIN1*) a pacient s mutací v dalším X-vázaném genu *ATRX*. Rovněž byli diagnostikováni 2 pacienti s AR onemocněními, podmíněnými geny *RAB3GAP1* a *HERC2*. Námi pozorované zastoupení XL a AR chorob v rámci ID onemocnění (13% v obou případech) odpovídá literatuře. Dále jsme nově též spojili histonovou demetylázu KDM6B (ze stejné genové rodiny jako KDM6A – Kabuki syndrom 2) se syndromově asociovanou ID (publikace v přípravě).

U všech těchto pacientů byla velmi důležitá zpětná vazba klinických genetiků, kteří dle zjištěné mutace znovu zhodnotili fenotyp pacienta ve světle identifikované molekulární patogeneze a nutnosti prozkoumání dalších fenotypových znaků příznačných pro molekulárně zjištěné VO. Molekulární syndromologie a spolupráce molekulárního a klinického genetika jsou tak při použití aCGH, CES a WES základními a nezbytnými předpoklady pro úspěšné stanovení diagnózy. Znalost, který gen nese mutaci, je velkou výhodou pro klinickou diagnostiku a může vést k lepšímu porozumění zdravotních problémů konkrétního pacienta s VO, zacílit léčbu, a tak zlepšit kvalitu života nemocných. Je možné rovněž nabídnout postiženým rodinám možnost reprodukční volby pomocí preimplantační

/ prenatální diagnostiky.

Jak bylo vytyčeno v cílech této dizertační práce, bylo dále úspěšně otestováno využití NGS/CES ke stanovení diagnózy u pacientů s blíže nezařazenou syndromově asociovanou ID na výše zmíněné skupině 60 pacientů. Záchytnost CES byla stanovena na 25%, což je srovnatelné s většinou dosud publikovaných studií. Tato skutečnost činí CES velmi výhodným diagnostickým nástrojem pro zjištění molekulární diagnózy u pacientů se syndromově asociovanou ID, obzvláště proto, že se u těchto syndromů projevuje variabilní expresivita a významný překryv v jejich fenotypových znacích. V současné době lze CES doporučit jako metodu první volby při diagnostice blíže nezařazených VO spojených s ID, případně v kombinaci s aCGH. S rychlým snižováním nákladů na NGS pak bude možné přejít k CES jako metodě první volby pro všechny VO se syndromovou komponentou a ID. Rovněž tak s vylepšením bioinformatických postupů bude CES případně WES či WGS moci zcela zastoupit i aCGH ve výzkumu a diagnostice.

U některých pacientů s jasnou genetickou příčinou jejich VO (včetně pacientů se syndromem Kabuki-like) není stále možno určit pomocí aCGH/CES kauzální genetickou etiopatogenezi. Molekulární příčinou v doposud neobjasněných případech může být mosaicismus, který by mohl být odhalen hlubokým sekvenováním (WES/WGS), či mosaicismus vztahující se pouze k určité tkáni, a nepřítomný v lymfocytech, ze kterých je DNA obvykle extrahována. Dále molekulární příčinou může být rozsáhlá mutace typu indel, či SNP v nekódující části genomu, která nicméně může vést ke změně sestřihového místa, k regulaci sestřihu genů, či regulaci transkripce. Tyto změny by pak mohly být odhaleny za použití WGS či sekvenace RNA. Další změny se mohou kromě genomu a transkriptomu nacházet též v metabolomu či liponomu. V regulaci transkripce je nutné zvažovat epigenetické změny chromatinu a histonů, na což nám poukazuje již význam proteinů kódovaných geny *KMT2D*, *KMT2A*, *KDM6A*, *KDM6B* či *NIPBL*, jak bylo zmíněno v této práci. V neposlední řadě bude jistě mnoho neobjasněných příčin vzácných onemocnění spočívat v digenní či multigenní podstatě onemocnění, např. onemocnění s komplexním fenotypem bude výsledkem dvou různých vzácných chorob.

Zkráceně lze tedy závěrem říci, že budoucnost zjištění příčiny VO spočívá v použití WES, WGS a RNA sekvenování (případně ve studiu metabolomu) ve spojení s molekulární syndromologií, s tím že významným nástrojem bude též celosvětové fenotypové a genotypové sdílení dat (jako např. pomocí Phenome Central - <https://www.phenomecentral.org>), jelikož většina VO je velmi vzácných na to, aby mohla být molekulární příčina v novel genu či nekódující sekvenci jednoduše asociována.

Reference

1. Aligianis IA, Johnson CA, Gissen P, Chen D, Hampshire D, Hoffmann K et al. Mutations of the catalytic subunit of RAB3GAP cause Warburg Micro syndrome. *Nat Genet.* 2005 Mar;37(3):221-3.
2. Banka S, Lederer D, Benoit V et al. Novel KDM6A (UTX) mutations and a clinical and molecular review of the X-linked Kabuki syndrome(KS2). *Clin Genet* 2015: 87(3):252-8.
3. Banka S, Veeramachaneni R, Reardon W et al. How genetically heterogeneous is Kabuki syndrome?: MLL2 testing in 116 patients, review and analyses of mutation and phenotypic spectrum. *Eur J Hum Genet EJHG* 2012: 20: 381–388.
4. Banka S, Howard E, Bunstone S et al. MLL2 mosaic mutations and intragenic deletion-duplications in patients with Kabuki syndrome. *Clin Genet* 2013: 83: 467–471.
5. Behnecke A, Hinderhofer K, Bartsch O et al. Intragenic deletions of IL1RAPL1: Report of two cases and review of the literature. *Am J Med Genet A.* 2011 Feb; 155A(2):372-9. doi: 10.1002/ajmg.a.33656. Epub 2010 Oct 28.
6. Bienvenu T, Poirier K, Friocourt G et al. ARX, a novel Prd-class-homeobox gene highly expressed in the telencephalon, is mutated in X-linked mental retardation. *Hum. Molec. Genet.* 2002: 11: 981-991.
7. Bögershausen N, Gatinois V, Riehmer V et al. Mutation Update for Kabuki Syndrome_Genes KMT2D and_KDM6A_and Further Delineation of X-Linked_Kabuki Syndrome_Subtype 2. *Hum Mutat.* 2016: 9:847-64.
8. Bögershausen N, Wollnik B, Unmasking Kabuki syndrome. *Clin Genet* 2013: 83, 201–211.
9. Brooks SS, Wisniewski K, Brown WT. New X-linked mental retardation (XLMR) syndrome with distinct facial appearance and growth retardation. *Am J Med Genet.* 1994 Jul 15;51(4):586-90.
10. Burchfield JS, Li Q, Wang HY, Wang RF. JMJD3 as an epigenetic regulator in development and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015 Oct;67:148-57
11. Burgold T, Spreafico F, De Santa F, Totaro MG, Prosperini E, Natoli G, Testa G. The histone H3 lysine 27-specific demethylase Jmjd3 is required for neural commitment. *PLoS One.* 2008 Aug 21;3(8)
12. Carrie A, Jun L, Bienvenu T et al. A new member of the IL-1 receptor family highly expressed in hippocampus and involved in X-linked mental retardation. *Nature Genet.* 1999: 23: 25-31.
13. Charng WL, Karaca E, Coban Akdemir Z, Gambin T, Atik MM, Gu S et al. Exome sequencing in mostly consanguineous Arab families with neurologic disease provides a high potential molecular diagnosis rate. *BMC Med Genomics.* 2016 Jul 19;9(1):42.
14. Chung N, Bogliotti YS, Ding W, Vilarino M, Takahashi K, Chitwood JL, Schultz RM, Ross PJ. Active H3K27me3 demethylation by KDM6B is required for normal development of bovine preimplantation embryos. *Epigenetics.* 2017;12(12):1048-1056.

15. Courcet J-B, Faivre L, Michot C et al. Clinical and molecular spectrum of renal malformations in Kabuki syndrome. *J Pediatr* 2013; 163: 742–746.
16. Cuscó I, del Campo M, Vilardell M, González E, Gener B, Galán E, Toledo L, Pérez-Jurado LA. Array-CGH in patients with Kabuki-like phenotype: identification of two patients with complex rearrangements including 2q37 deletions and no other recurrent aberration. *BMC Med Genet*. 2008 Apr 11;9:27.
17. de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T et al. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med*. 2012 Nov 15;367(20):1921-9.
18. Drabova J, Seemanova E, Hancarova M, Pourova R, Horacek M, Jancuskova T, Pekova S, Novotna D, Sedlacek Z. Long term follow-up in a patient with a de novo microdeletion of 14q11.2 involving CHD8. *Am J Med Genet A* 2015; 167A(4), 837-41.
19. Fedele L, Newcombe J, Topf M, Gibb A, Harvey RJ, Smart TG. Disease-associated missense mutations in GluN2B subunit alter NMDA receptor ligand binding and ion channel properties. *Nat Commun*. 2018 Mar 6;9(1):957.
20. Fountain MD, Aten E, Cho MT, Juusola J, Walkiewicz MA, Ray JW a kol. The phenotypic spectrum of Schaaf-Yang syndrome: 18 new affected individuals from 14 families. *Genet Med*. 2017 Jan;19(1):45-52.
21. Friez MJ, Brooks SS, Stevenson RE et al. HUWE1 mutations in Juberg-Marsidi and Brooks syndromes: the results of an X-chromosome exome sequencing study. *BMJ Open*. 2016 Apr 29;6(4)
22. Froimchuk E, Jang Y, Ge K. Histone H3 lysine 4 methyltransferase KMT2D. *Gene*. 2017 Sep 5;627:337-342.
23. Froyen G, Corbett M, Vandewalle J et al. Submicroscopic duplications of the hydroxysteroid dehydrogenase HSD17B10 and the E3 ubiquitin ligase HUWE1 are associated with mental retardation. *Am J Hum Genet*. 2008 82(2), 432-43.
24. Fountain MD, The phenotypic spectrum of Schaaf-Yang syndrome: 18 new affected individuals from 14 families. *Genet Med*. 2017 Jan;19(1):45-52.
25. Gibbons RJ, Higgs DR. Molecular-clinical spectrum of the ATR-X syndrome. *Am J Med Genet*. 2000 Fall;97(3):204-12.
26. Guion-Almeida ML, Zechi-Ceide RM, Vendramini S, Tabith Júnior A. A new syndrome with growth and mental retardation, mandibulofacial dysostosis, microcephaly, and cleft palate. *Clin Dysmorphol*. 2006 Jul;15(3):171-4.
27. Hamdan, F. F., Gauthier, J., Araki, Y., Lin, D.-T., Yoshizawa, Y., Higashi, K. at al. Excess of de novo deleterious mutations in genes associated with glutamatergic systems in nonsyndromic intellectual disability. *Am. J. Hum. Genet*. 2011; 88: 306-316.
28. Handley MT, Morris-Rosendahl DJ, Brown S, Macdonald F, Hardy C, Bem D et al. Mutation spectrum in RAB3GAP1, RAB3GAP2, and RAB18 and genotype-phenotype correlations in warburg micro syndrome and Martsolf syndrome. *Hum Mutat*. 2013 May;34(5):686-96.
29. Hannibal MC, Buckingham KJ, Ng SB et al. Spectrum of MLL2 (ALR) mutations in 110

cases of Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A* 2011; 155A: 1511–1516.

30. Harripaul R, Noor A, Ayub M, Vincent JB. The Use of Next-Generation Sequencing for Research and Diagnostics for Intellectual Disability. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017 Mar 1;7(3).

31. Heide S, Afenjar A, Ederly P et al. Xp21 deletion in female patients with intellectual disability: Two new cases and a review of the literature. *Eur J Med Genet*. 2015 Jun-Jul;58(6-7):341-5. doi: 10.1016/j.ejmg.2015.04.003. Epub 2015 Apr 23.

32. Hoffman EP, Arahata K, Minetti C, Bonilla E, Rowland LP. Dystrophinopathy in isolated cases of myopathy in females. *Neurology*. 1992 May;42(5):967-75.

33. Hu X, Burghes AHM, Ra, PN, Thompson MW, Murphy EG, Worton RG. Partial gene duplication in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *J. Med. Genet*. 1988; 25: 369-376.

34. Huang L, Vanstone MR, Hartley T et al. Mandibulofacial Dysostosis with Microcephaly: Mutation and Database Update. *Hum Mutat* 2016; 37(2), 148-54.

35. Imagawa E, Fukai R, Behnam M, Goyal M, Nouri N, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Salehi M, Kapoor S, Tanaka F, Miyake N, Matsumoto N. Two novel homozygous RAB3GAP1 mutations cause Warburg micro syndrome. *Hum Genome Var*. 2015 Sep 17

36. Iossifov I, Ronemus M, Levy D, Wang Z, Hakker I, Rosenbaum J et al. De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron*. 2012 Apr 26;74(2):285-99.

37. Jones WD, Dafou D, McEntagart M, Woollard WJ, Elmslie FV, Holder-Espinasse M. De novo mutations in MLL cause Wiedemann-Steiner syndrome. *Am J Hum Genet*. 2012 Aug 10;91(2):358-64.

38. Juberg RC, Marsidi I. A new form of X-linked mental retardation with growth retardation, deafness, and microgenitalism. *Am J Hum Genet*. 1980 Sep;32(5):714-22

39. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992 Oct 30;258(5083):818-21.

40. Kokitsu-Nakata NM, Petrin AL, Heard JP et al. Analysis of MLL2 gene in the first Brazilian family with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A* 2012; 158A: 2003–2008.

41. Kuniba H, Yoshiura K, Kondoh T et al. Molecular karyotyping in 17 patients and mutation screening in 41 patients with Kabuki syndrome. *J Hum Genet* 2009; 54: 304–309.

42. Kuroki Y, Suzuki Y, Chyo H, Hata A. A new malformation syndrome of long palpebral fissures, large ears, depressed nasal tip, and skeletal anomalies associated with postnatal dwarfism and mental retardation. *J Pediatr* 1981; 99: 570–573.

43. Lederer D, Grisart B, Digilio MC et al. Deletion of KDM6A, a histone demethylase interacting with MLL2, in three patients with Kabuki syndrome. *Am J Hum Genet* 2012; 90(1):119-24.

44. Lemke JR, Geider K, Helbig KL et al. Delineating the GRIN1 phenotypic spectrum: A distinct genetic NMDA receptor encephalopathy. *Neurology* 2016; 86(23), 2171-8.

45. Li Y, Bögershausen N, Alanay Y et al. A mutation screen in patients with Kabuki syndrome. *Hum Genet* 2011; 130: 715–724.
46. Lines MA, Huang L, Schwartzentruber J et al. Haploinsufficiency of a spliceosomal GTPase encoded by EFTUD2 causes mandibulofacial dysostosis with microcephaly. *Am J Hum Genet* 2012; 90(2), 369-77.
47. Maas NM, Van de Putte T, Melotte C, Francis A, Schrandt-Stumpel CT, Sanlaville D et al. The C20orf133 gene is disrupted in a patient with Kabuki syndrome. *J Med Genet*. 2007 Sep;44(9):562-9. Epub 2007 Jun 23.
48. MacDonald JR, Ziman R, Yuen RK, Feuk L, Scherer SW. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jan;42(Database issue):D986-92
49. Makrythanasis P, van Bon B, Steehouwer M et al. MLL2 mutation detection in 86 patients with Kabuki syndrome: a genotype-phenotype study. *Clin Genet* 2013; 84, 539–545.
50. Martínez F, Caro-Llopis A, Roselló M, Oltra S, Mayo S, Monfort S, Orellana C. High diagnostic yield of syndromic intellectual disability by targeted next-generation sequencing. *J Med Genet*. 2017 Feb;54(2):87-92.
51. Maulik PK, Mascarenhas MN, Mathers CD, Dua T, Saxena S. Prevalence of intellectual disability: a meta-analysis of population-based studies. *Res Dev Disabil*. 2011 Mar-Apr;32(2):419-36.
52. McLaren J, Bryson SE. Review of recent epidemiological studies of mental retardation: prevalence, associated disorders, and etiology. *Am J Ment Retard*. 1987 Nov;92(3):243-54
53. Mendelsohn BA, Pronold M, Long R, Smaoui N, Slavotinek AM. Advanced bone age in a girl with Wiedemann-Steiner syndrome and an exonic deletion in KMT2A (MLL). *Am J Med Genet A*. 2014 Aug;164A(8):2079-83.
54. Micale L, Augello B, Fusco C et al. Mutation spectrum of MLL2 in a cohort of Kabuki syndrome patients. *Orphanet J Rare Dis* 2011; 6: 38.
55. Micale L, Augello B, Maffeo C et al. Molecular analysis, pathogenic mechanisms, and readthrough therapy on a large cohort of Kabuki syndrome patients. *Hum Mutat*. 2014; 35(7): 841-50
56. Miller KA, Twigg SR, McGowan SJ et al. Diagnostic value of exome and whole genome sequencing in craniosynostosis. *J Med Genet* 2017; 54(4):260-268.
57. Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N et al. MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A* 161, 2234–2243, 2013.
58. Miyake N, Tsurusaki Y, Koshimizu E, Okamoto N, Kosho T, Brown NJ, Delineation of clinical features in Wiedemann-Steiner syndrome caused by KMT2A mutations. *Clin Genet*. 2016 Jan;89(1):115-9.
59. Moortgat S, Berland S, Aukrust I, Maystadt I, Baker L, Benoit V et al. HUWE1 variants cause dominant X-linked intellectual disability: a clinical study of 21 patients. *Eur J Hum*

Genet. 2017 Nov 27

60. Morris-Rosendahl DJ, Segel R, Born AP, Conrad C, Loeys B, Brooks SS et al. New RAB3GAP1 mutations in patients with Warburg Micro Syndrome from different ethnic backgrounds and a possible founder effect in the Danish. *Eur J Hum Genet.* 2010 Oct;18(10):1100-6.

61. Musante L, Ropers HH. Genetics of recessive cognitive disorders. *Trends Genet.* 2014 Jan;30(1):32-9.

62. Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, Zemojtel T, Abedini SS, Chen W et al. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature.* 2011 Sep 21;478(7367):57-63.

63. Nakamura T, Mori T, Tada S, Krajewski W, Rozovskaia T, Wassell R et al. ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell.* 2002 Nov;10(5):1119-28.

64. Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ et al., Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet* 2010: 42, 790–793.

65. Niikawa N, Matsuura N, Fukushima Y, Ohsawa T, Kajii T. Kabuki make-up syndrome: A syndrome of mental retardation, unusual facies, large and protruding ears, and postnatal growth deficiency. *J Pediatr* 1981: 99: 565–569.

66. Ohba C, Shiina M, Tohyama J, Haginoya K, Lerman-Sagie T et al. GRIN1 mutations cause encephalopathy with infantile-onset epilepsy, and hyperkinetic and stereotyped movement disorders. *Epilepsia.* 2015 Jun;56(6):841-8.

67. Ohtani K, Zhao C, Dobрева G, Manavski Y, Kluge B, Braun T, Rieger MA, Zeiher AM, Dimmeler S. Jmjd3 controls mesodermal and cardiovascular differentiation of embryonic stem cells. *Circ Res.* 2013 Sep 13;113(7):856-62.

68. Oliveira J, Dias C, Redeker E, Costa E, Silva J, Reis Lima M, den Dunnen JT, Santos R. Development of NIPBL locus-specific database using LOVD: from novel mutations to further genotype-phenotype correlations in Cornelia de Lange Syndrome. *Hum Mutat.* 2010 Nov;31(11):1216-22.

69. O’Roak BJ, Vives L, Fu W, Egertson JD et al. Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science Part A* 2012: 338A, 1619–1622.

70. Paderova J, Holubova A, Simandlova M et al. Molecular genetic analysis in 14 czech kabuki syndrome patients is confirming the utility of phenotypic scoring. *Clin Genet* 2016 [Epub ahead of print]

71. Paderova J, Drabova J, Holubova A, et al. Under the mask of Kabuki syndrome: Elucidation of genetic-and phenotypic heterogeneity in patients with Kabuki-like phenotype. *Eur J Med Genet.* 2018 Jan 4.

72. Paulussen ADC, Stegmann APA, Blok MJ et al. MLL2 mutation spectrum in 45 patients with Kabuki syndrome. *Hum Mutat* 2011: 32: E2018–2025.

73. Picker-Minh S, Busche A, Hartmann B, Spors B, Klopocki E, Hübner C, Horn D, Kaindl AM. Large homozygous RAB3GAP1 gene microdeletion causes Warburg micro syndrome

1. Orphanet J Rare Dis. 2014 Oct 21;9:113
74. Priolo M, Micale L, Augello B et al. Absence of deletion and duplication of MLL2 and KDM6A genes in a large cohort of patients with Kabuki syndrome. *Mol Genet Metab* 2012; 107: 627–629.
75. Puffenberger EG, Jinks RN, Wang H, Xin B, Fiorentini C, Sherman EA et al. A homozygous missense mutation in HERC2 associated with global developmental delay and autism spectrum disorder. *Hum Mutat.* 2012 Dec;33(12):1639-46.
76. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405-24.
77. Rump P, Jazayeri O, van Dijk-Bos KK, Johansson LF, van Essen AJ, Verheij JB et al. Whole-exome sequencing is a powerful approach for establishing the etiological diagnosis in patients with intellectual disability and microcephaly. *BMC Med Genomics.* 2016 Feb 4;9:7.
78. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463-7.
79. Sawyer SL, Hartley T, Dymant DA, Beaulieu CL, Schwartzentruber J, Smith A, FORGE Canada Consortium; Care4Rare Canada Consortium, Majewski J, Boycott KM. Utility of whole-exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey: time to address gaps in care. *Clin Genet.* 2016 Mar;89(3):275-84
80. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jun 15;30(12)
81. Schwarzer, W., Abdennur, N., Goloborodko, A., Pekowska, A., Fudenberg, et al. Two independent modes of chromatin organization revealed by cohesin removal. *Nature* 2017; 551: 51-56.
82. Shen E, Shulha H, Weng Z, Akbarian S. Regulation of histone H3K4 methylation in brain development and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014 Sep 26;369(1652).
83. Shi X, Zhang Z, Zhan X, Cao M, Satoh T, Akira S et al. An epigenetic switch induced by Shh signalling regulates gene activation during development and medulloblastoma growth. *Nat Commun.* 2014 Nov 5;5:5425.
84. Soden SE, Saundres SJ et al. Effectiveness of exome and genome sequencing guided by acuity of illness for diagnosis of neurodevelopmental disorders. *Science Translational Medicine* 03 Dec 2014: Vol. 6, Issue 265, pp. 265ra168
85. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, Lichter P (1997) Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes, Chromosomes and Cancer* 20:399-407.
86. Soto D, Olivella M, Grau C, Armstrong J, Alcon C, Gasull X et al. Rett-like Severe Encephalopathy Caused by a De Novo GRIN2B Mutation Is Attenuated by D-serine Dietary Supplement. *Biol Psychiatry.* 2018 Jan 15;83(2):160-172.

87. Steiner CE, Marques AP. Growth deficiency, mental retardation and unusual facies. *Clin Dysmorphol*. 2000 Apr;9(2):155-6.
88. Strom SP, Lozano R, Lee H, Dorrani N, Mann J, O'Lague PF et al. De Novo variants in the KMT2A (MLL) gene causing atypical Wiedemann-Steiner syndrome in two unrelated individuals identified by clinical exome sequencing. *BMC Med Genet*. 2014 May 1;15:49.
89. Sun Y, Hu G, Liu H, Zhang X, Huang Z, Yan H, Wang L, Fan Y, Gu X, Yu Y. Further delineation of the phenotype of truncating KMT2A mutations: The extended Wiedemann-Steiner syndrome. *Am J Med Genet A*. 2017 Feb;173(2):510-514.
90. Taylor JC, Martin HC, Lise S et al. Factors influencing success of clinical genome sequencing across a broad spectrum of disorders. *Nat Genet* 2015: 47(7):717-726.
91. Van Laarhoven PM, Neitzel LR, Quintana AM, Geiger EA, Zackai EH, Kabuki syndrome genes KMT2D and KDM6A: functional analyses demonstrate critical roles in craniofacial, heart and brain development. *Hum Mol Genet*. 2015 Aug 1;24(15):4443-53.
92. Verhagen JM, Oostdijk W, Terwisscha van Scheltinga CE, Schalijs-Delfos NE, van Bever Y. An unusual presentation of Kabuki syndrome: clinical overlap with CHARGE syndrome. *Eur J Med Genet*. 2014 Sep;57(9):510-2
93. Visser R, Beemer FA, Veenhoven RH, De Nef JJ. Hypertrichosis cubiti: two new cases and a review of the literature. *Genet Couns*. 2002;13(4):397-403. Review.
94. Warburg M, Sjö O, Fledelius HC, Pedersen SA. Autosomal recessive microcephaly, microcornea, congenital cataract, mental retardation, optic atrophy, and hypogenitalism. Micro syndrome. *Am J Dis Child*. 1993 Dec;147(12):1309-12.
95. White SJ, Laros JFJ, Bakker E, Cambon-Thomsen A, Eden M, Leonard S et al. Critical points for an accurate human genome analysis. *Hum Mutat*. 2017 Aug;38(8):912-921. doi: 10.1002/humu.23238. Epub 2017 Jun 16. Review.
96. Wiedemann HR, Kunze J, Grosse FR, Dibbern H: A syndrome of abnormal facies, short stature, and psychomotor retardation, in *Atlas of Clinical Syndromes: A Visual Aid to Diagnosis for Clinicians and Practicing Physicians*, ed 2, pp 198-199 (Wolfe Publishing Ltd, London 1989).
97. Wijayatunge R, Liu F, Shpargel KB, Wayne NJ, Chan U, Boua JV, Magnuson T, West AE. The histone demethylase Kdm6b regulates a mature gene expression program in differentiating cerebellar granule neurons. *Mol Cell Neurosci*. 2018 Mar;87:4-17. doi: 10.1016/j.mcn.2017.
98. Yavarna T, Al-Dewik N, Al-Mureikhi M, Ali R, Al-Mesaifri F, Mahmoud L et al. High diagnostic yield of clinical exome sequencing in Middle Eastern patients with Mendelian disorders. *Hum Genet*. 2015 Sep;134(9):967-80.
99. Zahir F, Firth HV, Baross A et al. Novel deletions of 14q11.2 associated with developmental delay, cognitive impairment and similar minor anomalies in three children. *J Med Genet* 2007: 44(9), 556-61.
100. Zhu X, Petrovski S, Xie P. Whole-exome sequencing in undiagnosed genetic diseases: interpreting 119 trios. *Genet Med* 2015: 17(10), 774-81.

Přílohy

Příloha 1: Seznam primerů pro gen KMT2D

Příloha 2: Seznam primerů pro gen KDM6A

Příloha 3: Seznam MLPA sond pro gen KMT2D

Příloha 4: Seznam MLPA sond pro gen KDM6A

Příloha 5: Kabuki fenotypový dotazník ÚBLG FN Motol

Příloha 6: Seznam genů NGS kitu Focused Exome (Agilent)

Příloha 7: Seznam genů NGS panelu po Kabuki syndrom (Roche)

Příloha 8: Publikovaný prvoautorský článek 1: *Molecular genetic analysis in 14 Czech Kabuki syndrome patients is confirming the utility of phenotypic scoring*

Příloha 9: Publikovaný prvoautorský článek 2: *Under the mask of Kabuki syndrome: Elucidation of genetic- and phenotypic heterogeneity in patients with Kabuki-like phenotype*

Příloha 1: Sekvenčně specifické primery pro Sangerovo sekvenování KMT2D genu

Označení primeru	Použití: PCR: PCR a sekvence Seq: pouze sekvence F: forward, R: reverse	Sekvence 5' - 3'
1-2F	MLL2 Exony 1-2 PCR F	GATGCCTTCTTCCCAGGATT
1-2R	MLL2 Exony 1-2 PCR R	TTCCCAACACTCATTITCC
3-5F	MLL2 Exony 3-5 PCR F	GTTTGAGGGCACATGAGGAT
3-5R	MLL2 Exony 3-5 PCR R	CCTGGTGCTCACAAAGTTCA
6-9F	MLL2 Exony 6-9 PCR F	GCAATGTGCTGAGGCTTACA
6-9R	MLL2 Exony 6-9 PCR R	ACAGAAAGTGTGGGGTCTGG
6-9SF	MLL2 Exony 6-9 Seq F	CCCTGATTCTGCCCTATTGT
6-9SR	MLL2 Exony 6-9 Seq R	GCATTGGTCAGACAGCAAAG
10F	MLL2 Exon 10 PCR F	CCCTGAAATTCATCCCCTTT
10R	MLL2 Exon 10 PCR R	TGTGCCATGAAGAGTTACAGC
10SF	MLL2 Exon 10 Seq F	AAGAGTCACCCCCATCTCCT
10SR	MLL2 Exon 10 Seq R	AAATGGTGGGAACAGACGAG
11F	MLL2 Exon 11 PCR F	GCTGTAACCTTTCATGGCACA
11R	MLL2 Exon 11 PCR R	AGCTCTAGCCCAAACCCATT
11SF	MLL2 Exon 11 Seq F	CAGCCTTGAACCCAGTG
11SR	MLL2 Exon 11 Seq R	GCACAGGGGAGCCTTTAAGT
12-14F	MLL2 Exony 12-14 PCR F	AGTGGGACTCCTGGGCTTAT
12-14R	MLL2 Exony 12-14 PCR R	CCACCGTTGAGTTCCAAAGT
12-14SF	MLL2 Exony 12-14 Seq F	TGACTCTGGTCGCAAATCAG
12-14SR	MLL2 Exony 12-14 Seq R	TCCAGTTTTCCCATCTATCCTC
15-18F_FN	MLL2 Exony 15-18 PCR F	TGGAGGCCTAGTCTCTGCAT
15-18R_FN	MLL2 Exony 15-18 PCR R	AGACGAAATCCTAGCAGTGAAGA
15-18SF	MLL2 Exony 15-18 Seq F	TGACAGAGGCTGGGTTTAGG
15F_FN	MLL2 Exon 15 PCR F	ACCTCTTTTCCACCTCACACC
15R_FN	MLL2 Exon 15 PCR R	CAGAGCTTTAGCACCCAACC
16-18R_FN	MLL2 Exony 16-18 Seq R	AATCCTAGCAGTGAAGAGACCAT
19-21F	MLL2 Exony 19-21 PCR F	GGTTGAAACTTGCAGTTCTGG
19-21R	MLL2 Exony 19-21 PCR R	GTCAGACTCGGGTTGAGAGC
22-25F	MLL2 Exony 22-25 PCR F	CTCATTGAAAGGGCCAAGAG
22-25R	MLL2 Exony 22-25 PCR R	AGGACTCCCCACCAGAGAAG
26-27F	MLL2 Exony 26-27 PCR F	CTTCTCTGGTGGGGAGTCCT
26-27R	MLL2 Exony 26-27 PCR R	CCCAAAAGAGGAGGGTCACT
28-30F	MLL2 Exony 28-30 PCR F	TCCCCATTCCCTTGTTAGTG
28-30R	MLL2 Exony 28-30 PCR R	AGACCAGGCATAGGGCAGT
31F	MLL2 Exon 31 PCR F	CCCTAAGGCTGTGTCCCATA
31R	MLL2 Exon 31 PCR R	GCAGCTGTTTCTTCTCCTG
31SF	MLL2 Exon 31 Seq F	GCAGGACCCCTTTGGACT
31SR	MLL2 Exon 31 Seq R	CAGGTGGGGTAGTGTGGAAT
31SF2	MLL2 Exon 31 Seq F2	CTCGGGCATCTCAGGTAGAG
32-33F	MLL2 Exony 32-33 PCR F	CCCCCTATATCGCTCCTGTC
32-33R	MLL2 Exony 32-33 PCR R	GCAGTGAGGGAGAAAAGGAA
34F	MLL2 Exon 34 PCR F	TCCTTCTCACTGCCCTAAG
34R	MLL2 Exon 34 PCR R	TCTAGCCTCAGTGCCCATTT
34SF	MLL2 Exon 34 Seq F	GAGACCAATGACCCCCACTT
34SR	MLL2 Exon 34 Seq R	CAAGGGTCCTGGCTCCAC
35-38F	MLL2 Exony 35-38 PCR F	GCACGGTGCAAGTAAAAACA
35-35R_FN	MLL2 Exony 35-38 PCR R	TAACATGGGAGGGTTCGGAGA
35-58SF	MLL2 Exony 35-38 Seq F	GTGGTCAGGTGGGAGTAGGA
39IF	MLL2 Exon 39 I. část PCR F	ACTTCAGCCTAGCACCCAGA
39IR	MLL2 Exon 39 I. část PCR R	TTGGACAAGCAGGAGTTGTG
39ISF	MLL2 Exon 39 I. část Seq F	CTTCTTCCCTGGCAACCTT

39ISR	MLL2 Exon 39 I. část Seq R	GGATTGCCACCTGTCCTAGA
39IIF	MLL2 Exon 39 II. část PCR F	TAGACCCAGCCGTTTCTTCA
39IIR	MLL2 Exon 39 II. část PCR R	ACCCAGGCTCACTCATTCTG
39IISF	MLL2 Exon 39 II. část Seq F	TTAAGTCCTCAGCAGCAGCA
39IISR	MLL2 Exon 39 II. část Seq R	TGTCTGTGGTCCAGGGAAG
40-42F	MLL2 Exony 40-42 PCR F	AGCCTGGGTCAGACAGAAGA
40-42R	MLL2 Exony 40-42 PCR R	ACCTCAGGTGCCCTGTTATG
43-45F_FN	MLL2 Exony 43-45 PCR F	TTGCCCAAACCTGGTAGGTG
43-45R_FN	MLL2 Exony 43-45 PCR R	GCTGACAGAGTCCCACCAAA
46-47F	MLL2 Exony 46-47 PCR F	CCCACCCAGCTGGTAGTAGA
46-47R	MLL2 Exony 46-47 PCR R	CTCCCAAAGCACTGGGATTA
48F	MLL2 Exon 48 PCR F	GAGGCTGTCTAGGGCAAAGA
48R	MLL2 Exon 48 PCR R	GGGAAGGAGGATCATTACA
48SF	MLL2 Exon 48 Seq F	TTCTGTCATGAGGAGGGTGA
48SR	MLL2 Exon 48 Seq R	CAGGTCCAGGTTCAGCAGAC
49-50F	MLL2 Exony 49-50 PCR F	GCAGTTCTGGATTGGGGTTA
49-50R	MLL2 Exony 49-50 PCR R	GACCAGAGGATCCCTGTCAA
51-54F	MLL2 Exony 51-54 PCR F	CAGAGGAGGTGGGTGGTATG
51-54R	MLL2 Exony 51-54 PCR R	CTGGCTGCTACCTCTCTTCC

Příloha 2: Seznam primerů pro sekvenaci genu KDM6A

	Sekvence 5'-3'
1-2F_KDM6A	TGTA AACGACGGCCAGT AGGCGGCGATAAAGTTGGTG
1-2R_KDM6A	CAGGAAACAGCTATGACC ATTTTCGAAGGGAGCAAGCA
3F_KDM6A	TGTA AACGACGGCCAGT TAGGTGATCGAATGGAGGCT
3R_KDM6A	CAGGAAACAGCTATGACC TGTTTAGTTGCTCATGCACTT
4F_KDM6A	TGTA AACGACGGCCAGT ATCTACTGGGAGGTGGGTGT
4R_KDM6A	CAGGAAACAGCTATGACC ACCCTTTTCCAATACCTTTCCCC
5F_KDM6A	TGTA AACGACGGCCAGT TCAGGGCTGGAATACCTCTCT
5R_KDM6A	CAGGAAACAGCTATGACC AAGGTGAGCCAACACCCTTC
6F_KDM6A	TGTA AACGACGGCCAGT TCAACCTATCTTCCTTCCCCTTT
6R_KDM6A	CAGGAAACAGCTATGACC ACCATGGAAGTCTTAGCATAACT
7F_KDM6A	TGTA AACGACGGCCAGT CCCACAGCATGTCAGTTGTC
7R_KDM6A	CAGGAAACAGCTATGACC TCTGGTCTTGCAGGTTCCAT
8F_KDM6A	TGTA AACGACGGCCAGT TGCTTAATGTTGCCATTTTGAAC
8R_KDM6A	CAGGAAACAGCTATGACC TGTACACAGCAAGCACTCCT
9F_KDM6A	TGTA AACGACGGCCAGT TTAGGTACTCTGGAACAAGGCT
9R_KDM6A	CAGGAAACAGCTATGACC TGCTGGGCAGAGGATACAAA
10F_KDM6A	TGTA AACGACGGCCAGT TAATGGCCAGAATTGGCAGT
10R_KDM6A	CAGGAAACAGCTATGACC GAAACGTCCTGCTAGACCAGA
11-13F_KDM6A	TGTA AACGACGGCCAGT AGTCCATCCTTTCAGCCGAT
11-13R_KDM6A	CAGGAAACAGCTATGACC AAAAGCCTCCTGTGCTTAGT
14F_KDM6A	TGTA AACGACGGCCAGT AGTCATTGGCCTCCTCTAACC
14R_KDM6A	CAGGAAACAGCTATGACC ACTTGTTTGCTACCTCTACTCC
15-16F_KDM6A	TGTA AACGACGGCCAGT TGACCAGATAGTGGTTCTGAGT
15-16R_KDM6A	CAGGAAACAGCTATGACC CCAGTTCCCCAAACACTTCTC
17F_KDM6A	TGTA AACGACGGCCAGT TGATAACTTTAGGACTTGGGTCAA
17R_KDM6A	CAGGAAACAGCTATGACC ACGGTCCAAATTTAGCATTTC
18F_KDM6A	TGTA AACGACGGCCAGT GGATCCACATCCCACATCTCA
18R_KDM6A	CAGGAAACAGCTATGACC TGTTTCCTAAAGGGCATCCAT

19-20F_KDM6A	TGTA ^{AAA} ACGACGGCCAGT GAAATATCACCCCATAAAATGCGT
19-20R_KDM6A	CAGGAAACAGCTATGACC AGACAAC ^T GGAGAACACTTACAA
21-23F_KDM6A	TGTA ^{AAA} ACGACGGCCAGT CAGTTGTATGGTGGAAAGGAT
21-23R_KDM6A	CAGGAAACAGCTATGACC TCTGGCTGTCTTTGCATGTT
24F_KDM6A	TGTA ^{AAA} ACGACGGCCAGT AGTGTTCTCTGTTGAGCATTGT
24R_KDM6A	CAGGAAACAGCTATGACC CCAGCTTGGTAAGTTGTCGTT
25-26F_KDM6A	TGTA ^{AAA} ACGACGGCCAGT AGCAGATCTTTTTGCACAAGC
25-26R_KDM6A	CAGGAAACAGCTATGACC CCTTTCTGTACCATAGTGGGC
27F_KDM6A	TGTA ^{AAA} ACGACGGCCAGT GCCTGCTGAGCATTGTCATT
27R_KDM6A	CAGGAAACAGCTATGACC GGCTAAGCAACAAAATTGAATCC
28-29F_KDM6A	TGTA ^{AAA} ACGACGGCCAGT CAGCCATGTTTTTCTTACCACC
28-29R_KDM6A	CAGGAAACAGCTATGACC GCCAGCAGCCTTACGAGATA
UNIF	TGTA ^{AAA} ACGACGGCCAGT
UNIR	CAGGAAACAGCTATGACC
11-13SR_KDM6A	GACAAACTTTCCAGCCACCC
11-13SF_KDM6A	AGTGTCTTCTAAAGCCCCAAA
15-16SF_KDM6A	TTTGGGTAAAATCACACATTCCT
15-16SR_KDM6A	GCTTTTGTCTAAAAATCTCCGTCA
18SF_KDM6A	CTGTTTTCCAAATAAATGTAC

Příloha 3: Seznam MLPA sond pro gen KMT2D

Délka (nt)	SALSA MLPA sonda	Chromozomální pozice reference KMT2D
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA	
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation	
100	X-fragment: Specific for the X chromosome	
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome	
136	Reference probe 05747-L05185	2p11
141	MLL2 probe 16358-L18751	Exon 4
148	MLL2 probe 16359-L18752	Exon 54
154	MLL2 probe 16360-L18753	Exon 10
160	MLL2 probe 16361-L18754	Exon 34
172	MLL2 probe 16362-L18755	Exon 19
178 Ж	MLL2 probe 16363-SP0358-L18756	Exon 54
184	MLL2 probe 16364-L18757	Exon 7
190	MLL2 probe 16365-L18758	Exon 47
196	Reference probe 10723-L11305	6p12
207	MLL2 probe 16366-L18759	Exon 39
213	MLL2 probe 16367-L18760	Exon 30
220	MLL2 probe 16368-L18761	Exon 14
228 Ж	MLL2 probe 16369-SP0359-L18762	Exon 51
234	Reference probe 11156-L16377	5q31
247	MLL2 probe 16370-L18763	Exon 26
255	MLL2 probe 16371-L18764	Exon 43
265	MLL2 probe 16372-L18765	Exon 33
272	MLL2 probe 16373-L18766	Exon 1
283	Reference probe 04404-L02610	14q22
290	MLL2 probe 16374-L18767	Exon 39
301	MLL2 probe 16375-L18768	Exon 11
310	Reference probe 09245-L09435	7q22
317	MLL2 probe 16377-L18770	Exon 22
328	Reference probe 10857-L11527	9p21
337 Ж	MLL2 probe 16378-SP0360-L18771	Exon 45
355	MLL2 probe 16380-L18773	Exon 54
364	MLL2 probe 16381-L18774	Exon 35
373	Reference probe 13585-L15042	1q23
400	MLL2 probe 16384-L18777	Exon 15
416	Reference probe 09070-L09239	19p13
424	MLL2 probe 16386-L18779	Exon 34
436	MLL2 probe 16387-L18780	Exon 49
448 Ж	MLL2 probe 16388-SP0362-L18781	Exon 31
454	MLL2 probe 16389-L18782	Exon 41
463	Reference probe 14308-L15978	15q13

Příloha 4: Seznam MLPA sond pro gen KDM6A

Délka (nt)	SALSA MLPA sonda	Chromozomální pozice	
		Reference	KDM6A
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA		
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation		
100	X-fragment: Specific for the X chromosome		
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome		
130	Reference probe 13917-L02320	Xq23	
142	KDM6A probe 19373-L25780		Exon 19
148	KDM6A probe 19374-L26405		Exon 6
154	KDM6A probe 19375-L25782		Exon 21
162	KDM6A probe 19376-L26504		Exon 17
166	Reference probe 07099-L26081	Xp22	
172	KDM6A probe 19377-L25784		Exon 25
177	KDM6A probe 19378-L25785		Exon 20
184	Reference probe 05592-L04518	Xq26	
190	KDM6A probe 19379-L25786		Exon 29
196	KDM6A probe 19380-L25787		Exon 27
203	KDM6A probe 19381-L25788		Exon 15
209	KDM6A probe 19382-L26082		Exon 1
220	KDM6A probe 19383-L25790		Exon 28
227	KDM6A probe 19384-L25791		Exon 16
233	KDM6A probe 19385-L25792		Exon 4
238	Reference probe 07051-L26083	Xq28	
244	KDM6A probe 19386-L26505		Exon 24
250	KDM6A probe 19387-L26506		Exon 7
256	KDM6A probe 19388-L25795		Exon 30
265	KDM6A probe 19389-L25796		Exon 10
274	KDM6A probe 19390-L25797		Exon 26
281	Reference probe 03902-L02553	Xq21	
292	KDM6A probe 19391-L25798		Exon 5
301	Reference probe 03652-L16233	Xp22	
310	KDM6A probe 19392-L25799		Exon 3
319	KDM6A probe 19393-L25800		Exon 9
328	Reference probe 15358-L17192	Xq22	
337	KDM6A probe 19394-L25801		Exon 18
346	KDM6A probe 19395-L25802		Exon 4
355	KDM6A probe 19396-L25803		Exon 11
364	KDM6A probe 19398-L25805		Exon 22
373	KDM6A probe 19399-L25806		Exon 8
383	Reference probe 06472-L05998	Xp22	
391	KDM6A probe 19400-L25807		Exon 2
400	KDM6A probe 19401-L25808		Exon 12
409	Reference probe 13752-L16654	Xp22	
418	KDM6A probe 19402-L25809		Exon 23
426	KDM6A probe 19548-L25804		Exon 13
436	KDM6A probe 19403-L25810		Exon 3
445	KDM6A probe 19404-L25811		Exon 19
454	Reference probe 14797-L16506	Xp21	

Příloha 5: Kabuki fenotypový dotazník ÚBLG FN Motol

KLINICKÝ DOTAZNÍK – KABUKI SYNDROM

	Přítomnost znaku	Poznámka
<i>Všeobecné znaky</i>		
Postnatální růstová retardace		
Mikrocefalie		
Neprospívání / poruchy příjmu potravy		
<i>Faciální znaky</i>		
Klenuté nadočnicové oblouky s prořidnutím laterální třetiny obočí		
Evertovaná dolní víčka		
Dlouhé oční štěrby		
Ptóza		
Strabismus		
Modré skléry		
Kolobom		
Velké dysplastické uši		
Široký kořen nosu		
Zploštělá špička nosu a krátká columella		
Ploché filtrum		
Abnormální dentice		
Oligodoncie		
Vysoké patro nebo rozštěp patra		
Malá mandibula		
Tenký horní a plný dolní ret		
Noduly na rtech		
<i>Anomálie končetin a skeletu</i>		
Brachy- nebo klinodaktýlie		
Hypoplastické prsty		
Hypoplastické nehty		
Perzistentní polštářky na prstech (fetal pads)		
Dysplázie kyčelních kloubů		
Kloubní laxicita		
Abnormality dermatoglyfů		
<i>Neurologické znaky</i>		
Mentální retardace		
Opožděný motorický vývoj		
Hypotonie		
Záchvaty / abnormální EEG		
<i>Viscerální anomálie</i>		
Vrozená srdeční vada		
Vrozená vada ledvin		
<i>Další znaky:</i>		
Imunitní dysfunkce		
Ztráta sluchu / chronická otitis media		
Abnormality testes (retence, skluzná testes)		
Předčasné telarché u děvčat		
Katarakta / nokturální lagophtalmos		
Autismus		

Barevně zvýrazněné znaky budou použity k výpočtu fenotypového skóre dle Makrythanasis et al (2013).

Příloha 6: Seznam genů NGS kitu Sure Select Focused Exome (Agilent)

A2M		2	AGMO	ALDH5A1	ANKS1A
A2M-AS1	ACADM	ADAMTSL	AGO1	ALDH6A1	ANKS1B
A2ML1	ACADS	3	AGO2	ALDH7A1	ANKS6
A4GALT	ACADSB	ADAMTSL	AGPAT2	ALDH8A1	ANO10
A4GNT	ACADVL	4	AGPS	ALDH9A1	ANO3
AAAS	ACAN	ADAR	AGRN	ALDOA	ANO5
AADAC	ACAT1	ADARB1	AGRP	ALDOB	ANO6
AADA2L2	ACAT2	ADCK3	AGT	ALG1	ANO7
AADA2L2	ACBD5	ADCK4	AGTR1	ALG11	ANTXR1
-AS1	ACBD6	ADCY10	AGTR2	ALG12	ANTXR2
AAGAB	ACCS	ADCY3	AGXT	ALG13	ANXA11
AANAT	ACE		AGXT2	ALG14	ANXA5
AARS	ACKR1	ADCY5	AHCY	ALG2	AOAH
AARS2	ACLY	ADCY6		ALG3	AOC1
AASS	ACO2	ADCY9	AHI1	ALG6	AOX1
ABAT	ACOX1	ADCYAP1	AHR	ALG8ALG	AP1S1
ABCA1	ACP2	ADD1	AHRR	9	AP1S2
ABCA10	ACP5	ADH1A	AHSG		AP2A1
ABCA12	ACSF3	ADH1B	AHSP	ALK	AP3B1
ABCA13	ACSL4	ADH1C	ACHE	ALLC	
ABCA2	ACSL5	ADH4	AICDA	ALMS1	AP3B2
ABCA3	ACSM2B	ADH5	AIF1	ALOX12	AP4B1
ABCA4	ACSM3	ADH6	AIFM1	ALOX12-	AP4B1-
ABCA7	ACTA1	ADH7	AIMP1	AS1	AS1
ABCB1	ACTA2	ADHFE1	AIP	ALOX12B	AP4E1
ABCB11	ACTA2-	ADIPOQ	AIPL1	ALOX15	AP4M1
ABCB4	AS1	ADIPOQ-	AIRE	ALOX5	AP4S1
ABCB5	ACTB	AS1	AK1	ALOX5AP	AP5Z1
ABCB6	ACTC1	ADIPOR1	AK2	ALOXE3	APAF1
ABCB7	ACTG1	ADIPOR2	AKAP10	ALPL	APBA2
ABCB8	ACTN2	ADK	AKAP13	ALS2	APBB1
ABCC1	ACTN3	ADM	AKAP2	ALS2CL	APBB3
ABCC10	ACTN4	ADNP	AKAP9	ALX1	APC
ABCC11	ACVR1	ADNP-AS1	AKR1B1	ALX3	APCDD1
ABCC12	ACVR1B	ADORA1	AKR1C2	ALX4	APEX1
ABCC2	ACVR1C	ADORA2A	AKR1C3	AMACR	APH1A
ABCC3	ACVR2B	ADORA2A	AKR1C4	AMD1	APH1B
ABCC4	ACVR2B-	-AS1	AKR1D1	AMELX	APLNR
ABCC5	AS1	ADORA3	AKR7A2	AMELY	APOA1
ABCC6	ACVRL1	ADRA1A	AKR7A3	AMER1	APOA2
ABCC8	ACY1	ADRA2A	AKT1	AMH	APOA4
ABCC9	ADA	ADRA2B	AKT2	AMHR2	APOA5
ABCD1	ADAM10	ADRA2C	AKT3	AMN	APOB
ABCD3	ADAM12	ADRB1	ALAD	AMPD1	APOBEC2
ABCD4	ADAM17	ADRB2	ALAS2	AMPD3	APOBEC3
ABCG1	ADAM19	ADRB3	ALB	AMT	B
ABCG2	ADAM33	ADRBK2	ALCAM	ANAPC16	APOBEC3
ABCG5	ADAM7	ADSL	ALDH16A	ANG	B-AS1
ABCG8	ADAM9	ADTRP	1	ANGPT1	APOBEC3
ABHD12	ADAMTSL1	AFF1	ALDH18A	ANGPT2	G
ABHD14A-	0	AFF2	1	ANGPTL3	APOBEC3
ACY1	ADAMTSL1	AFF3	ALDH1A1	ANGPTL4	H
ABHD5	3	AFG3L2	ALDH1A2	ANGPTL5	APOC1
ABI3BP	ADAMTSL1	AFP	ALDH1A3	ANK1	APOC2
ABL1	6	AGA	ALDH1B1	ANK2	APOC3
ABO	ADAMTSL1	AGBL1	ALDH2	ANK3	APOC4
ACACA	7	AGBL4	ALDH3A1	ANKH	APOC4-
ACACB	ADAMTSL1	AGER	ALDH3A2	ANKK1	APOC2
ACAD8	8	AGGF1	ALDH3B1	ANKRD1	APOD
ACAD9	ADAMTSL2	AGK	ALDH3B2	ANKRD11	APOE
ACADL	ADAMTSL	AGL	ALDH4A1	ANKRD26	APOF

APOH	ASB10	ATP6V1B1	BBS2	BMPER	C3
APOL1	ASCC1	-AS1	BBS4	BMPR1A	C3AR1
APOL3	ASCC3	ATP6V1G2	BBS5	BMPR1B	C4A
APOM	ASCL1	-DDX39B	BBS7	BMPR2	C4B
APOOL	ASH1L	ATP7A	BBS9	BNC2	C4B_2
APP	ASIC3	ATP7B	BCAM	BOLA3	C4BPA
APRT	ASIP	ATP8A2	BCAN	BPGM	C4orf26
APTX	ASL	ATP8B1	BCAP31	BPI	C5
AQP1	ASNS	ATPAF2	BCAT1	BPIFA1	C5AR2
AQP2	ASPA	ATR	BCAT2	BRAF	C5orf42
AQP3	ASPM	ATRNL1	BCKDHA	BRAP	C5orf66
AQP4	ASPN	ATRX	BCKDHB	BRAT1	C6
AQP4-AS1	ASPRV1	ATXN1	BCKDK	BRCA1	C6orf15
AQP5	ASPSCR1	ATXN10	BCL10	BRCA2	C7
AR	ASS1	ATXN2	BCL11A	BRCC3	C7orf69
ARAF	ASTE1	ATXN3	BCL11B	BRD1	C8A
ARC	ASTN2	ATXN3L	BCL2	BRIP1	C8B
AREL1	ASXL1	ATXN7	BCL2A1	BRSK2	C8G
ARF4	ASXL3	ATXN8OS	BCL2L11	BRWD1	C8orf37
ARFGEF2	ATCAY	AUH	BCL2L2	BRWD3	C8orf37-
ARG1	ATF1	AURKA	BCL2L2-	BSCL2	AS1
ARHGAP2	ATF3	AURKC	PABPN1	BSG	C9
4	ATF5	AUTS2	BCL3	BSND	C9orf139
ARHGAP2	ATF6	AVIL	BCL6	BST1	C9orf3
6	ATG16L1	AVP	BCL9	BTAF1	C9orf66
ARHGAP3	ATG7	AVPR1A	BCO1	BTBD9	C9orf72
1	ATG9B	AVPR1B	BCOR	BTC	CA1
ARHGAP6	ATIC	AVPR2	BCORL1	BTD	CA12
ARHGAP9	ATL1	AXDND1	BCR	BTK	CA2
ARHGDI	ATM	AXIN1	BCS1L	BTLA	CA4
ARHGDI	ATN1	AXIN2	BCYRN1	BTN1A1	CA5A
ARHGEF1	ATOH7	AXL	BDKRB2	BTN2A1	CA6
0	ATP10A	AZIN2	BDNF	BTNL2	CA8
ARHGEF1	ATP10D	B2M	BDNF-AS	BTRC	CABIN1
1	ATP13A2	B3GALNT	BDP1	BUB1B	CABP2
ARHGEF1	ATP13A4	1	BEAN1	C10orf105	CABP4
2	ATP13A4-	B3GALNT	BEST1	C10orf11	CACNA1A
ARHGEF2	AS1	2	BEX4	C10orf2	CACNA1C
8	ATP1A2	B3GALT6	BFSP1	C10orf32-	CACNA1C
ARHGEF6	ATP1A3	B3GAT3	BFSP2	ASMT	-AS1
ARHGEF7	ATP1B1	B3GNT2	BHLHA9	C10orf55	CACNA1C
ARHGEF9	ATP2A1	B3GNT3	BHLHE41	C12orf10	-AS2
ARID1A	ATP2A2	B4GALNT	BHMT	C12orf29	CACNA1D
ARID1B	ATP2A3	1	BCHE	C12orf57	CACNA1E
ARID2	ATP2B2	B4GALT1	BICC1	C12orf65	CACNA1F
ARID5A	ATP2B3	B4GALT1-	BICD1	C15orf65	CACNA1G
ARIH1	ATP2B4	AS1	BICD2	C16orf58	CACNA1G
ARL11	ATP2C1	B4GALT7	BIN1	C16orf93	-AS1
ARL13B	ATP5A1	B9D1	BIRC5	C17orf107	CACNA1H
ARL14EP	ATP5B	B9D2	BIVM-	C19orf12	CACNA1S
ARL2BP	ATP5C1	BAALC	ERCC5	C1GALT1	CACNA2D
ARL6	ATP5E	BAALC-	BLK	C1GALT1	1
ARL6IP5	ATP5G1	AS2	BLM	C1	CACNA2D
ARMC4	ATP5G2	BAAT	BLMH	C1orf145	3
ARMS2	ATP5G3	BACE1	BLNK	C1QA	CACNA2D
ARNT	ATP5I	BACE1-AS	BLOC1S3	C1QB	3-AS1
ARPC3	ATP5J	BAG3	BLOC1S6	C1QC	CACNA2D
ARSA	ATP5J2-	BAG6	BLVRA	C1QTNF3-	4
ARSB	PTCD1	BANF1	BM1	AMACR	CACNB2
ARSE	ATP5O	BANK1	BMP1	C1QTNF5	CACNB4
ARSF	ATP5S	BAP1	BMP10	C1R	CACNG2
ART3	ATP5SL	BARD1	BMP15	C1S	CADM1
ART4	ATP6AP2	BAX	BMP2	C2	CALCA
ARVCF	ATP6V0A1	BBIP1	BMP2K	C2-AS1	CALCR
ARX	ATP6V0A2	BBS1	BMP4	C21orf2	CALHM1
AS3MT	ATP6V0A4	BBS10	BMP5	C21orf59	CALM1
ASAH1	ATP6V1B1	BBS12	BMP7	C2orf71	CALM3
ASAH2					

CALR	CCDC28B	CD59	CENPO	CLDN16	COL14A1
CALR3	CCDC39	CD72	CENPP	CLDN19	COL17A1
CALU	CCDC40	CD79A	CEP120	CLDN23	COL18A1
CAMK1	CCDC50	CD79B	CEP135	CLEC11A	COL1A1
CAMK2G	CCDC6	CD81	CEP152	CLEC2D	COL1A2
CAMK4	CCDC65	CD81-AS1	CEP164	CLEC4M	COL25A1
CAMKK1	CCDC78	CD82	CEP290	CLEC7A	COL2A1
CAMKK2	CCDC8	CD86	CEP41	CLIC2	COL3A1
CAMP	CCDC86	CD8A	CEP57	CLIP1	COL4A1
CAMTA1	CCDC88C	CD96	CEP63	CLK2	COL4A2
CANT1	CCK	CDA	CEP68	CLMP	COL4A2- AS1
CAPN10	CCKAR	CDAN1	CEP85L	CLN3	COL4A3
CAPN13	CCKBR	CDC27	CEP89	CLN5	COL4A3B
CAPN3	CCL11	CDC42BP	CER1	CLN6	P
CAPN5	CCL13	B	CERKL	CLN8	COL4A4
CARD11	CCL17	CDC6	CERS1	CLNK	COL4A5
CARD14	CCL2	CDC73	CERS6	CLOCK	COL4A6
CARD8	CCL22	CDCA3	CES1	CLPP	COL5A1
CARD9	CCL26	CDCA7L	CES2	CLPS	COL5A2
CARS2	CCL5	CDH1	CETP	CLPTM1	COL6A1
CARTPT	CCL7	CDH12	CFAP53	CLRN1	COL6A2
CASC16	CCM2	CDH13	CFAP57	CLRN1- AS1	COL6A3
CASC5	CCNA2	CDH15	CFB	CLSTN2	COL6A4P2
CASK	CCND1	CDH22	CFD	CLTCL1	COL6A5
CASP1	CCNO	CDH23	CFH	CLU	COL7A1
CASP10	CCNT2	CDH3	CFHR1	CLUL1	COL8A2
CASP12	CCPG1	CDH5	CFHR2	CLYBL	COL9A1
CASP2	CCR1	CDH8	CFHR3	CMA1	COL9A2
CASP3	CCR2	CDHR1	CFHR4	CMPK1	COL9A3
CASP5	CCR3	CDK11A	CFHR5	CNBP	COLEC11
CASP8	CCR5	CDK11B	CFI	CNDP1	COLQ
CASP9	CCR6	CDK16	CFL2	CNGA1	COMMD1
CASP2	CCR7	CDK18	CFLAR	CNGA3	COMMD3- BMI1
CASR	CCRL2	CDK19	CFLAR- AS1	CNGB1	COMP
CAST	CCT5	CDK4	CFP	CNGB3	COMT
CAT	CD109	CDK5R1	CFTR	CNKSR1	COPA
CATIP- AS2	CD14	CDK5RAP 2	CGA	CNKSR2	COQ2
CATSPER1	CD151	CDK5RAP 3	CGREF1	CNNM2	COQ3
CATSPER2	CD177	CDK5RAP 3	CCHCR1	CNNM4	COQ4
CATSPER3	CD19	CDK7	CIAPIN1	CNOT3	COQ5
CATSPER4	CD1A	CDK11A	CIB2	CNOT4	COQ6
CAV1	CD1E	CDKL3	CIC	CNPY3	COQ7
CAV3	CD207	CDKL5	CIDEA	CNR1	COQ9
CBFB	CD209	CDKN1A	CIDEC	CNR2	CORIN
CBL	CD22	CDKN1B	CIITA	CNTF	CORO1A
CBLB	CD226	CDKN1C	CILP	CNTN1	COX10
CBR1	CD24	CDKN2A	CIRH1A	CNTN4	COX14
CBR3	CD244	CDKN2B	CISD2	CNTN4- AS1	COX15
CBR3-AS1	CD247	CDKN2B- AS1	CISH	CNTN6	COX20
CBS	CD27	CDKN2C	CITED2	CNTNAP2	COX411
CBX2	CD27-AS1	CDON	CIZ1	CNTNAP4	COX412
CBX4	CD2AP	CDR1	CKM	CNTNAP5	COX5A
CC2D1A	CD320	CDS1	CLASP1	COA5	COX5B
CC2D2A	CD36	CDSN	CLCA1	COASY	COX6A1
CCBE1	CD38	CDT1	CLCA2	COG1	COX6B1
CCDC103	CD3D	CEACAM1	CLCC1	COG4	COX6C
CCDC114	CD3E	6	CLCF1	COG5	COX7A1
CCDC12	CD3EAP	CEACAM5	CLCN1	COG6	COX7A2
CCDC14	CD3G	CEBPA	CLCN2	COG7	COX7B
CCDC140	CD4	CEBPE	CLCN4	COG8	COX7B2
CCDC152	CD40	CECR1	CLCN5	COCH	COX7C
CCDC170	CD40LG	CEL	CLCN7	COL10A1	COX8A
CCDC176	CD44	CELF4	CLCNKA	COL11A1	COX8C
CCDC183- AS1	CD46	CELSR1	CLCNKB	COL11A2	CP
CCDC22	CD5	CEMIP	CLDN1	COL12A1	CPA4
	CD55	CENPJ	CLDN14		
	CD58				

CPA6	CSTA	CYP2A13	DCLRE1C	DHRS9	DNAH8
CPB2	CSTB	CYP2A7	DCN	DHTKD1	DNAH9
CPB2-AS1	CSTF2	CYP2B6	DCP1B	DHX16	DNAI1
CPE	CSTF2T	CYP2C18	DCTD	DHX36	DNAI2
CPLX2	CTC1	CYP2C19	DCTN1	DHX37	DNAJA4
CPN1	CTCF	CYP2C8	DCTN1-	DHX9	DNAJB2
CPNE1	CTDP1	CYP2C9	AS1	DCHS1	DNAJB6
CPO	CTF1	CYP2D6	DCX	DCHS2	DNAJC19
CPOX	CTGF	CYP2E1	DCXR	DIABLO	DNAJC5
CPS1	CTH	CYP2F1	DDAH1	DIAPH1	DNAJC6
CPT1A	CTHRC1	CYP2G1P	DDAH2	DIAPH2	DNAJC9-
CPT1B	CTLA4	CYP2J2	DDB1	DIAPH3	AS1
CPT2	CTNNA3	CYP2R1	DDB2	DIAPH3-	DNAL1
CPZ	CTNNB1	CYP2S1	DDC	AS1	DNASE1
CR1	CTNND1	CYP2U1	DDC-AS1	DICER1	DNASE1L
CR2	CTNND2	CYP2W1	DDHD1	DIO1	1
CRADD	CTNS	CYP3A1	DDHD2	DIO2	DNASE1L
CRAT	CTPS2	CYP3A4	DDI2	DIP2A	3
CRB1	CTRC	CYP3A43	DDIT3	DIP2B	DNASE2
CRBN	CTSA	CYP3A5	DDO	DIP2C	DND1
CREB1	CTSB	CYP3A7	DDOST	DIRC2	DNM1
CREB3L3	CTSC	CYP46A1	DDR1	DIS3L2	DNM1L
CREBBP	CTSD	CYP4A11	DDR2	DISC1	DNM2
CRELD1	CTSG	CYP4A22	DDX20	DISP1	DNMT1
CRH	CTSK	CYP4B1	DDX25	DKC1	DNMT3A
CRHR1	CTSZ	CYP4F11	DDX39B	DKK1	DNMT3B
CRIM1	CTTNBP2	CYP4F12	DDX3Y	DKK2	DNMT3L
CRISP2	CUBN	CYP4F2	DDX5	DKK3	DOC2A
CRK	CUL3	CYP4F22	DDX53	DLAT	DOCK3
CRKL	CUL4B	CYP4F3	DDX58	DLC1	DOCK4
CRLF1	CUL5	CYP4F8	DDX59	DLD	DOCK4-
CRP	CUL7	CYP4V2	DEAF1	DLEC1	AS1
CRTAP	CUX2	CYP4Z1	DEC1	DLEU2	DOCK6
CRX	CX3CR1	CYP51A1	DECR1	DLG1	DOCK7
CRYAA	CXCL10	CYP7A1	DEFB1	DLG3	DOCK8
CRYAB	CXCL11	CYP7B1	DEFB126	DLG3-AS1	DOCK9
CRYBA1	CXCL12	CYP8B1	DES	DLG4	DOK1
CRYBA4	CXCL16	CYSLTR1	DFNA5	DLG5	DOK7
CRYBB1	CXCL5	CYSLTR2	DFNB31	DLGAP2	DOLK
CRYBB2	CXCL8	D2HGDH	DFNB59	DLGAP2-	DPAGT1
CRYBB3	CXCR1	DAAM2	DGAT1	AS1	DPEP1
CRYGB	CXCR3	DAB2	DGCR14	DLGAP3	DPM1
CRYGC	CXCR4	DACT1	DGCR2	DLL1	DPM2
CRYGD	CYB5A	DACT3-	DGCR5	DLL3	DPM3
CRYGS	CYB5R3	AS1	DGCR6	DLST	DPP10
CRYL1	CYBA	DAG1	DGCR8	DLX2	DPP6
CRYM	CYBB	DALRD3	DGKD	DLX3	DPY19L2
CSDE1	CYBRD1	DAO	DGKE	DLX5	DPYD
CSF1	CYC1	DAOA	DGKK	DLX6	DPYD-AS1
CSF1R	CYCS	DAOA-	DGUOK	DLX6-AS1	DPYS
CSF2	CYGB	AS1	DGUOK-	DMBT1	DPYSL2
CSF2RB	CYLD	DAPK1	AS1	DMC1	DRC1
CSF3R	CYP11A1	DARS	DHCR24	DMD	DRD1
CSGALNA	CYP11B1	DARS-AS1	DHCR7	DMGDH	DRD2
CT1	CYP11B2	DARS2	DHDDS	DMP1	DRD3
CSMD1	CYP17A1	DAZL	DHFR	DMPK	DRD4
CSMD3	CYP19A1	DBH	DHH	DMRT1	DRD5
CSNK1A1	CYP1A1	DBH-AS1	DHODH	DMRT2	DRG1
L	CYP1A2	DBI	DHRS1	DMTF1	DROSHA
CSNK1D	CYP1B1	DBT	DHRS2	DMXL1	DRP2
CSNK1E	CYP21A2	DCAF13	DHRS3	DNA2	DSC2
CSNK2A2	CYP24A1	DCAF17	DHRS4-	DNAAF1	DSC3
CSNK2A3	CYP26A1	DCBLD1	AS1	DNAAF2	DSCAM
CSPP1	CYP26B1	DCC	DHRS4L1	DNAAF3	DSCAS
CSR3	CYP26C1	DCDC2	DHRS4L2	DNAH11	DSCR8
CST3	CYP27A1	DCK	DHRS7	DNAH2	DSE
CST6	CYP27B1	DCLK1	DHRS7C	DNAH5	DSG1

DSG1-AS1	EGFR	EPHX1	F2RL1	FBP2	FKRP
DSG2	EGFR-AS1	EPHX2	F3	FBXL4	FKTN
DSG2-AS1	EGLN1	EPM2A	F5	FBXL6	FLCN
DSG4	EGLN2	EPO	F7	FBXO10	FLG
DSP	EGR2	EPOR	F8	FBXO18	FLG-AS1
DSPP	EGR3	EPPK1	F9	FBXO38	FLI1
DST	EHD2	EPX	FA2H	FBXO7	FLNA
DSTYK	EHHADH	ERAP1	FAAH	FBXW11	FLNB
DTD1	EHMT1	ERAP2	FAAH2	FBXW4	FLNC
DTHD1	EHMT2	ERBB2	FABP1	FBXW7	FLRT3
DTNA	ECHS1	ERBB3	FABP2	FCAR	FLT1
DTNBP1	EIF2AK3	ERBB4	FABP3	FCER1A	FLT3
DUOX1	EIF2AK4	ERCC1	FABP4	FCER2	FLT4
DUOX2	EIF2B1	ERCC2	FABP6	FCGR2A	FLVCR1
DUOXA1	EIF2B2	ERCC3	FABP7	FCGR2B	FLVCR2
DUOXA2	EIF2B3	ERCC4	FADD	FCGR3A	FMN1
DUS2	EIF2B4	ERCC5	FADS1	FCGR3B	FMN2
DUSP22	EIF2B5	ERCC6	FADS2	FCGRT	FMO1
DUSP23	EIF2S2	ERCC6-	FAH	FCN1	FMO2
DUSP6	EIF2S3	PGBD3	FAM104A	FCN2	FMO3
DXO	EIF3H	ERCC8	FAM111A	FCN3	FMO4
DYM	EIF4E	ERF	FAM111B	FCRL3	FMO5
DYNC1H1	EIF4G1	ERI2	FAM120A	FDFT1	FMO6P
DYNC2H1	EIF4G3	ERLIN2	FAM120A	FDX1L	FMR1
DYRK1A	ELAC2	ERMAP	OS	FECH	FMR1-AS1
DYSF	ELANE	ESAM	FAM126A	FEN1	FN1
DYX1C1	ELAVL2	ESCO2	FAM134B	FERMT1	FN3K
DYX1C1-	ELF4	ESPN	FAM161A	FERMT3	FNIP1
CCPG1	ELK1	ESR1	FAM161B	FES	FNTB
EARS2	ELL	ESR2	FAM175A	FEV	FOLH1
EBAG9	ELN	ESRRB	FAM189A2	FEZ1	FOLR1
EBP	ELOVL4	ESRRG	FAM205A	FEZF2	FOXA1
ECE1	ELP2	ETFA	FAM20A	FFAR1	FOXA2
ECEL1	ELP4	ETFB	FAM20C	FFAR4	FOXA3
ECI1	EMC1	ETFDH	FAM213B	FGA	FOXC1
ECM1	EMC4	ETHE1	FAM228B	FGB	FOXC2
ECM2	EMD	ETNPPL	FAM58A	FGD1	FOXC2-
ECSIT	EME1	ETS1	FAM69A	FGD3	AS1
EDA	EMG1	ETV1	FAM83H	FGD4	FOXD3
EDA2R	EMX2	ETV6	FAM8A1	FGF1	FOXD3-
EDAR	EMX2OS	EVC	FAM91A1	FGF10	AS1
EDARADD	EN2	EVC2	FAN1	FGF14	FOXE1
EDN1	ENAM	EVI5	FANCA	FGF17	FOXE3
EDN2	ENG	EWSR1	FANCB	FGF2	FOXF1
EDN3	ENO1	EXO1	FANCC	FGF20	FOXF2
EDNRA	ENO3	EXO5	FANCD2	FGF23	FOXG1
EDNRB	ENOSF1	EXOC2	FANCD2O	FGF3	FOXH1
EDNRB-	ENPP1	EXOC4	S	FGF8	FOXI1
AS1	ENSA	EXOSC3	FANCE	FGF9	FOXL2
EDRF1	ENTPD1	EXOSC5	FANCF	FGFBP1	FOXN1
EDRF1-	ENTPD1-	EXPH5	FANCG	FGFR1	FOXN2
AS1	AS1	EXT1	FANCI	FGFR2	FOXO1
EEF1A2	EOMES	EXT2	FANCL	FGFR3	FOXO4
EEF1B2	EP300	EXTL3	FANCM	FGFR4	FOXP1
EEF2	EPAS1	EYA1	FARS2	FGFRL1	FOXP2
EEF2K	EPB41	EYA4	FAS	FGG	FOXP3
EFCAB5	EPB41L1	EYS	FASLG	FH	FOXRED1
EFEMP1	EPB42	EZH1	FASN	FHL1	FPGS
EFEMP2	EPC2	EZH2	FASTKD2	FHL2	FPGT-
EFHC1	EPCAM	F10	FAT4	FIG4	TNNI3K
EFHC2	EPG5	F11	FBLIM1	FIGLA	FPR1
EFNA4	EPHA2	F11-AS1	FBLN1	FIP1L1	FPR2
EFNB1	EPHA3	F12	FBLN5	FKBP10	FRA10AC1
EFR3A	EPHA5	F13A1	FBN1	FKBP14	FRAS1
EFTUD2	EPHA7	F13B	FBN2	FKBP5	FREM1
EGF	EPHB2	F2	FBN3	FKBP6	FREM2
EGFL7	EPHB6	F2R	FBP1	FKBPL	FREM3

FRG1	GABRR2	GFI1B	GMPS	GPX6	GTF2IRD1
FRK	GAD1	GFM1	GNA14	GRB10	GUCA1A
FRMD6	GAD2	GFPT1	GNAI2	GRB14	GUCA1B
FRMD7	GADD45B	GFPT2	GNAI3	GREM1	GUCY2C
FRMPD4	GAK	GFRA1	GNAL	GRHL2	GUCY2D
FRY	GAL3ST3	GGA3	GNAO1	GRHL3	GUSB
FRZB	GALC	GGACT	GNAQ	GRHPR	GYG1
FSBP	GALE	GGCX	GNAS	GRIA1	GYG2
FSCB	GALK1	GGH	GNAS-AS1	GRIA3	GYLTL1B
FSCN2	GALNS	GGT5	GNAT1	GRID1	GYP A
FSHB	GALNT12	GH2	GNAT2	GRID1-	GYPB
FSHR	GALNT18	GHR	GNB1L	AS1	GYP C
FTCD	GALNT2	GHRH	GNB3	GRID2	GYPE
FTH1	GALNT3	GHRHR	GNB4	GRIK1	GYS1
FTHL17	GALNT9	GHRL	GNB5	GRIK2	GYS2
FTL	GALNTL5	GHRLOS	GNE	GRIK3	GZMB
FTO	GALP	GHSR	GNMT	GRIK4	H19
FTSJ1	GALT	GCH1	GNPAT	GRIK5	H2BFWT
FUBP1	GAMT	GIF	GNPTAB	GRIN1	H6PD
FUCA1	GAN	GIGYF2	GNPTG	GRIN2A	HABP2
FUCA2	GAP43	GIMAP8	GNRH1	GRIN2B	HACE1
FURIN	GAR1	GIP	GNRHR	GRIN3A	HACL1
FUS	GARS	GIPC3	GNS	GRIP1	HADH
FUT1	GAS1	GIPR	GOLGA3	GRK1	HADHA
FUT2	GAS2L2	GIT1	GOLGA5	GRK4	HADHB
FUT3	GAS6	GJA1	GON4L	GRK5	HAGH
FUT6	GAS6-AS1	GJA3	GOPC	GRM1	HAL
FUT7	GATA1	GJA4	GORAB	GRM3	HAMP
FUT8	GATA2	GJA5	GOSR2	GRM5	HAND1
FUZ	GATA3	GJA8	GOT1	GRM5-AS1	HAND2
FXN	GATA4	GJB1	GP1BA	GRM6	HARS
FXR2	GATA6	GJB2	GP1BB	GRM7	HARS2
FXYD2	GATAD1	GJB3	GP2	GRM8	HAS1
FXYD6	GATAD2B	GJB4	GP6	GRN	HAVCR1
FXYD6-	GATM	GJB6	GP9	GRPR	HAX1
FXYD2	GBA	GJC2	GPAM	GRXCR1	HBA1
FYCO1	GBA2	GJC3	GPANK1	GSC	HBA2
FZD1	GBA3	GJD2	GPATCH8	GSDMA	HBB
FZD3	GBE1	GK	GPBAR1	GSDMB	HBD
FZD4	GBGT1	GK2	GPC3	GSE1	HBE1
FZD6	GC	GLA	GPC4	GSK3B	HBEGF
FZD9	GCDH	GLB1	GPC6	GSN	HBM
G6PC	GCGR	GLCCI1	GPC6-AS2	GSN-AS1	HBQ1
G6PC2	GCK	GLDC	GPD1	GSPT1	HBS1L
G6PC3	GCKR	GLE1	GPD1L	GSPT2	HBZ
G6PD	GCLC	GLI1	GPD2	GSR	HCCS
GAA	GCLM	GLI2	GPHN	GSS	HCFC1
GAB2	GCM2	GLI3	GPI	GSTA1	HCK
GABBR1	GCNT2	GLIS2	GPIHBP1	GSTA2	HCLS1
GABPA	GCOM1	GLIS3	GPR1	GSTA3	HCN1
GABRA1	GCSH	GLIS3-AS1	GPR12	GSTA4	HCN2
GABRA2	GDA	GLMN	GPR139	GSTA5	HCN4
GABRA3	GDAP1	GLO1	GPR143	GSTK1	HCP5
GABRA4	GDF1	GLP1R	GPR179	GSTM1	HCRT
GABRA5	GDF15	GLRA1	GPR33	GSTM2	HCRTR1
GABRA6	GDF3	GLRB	GPR55	GSTM3	HCRTR2
GABRB1	GDF5	GLRX5	GPR68	GSTM4	HDAC4
GABRB2	GDF6	GLS	GPRIN2	GSTM5	HDAC8
GABRB3	GDF9	GLTSCR1	GPS1	GSTO1	HDAC9
GABRD	GDII	GLUD1	GPSM2	GSTO2	HDC
GABRE	GDNF	GLUD2	GPSM3	GSTP1	HDLBP
GABRG1	GEMIN2	GLUL	GPT	GSTT1	HDX
GABRG2	GEMIN4	GLYCTK	GPX1	GSTZ1	HELQ
GABRG3	GEN1	GM2A	GPX2	GTF2E1	HEPACAM
GABRP	GFAP	GMIP	GPX3	GTF2H1	HERC2
GABRQ	GFER	GMPPA	GPX4	GTF2H5	HES6
GABRR1	GFI1	GMPPB	GPX5	GTF2I	HES7

HESX1	HNF4A-	HSD17B14	CPT1B	IFNAR2	IL2RG
HEXA	AS1	HSD17B2	CHL1	IFNG	IL3
HEXB	HNMT	HSD17B3	CHL1-AS1	IFNGR1	IL31RA
HEY1	HNRNPA0	HSD17B4	CHM	IFNGR2	IL36RN
HFE	HNRNPA1	HSD3B1	CHMP1A	IFRD1	IL4
HFE2	HNRNPA1	HSD3B2	CHMP2B	IFT122	IL4I1
HGD	P10	HSD3B7	CHMP4B	IFT140	IL4R
HGF	HNRNPA2	HSF4	CHN1	IFT172	IL5
HGSNAT	B1	HSP90AA1	CHPT1	IFT43	IL6
HHAT	HNRNPD	HSP90B1	CHRDL1	IFT80	IL6R
HHEX	HNRNPD	HSPA1A	CHRM1	IGBP1	IL7
HHIP	HNRNPH1	HSPA1B	CHRM2	IGF1	IL7R
HIBCH	HNRNPH2	HSPA1L	CHRM3	IGF1R	IL9
HIF1A	HNRNPH3	HSPA5	CHRNA1	IGF2	ILDR1
HIF1A-	HNRNPU	HSPA8	CHRNA2	IGF2R	ILF3
AS1	HNRNPU-	HSPA9	CHRNA3	IGFALS	ILK
HIF1AN	AS1	HSPB1	CHRNA4	IGFBP1	IMMP2L
HIGD2A	HNRNPUL	HSPB3	CHRNA5	IGFBP3	IMMT
HIGD2B	1	HSPB6	CHRNA7	IGFBP5	IMPA2
HINT1	HNRNPUL	HSPB7	CHRNA9	IGFBP7	IMPAD1
HIP1	2-BSCL2	HSPB8	CHRN1	IGFBP7-	IMPDH1
HIRA	HOGA1	HSPD1	CHRN2	AS1	IMPDH2
HIST1H2A	HOMER1	HSPG2	CHRN4	IGHMBP2	IMPG1
E	HOMER2	HTN3	CHRN1	IGLL1	IMPG2
HIST1H4B	HOOK1	HTR1A	CHRNE	IGSF1	INF2
HIST3H3	HOXA1	HTR1B	CHRNA	IHH	ING1
HIVEP2	HOXA10	HTR2A	CHST1	IKBIP	INHA
HK1	HOXA10-	HTR2B	CHST10	IKBKAP	INMT
HK2	AS	HTR2C	CHST11	IKBKB	INMT-
HLA-A	HOXA11	HTR3A	CHST12	IKBKG	FAM188B
HLA-B	HOXA13	HTR3B	CHST13	IKZF1	INPP4A
HLA-C	HOXA2	HTR3C	CHST14	IL10	INPP5E
HLA-DMB	HOXA4	HTR3E	CHST2	IL10RA	INS
HLA-DOA	HOXB-	HTR5A	CHST3	IL10RB	INS-IGF2
HLA-DPA1	AS3	HTR5A-	CHST5	IL11RA	INSIG1
HLA-DPB1	HOXB1	AS1	CHST6	IL12A	INSIG2
HLA-DPB2	HOXB13	HTR6	CHST7	IL12A-AS1	INSL3
HLA-	HOXB6	HTR7	CHST8	IL12B	INSL6
DQA1	HOXC13	HTRA1	CHST9	IL12RB1	INSR
HLA-	HOXC13-	HTRA2	CHSY1	IL12RB2	INSRR
DQB1	AS	HTT	CHUK	IL13	INVS
HLA-DRA	HOXD10	HUS1B	CHURC1-	IL16	IPCEF1
HLA-	HOXD13	HUWE1	FNTB	IL17A	IPP
DRB1	HOXD4	HVCN1	IAPP	IL17F	IQCB1
HLA-	HP	HYAL1	IARS2	IL17RA	IQCG
DRB5	HPD	HYDIN	IBA57	IL17RB	IQGAP1
HLA-E	HPGD	HYKK	IBSP	IL17RD	IQGAP2
HLA-G	HPRT1	HYLS1	ICAM1	IL17REL	IQGAP3
HLCS	HPS1	CHAT	ICAM4	IL18	IQSEC2
HLX	HPS3	CHD1L	ICAM5	IL18R1	IRAK1
HLX-AS1	HPS4	CHD2	ICK	IL18RAP	IRAK3
HMBS	HPS5	CHD3	ICOS	IL19	IRAK4
HMCN1	HPS6	CHD6	ID3	IL1A	IRF1
HMGA1	HPSE2	CHD7	IDE	IL1B	IRF2
HMGA2	HR	CHD8	IDH1	IL1R1	IRF4
HMGCL	HRAS	CHDH	IDH2	IL1RAPL1	IRF5
HMGCR	HRC	CHEK1	IDH3B	IL1RL1	IRF6
HMGCS2	HRG	CHEK2	IDO1	IL1RN	IRF7
HMHA1	HRH2	CHFR	IDS	IL2	IRF8
HMOX1	HRH3	CHGA	IDUA	IL20RA	IRGM
HMOX2	HS1BP3	CHGB	IER3IP1	IL20RB	IRS1
HMSD	HS6ST1	CHI3L1	IFI30	IL21	IRS2
HMX1	HSD11B1	CHI3L2	IFI44L	IL21-AS1	IRS4
HMX2	HSD11B2	CHIA	IFIH1	IL21R	IRX4
HNF1A	HSD17B1	CHIT1	IFITM5	IL21R-AS1	IRX5
HNF1B	HSD17B10	CHKB	IFNA2	IL23R	ISCU
HNF4A	HSD17B11	CHKB-	IFNAR1	IL2RA	ISL1

ISPD	KCNH2	KIF21A	KRT37	LFNG	LRBA
ISPD-AS1	KCNIP1	KIF22	KRT38	LGALS12	LRFN5
ISYNA1	KCNIP4	KIF2A	KRT4	LGALS13	LRCH1
ITGA11	KCNJ1	KIF4A	KRT5	LGALS2	LRIT3
ITGA2	KCNJ10	KIF5A	KRT6A	LGALS3	LRP1
ITGA2B	KCNJ11	KIF5B	KRT6C	LG11	LRP2
ITGA3	KCNJ12	KIF5C	KRT74	LHCGR	LRP4
ITGA4	KCNJ13	KIF6	KRT75	LHFPL5	LRP4-AS1
ITGA6	KCNJ15	KIF7	KRT8	LHX1	LRP5
ITGA7	KCNJ16	KIFAP3	KRT81	LHX3	LRP6
ITGA8	KCNJ18	KIR2DL3	KRT83	LHX4	LRP8
ITGA9	KCNJ2	KIR2DL4	KRT85	LHX8	LRPAP1
ITGA9-AS1	KCNJ3	KIR3DL1	KRT86	LHX9	LRPPRC
ITGAE	KCNJ5	KIR3DL2	KRT9	LIAS	LRRC4
ITGAM	KCNJ6	KIRREL3	KRTAP1-1	LIF	LRRC6
ITGB2	KCNJ8	KISS1	KRTCAP3	LIFR	LRRC8A
ITGB3	KCNJ9	KISS1R	KYNU	LIG1	LRRK1
ITGB4	KCNK18	KIT	L1CAM	LIG3	LRRK2
ITCH	KCNK3	KITLG	L2HGDH	LIG4	LRSAM1
ITIH1	KCNK6	KL	L3MBTL1	LILRA3	LRTOMT
ITIH3	KCNK9	KLB	LACTB	LILRB2	LSS
ITIH4	KCNMA1	KLC1	LAD1	LIM2	LTA
ITIH4-AS1	KCNMA1-AS1	KLF1	LAMA1	LIMK1	LTBP1
ITIH6	KCNMB1	KLF10	LAMA2	LIN28A	LTBP2
ITK	KCNMB3	KLF11	LAMA3	LIN28B	LTBP3
ITM2B	KCNN3	KLF5	LAMA4	LINC00609	LTBP4
ITPA	KCNQ1	KLF6	LAMA5	LINC01237	LTBR
ITPKC	KCNQ10T	KLF7	LAMA5-AS1	LINS	LTC4S
ITPR1	1	KLF8	LAMB1	LIPA	LTF
ITPR3	KCNQ2	KLHDC8B	LAMB2	LIPC	LTN1
ITSN2	KCNQ3	KLHL1	LAMB3	LIPE	LTN1
IVD	KCNQ4	KLHL10	LAMC1	LIPE-AS1	LUM
IYD	KCNS1	KLHL3	LAMC2	LIPG	LURAP1L-AS1
JAG1	KCNS3	KLHL40	LAMC3	LIPH	LY6E
JAG2	KCNT1	KLHL41	LAMP2	LIPI	LY96
JAK1	KCNV2	KLHL6	LAMP2	LIPN	LY96
JAK2	KCTD13	KLHL7	LAMTOR2	LIPT1	LYL1
JAK3	KCTD7	KLHL9	LARGE	LITAF	LYN
JAM3	KDM4C	KLK1	LARP7	LLGL1	LYRM4
JMJD1C	KDM5A	KLK12	LARS	LMAN1	LYST
JMJD1C-AS1	KDM5C	KLK15	LARS2	LMBR1	LYZ
JPH2	KDM5D	KLK3	LARS2-AS1	LMBRD1	LZTFL1
JPH3	KDM6A	KLK4	LBP	LMF1	LZTS1
JRK	KDM6B	KLK7	LBR	LMF1-AS1	MACROD2
JUN	KDR	KLKB1	LCA5	LMNA	MAD1L1
JUP	KEL	KLLN	LCAT	LMNB1	MAD2L1
KAAG1	KERA	KLRC4-	LCE3B	LMNB2	MADD
KALRN	KHDC3L	KLRK1	LCE3C	LMTK3	MAF
KANK1	KHK	KLRK1	LCE3C	LMX1B	MAFB
KANSL1	KIAA0100	KMT2A	LCE5A	LNX2	MAG
KARS	KIAA0196	KMT2C	LCK	LOR	MAGEE2
KAT6B	KIAA0226	KMT2D	LCN10	LOX	MAGEL2
KATNAL2	KIAA0232	KMT2E	LCT	LOXHD1	MAGI1
KBTBD13	KIAA0319	KNG1	LDB3	LOXL1	MAGI2
KCNA1	KIAA0513	KPNA1	LDHA	LOXL1-AS1	MAGI2-AS3
KCNA3	KIAA1033	KPTN	LDHB	LOXL2	MAGT1
KCNA5	KIAA1462	KRAS	LDLR	LOXL3	MAK
KCNAB2	KIAA1549	KRIT1	LDLRAD2	LPA	MAK16
KCNC3	KIAA1614	KRT1	LDLRAD4	LPAR1	MALT1
KCND2	KIAA2022	KRT10	LDLRAP1	LPAR6	MAMLD1
KCND3	KIF11	KRT12	LEF1	LPIN1	MAN1A2
KCNE1	KIF17	KRT13	LEF1-AS1	LPIN2	MAN1B1
KCNE2	KIF18A	KRT14	LEFTY2	LPIN3	MAN2B1
KCNE3	KIF1A	KRT18	LEMD3	LPL	MANBA
KCNE4	KIF1B	KRT2	LEP	LPP	MAOA
	KIF1C	KRT3	LEPR	LRAT	MAOB
		KRT31	LETM1		

MAP2	MED13L	MIR548F5	MPZ	MRPS27	MUC5B
MAP2K1	MED17	MIR548H2	MR1	MRPS28	MUC6
MAP2K2	MED23	MIR548I4	MRAP	MRPS30	MUC7
MAP2K3	MED25	MIR548N	MRE11A	MRPS31	MUM1
MAP2K4	MEF2A	MIR548T	MROH8	MRPS33	MURC
MAP3K1	MEF2B	MIR548W	MRPL1	MRPS34	MUS81
MAP3K13	MEF2BNB	MIR5694	MRPL10	MRPS35	MUSK
MAP3K15	-MEF2B	MIR7851	MRPL11	MRPS36	MUT
MAP3K8	MEF2C	MITF	MRPL12	MRPS5	MUTYH
MAP4K2	MEF2D	MKKS	MRPL13	MRPS6	MVK
MAP4K5	MEFV	MKL1	MRPL14	MRPS7	MX1
MAP6	MEGF10	MKRN3	MRPL15	MRPS9	MYB
MAP7D3	MEGF11	MKS1	MRPL16	MRRF	MYBL2
MAPK1	MEIS1	MLC1	MRPL17	MS4A1	MYBPC1
MAPK10	MEIS2	MLF1	MRPL18	MS4A12	MYBPC3
MAPK13	MEN1	MLH1	MRPL19	MS4A2	MYC
MAPK8IP1	MEOX1	MLH3	MRPL2	MS4A3	MYCL
MAPT	MEP1B	MLLT1	MRPL20	MS4A6A	MYCN
MARS	MERTK	MLLT10	MRPL21	MS4A6E	MYD88
MARS2	MESDC2	MLLT3	MRPL22	MSH2	MYEF2
MARVEL	MESP2	MLPH	MRPL23	MSH3	MYF6
D2	MEST	MLX	MRPL24	MSH4	MYH11
MASP1	MET	MLXIPL	MRPL27	MSH5	MYH13
MASP2	METTL8	MLYCD	MRPL28	MSH5-	MYH14
MAST4	MFF	MMAA	MRPL3	SAPCD1	MYH15
MASTL	MFGE8	MMAB	MRPL32	MSH6	MYH2
MAT1A	MF12	MMADHC	MRPL34	MSMB	MYH3
MATN3	MF12-AS1	MMACHC	MRPL35	MSMO1	MYH6
MATR3	MFN2	MME	MRPL36	MSR1	MYH7
MAVS	MFRP	MMEL1	MRPL37	MSRA	MYH7B
MAX	MFSD2A	MMP1	MRPL38	MSRB3	MYH8
MBD1	MFSD8	MMP10	MRPL39	MST1R	MYH9
MBD3	MGAT1	MMP12	MRPL4	MSTN	MYHAS
MBD4	MGAT2	MMP13	MRPL40	MSX1	MYL2
MBD5	MGAT4C	MMP14	MRPL41	MSX2	MYL3
MBL2	MGEA5	MMP2	MRPL42	MT1A	MYLIP
MBNL1	MGLL	MMP20	MRPL43	MT2A	MYLK
MBTPS2	MGME1	MMP3	MRPL44	MT3	MYLK-
MC1R	MGMT	MMP7	MRPL45	MTAP	AS1
MC2R	MGP	MMP8	MRPL46	MTF1	MYLK2
MC3R	MGST1	MMP9	MRPL47	MTFMT	MYO15A
MC4R	MGST2	MN1	MRPL48	MTHFD1	MYO18B
MCCC1	MGST3	MNS1	MRPL49	MTHFD1L	MYO1A
MCCC2	MCHR1	MNX1	MRPL50	MTHFR	MYO1C
MCEE	MIA3	MOCOS	MRPL51	MTHFS	MYO1E
MCF2	MIAT	MOCOS1	MRPL52	MTCH2	MYO1F
MCF2L2	MIATNB	MOCOS2	MRPL53	MTM1	MYO1G
MCFD2	MIB1	MOG	MRPL54	MTMR14	MYO3A
MCL1	MICA	MOGAT2	MRPL55	MTMR2	MYO5A
MCM3AP	MICB	MOGS	MRPL9	MTMR9	MYO5B
MCM3AP-	MID1	MOK	MRPS10	MTNR1A	MYO6
AS1	MIF	MPC1	MRPS11	MTNR1B	MYO7A
MCM4	MIF-AS1	MPDU1	MRPS12	MTO1	MYO7B
MCM5	MIIP	MPDZ	MRPS14	MTOR	MYO9B
MCM6	MINPP1	MPG	MRPS15	MTOR-	MYOC
MCM7	MIP	MPHOSPH	MRPS16	AS1	MYOCD
MCOLN1	MIPOL1	8	MRPS17	MTPAP	MYOM1
MCPH1	MIR1256	MPI	MRPS18A	MTR	MYOT
MCU	MIR1273H	MPL	MRPS18B	MTRR	MYOZ2
MDH1	MIR17HG	MPLKIP	MRPS18C	MTTP	MYPN
MDM2	MIR3680-1	MPO	MRPS2	MTUS1	MYT1
MDM4	MIR3680-2	MPP3	MRPS21	MUC1	MYT1L
MDN1	MIR548AN	MPP4	MRPS22	MUC13	N4BP2
MECP2	MIR548AO	MPP6	MRPS23	MUC15	NAA10
MED12	MIR548AZ	MPP7	MRPS24	MUC2	NAGA
MED12L	MIR548F1	MPST	MRPS25	MUC3A	NAGLU
MED13	MIR548F3	MPV17	MRPS26	MUC4	NAGPA

NAGS	NDUFB11	NID1	NPHP3	NTHL1	OTOR
NAIP	NDUFB3	NIN	NPHP3-	NTNG1	OTX2
NALCN	NDUFB4	NINJ1	ACAD11	NTNG2	OVGP1
NALCN-	NDUFB5	NIPA1	NPHP4	NTRK1	OXCT1
AS1	NDUFB6	NIPAL1	NPHS1	NTRK2	OXCT1-
NAMPT	NDUFB7	NIPAL4	NPHS2	NTRK3	AS1
NAPRT	NDUFB8	NIPBL	NPL	NTRK3-	OXTR
NARS	NDUFB9	NIPSNAP1	NPM1	AS1	P2RX1
NARS2	NDUFC1	NIPSNAP3	NPPA	NUAK1	P2RX2
NAT1	NDUFC2	A	NPPA-AS1	NUBPL	P2RX4
NAT2	NDUFC2-	NKAIN2	NPPB	NUDC	P2RX5
NAT8L	KCTD14	NKX2-1	NPPC	NUDT1	P2RX5-
NAV2	NDUFS1	NKX2-1-	NPR1	NUDT6	TAX1BP3
NAV2-AS2	NDUFS2	AS1	NPR2	NUMA1	P2RX7
NBAS	NDUFS3	NKX2-3	NPR3	NUMBL	P2RY11
NBEA	NDUFS4	NKX2-5	NPRL3	NUP155	P2RY12
NBEAL2	NDUFS5	NKX2-6	NPSR1	NUP214	P2RY4
NBN	NDUFS6	NKX3-1	NPSR1-	NUP62	P4HB
NBPF10	NDUFS7	NKX3-2	AS1	NXF3	PABPC4L
NBPF20	NDUFS8	NLGN1	NPTN	NXF5	PABPN1
NCALD	NDUFV1	NLGN2	NPTX2	NXNL1	PACRG
NCAM1	NDUFV2	NLGN3	NPY	NYX	PACRG-
NCAM1-	NDUFV2-	NLGN4X	NPY1R	OAS1	AS1
AS1	AS1	NLGN4Y	NPY2R	OAS2	PACS1
NCAN	NDUFV3	NLRP1	NQO1	OAT	PAFAH1B
NCAPD2	NEB	NLRP12	NQO2	OAZ1	1
NCAPH2	NEBL	NLRP14	NR0B1	OAZ3	PAFAH1B
NCF2	NEDD4L	NLRP2	NR0B2	OBSCN	3
NCF4	NEDD9	NLRP3	NR1D1	OBSL1	PAH
NCK1-AS1	NEFH	NLRP7	NR1H2	OCA2	PAK3
NCK2	NEFL	NLRX1	NR1H3	OCLN	PAK6
NCKAP1	NEFM	NMB	NR1H4	OCRL	PAK7
NCOA1	NEGR1	NME1	NR1I2	ODC1	PALB2
NCOA3	NEIL1	NME1-	NR1I3	OFD1	PALLD
NCOA4	NEIL2	NME2	NR2C2AP	OGDH	PALM2-
NCR3	NEK1	NME8	NR2E1	OGG1	AKAP2
NCS1	NEK2	NMNAT1	NR2E3	OLFM2	PANK2
NCSTN	NEK4	NMT2	NR2F1	OLR1	PAPD7
NDE1	NEK8	NMU	NR3C1	OMG	PAPPA
NDN	NELFA	NNMT	NR3C2	OPA1	PAPSS2
NDOR1	NELL1	NNT	NR4A2	OPA1-AS1	PARD3B
NDP	NET1	NOBOX	NR4A3	OPA3	PARD6A
NDRG1	NETO1	NOD1	NR5A1	OPCML	PARK2
NDST1	NEU1	NOD2	NRAS	OPHN1	PARK7
NDUFA1	NEU2	NODAL	NRG1	OPLAH	PARL
NDUFA10	NEUROD1	NOG	NRG3	OPN1SW	PARP1
NDUFA11	NEUROG3	NOL3	NRIP1	OPN4	PARP2
NDUFA12	NEXN	NOP10	NRL	OPRD1	PARS2
NDUFA13	NF1	NOP56	NRP2	OPRK1	PASK
NDUFA2	NF2	NOS1	NRTN	OPRL1	PAWR
NDUFA3	NFATC4	NOS1AP	NRXN1	OPRM1	PAX1
NDUFA4	NFE2L2	NOS2	NRXN2	OPTC	PAX2
NDUFA5	NFIA	NOS3	NRXN3	OPTN	PAX3
NDUFA6	NFIX	NOTCH1	NSD1	OR13G1	PAX4
NDUFA7	NFKB1	NOTCH2	NSDHL	ORAI1	PAX5
NDUFA8	NFKB2	NOTCH3	NSMF	ORC1	PAX6
NDUFA9	NFKBIA	NOTCH4	NSUN2	ORC4	PAX7
NDUFAB1	NFKBIL1	NOX1	NSUN7	ORC6	PAX8
NDUFAF1	NFU1	NPAP1	NT5C	ORMDL3	PAX8-AS1
NDUFAF2	NFYC	NPAS2	NT5C1B	OSMR	PAX9
NDUFAF3	NGF	NPAS3	NT5C1B-	OSR1	PBLD
NDUFAF4	NGFR	NPAT	RDH14	OSTM1	PBX1
NDUFAF5	NHEJ1	NPC1	NT5C3A	OTC	PC
NDUFAF6	NHLRC1	NPC1L1	NT5DC1	OTOA	PCAT7
NDUFAF7	NHP2	NPC2	NT5E	OTOF	PCBD1
NDUFB1	NHS	NPFFR2	NTF3	OTOG	PCCA
NDUFB10	NICN1	NPHP1	NTF4	OTOGL	PCCB

PCDH11X	PDP1	PHKB	PLAU	POLR3A	PRICKLE2
PCDH15	PDP2	PHKG1	PLAUR	POLR3B	PRICKLE2
PCDH18	PDPK1	PHKG2	PLBD1-	POLR3D	-AS1
PCDH19	PDSS1	PHLDA2	AS1	POLR3H	PRICKLE2
PCDH9	PDSS2	PHLPP2	PLCB1	POLRMT	-AS3
PCDH9-	PDX1	PHOX2A	PLCB4	POMC	PRKAA2
AS2	PDX1-AS1	PHOX2B	PLCD1	POMGNT1	PRKACA
PCDHA1	PDXK	PHYH	PLCE1	POMGNT2	PRKAG2
PCDHA10	PDYN	PHYKPL	PLCE1-	POMK	PRKAG3
PCDHA11	PDZD7	PI3	AS1	POMP	PRKAR1A
PCDHA12	PEAR1	PI4KA	PLCE1-	POMT1	PRKAR1B
PCDHA13	PECAM1	PIBF1	AS2	POMT2	PRKCA
PCDHA2	PECR	PICALM	PLCG2	PON1	PRKCB
PCDHA3	PEMT	PICK1	PLCZ1	PON2	PRKCD
PCDHA4	PENK	PIEZO2	PLD2	PON3	PRKCG
PCDHA5	PEPD	PIF1	PLEC	POP1	PRKCSH
PCDHA6	PER1	PIGA	PLEKHG4	POR	PRKD2
PCDHA7	PER2	PIGB	PLEKHG5	PORCN	PRKD3
PCDHA8	PER3	PIGL	PLEKHM1	POU1F1	PRKDC
PCDHA9	PET100	PIGM	PLG	POU3F4	PRKG1
PCDHAC1	PEX1	PIGN	PLIN1	POU4F3	PRKCH
PCDHAC2	PEX10	PIGO	PLIN4	POU5F1	PRKRA
PCDHB4	PEX11B	PIGR	PLN	POU6F2	PRL
PCK1	PEX12	PIGV	PLOD1	PPAN-	PRLHR
PCK2	PEX13	PIGW	PLOD2	P2RY11	PRLR
PCM1	PEX14	PIK3C2G	PLOD3	PPARA	PRM1
PCMT1	PEX16	PIK3C3	PLP1	PPARD	PRM2
PCNT	PEX19	PIK3CA	PLP2	PPARG	PRMT3
PCOLCE	PEX2	PIK3CB	PLTP	PPARGC1	PRMT7
PCOLCE-	PEX26	PIK3CD	PLXND1	A	PRMT9
AS1	PEX3	PIK3CG	PMAIP1	PPARGC1	PRND
PCP4	PEX5	PIK3R1	PML	B	PRNP
PCSK1	PEX6	PIK3R2	PMM2	PPAT	PROC
PCSK2	PEX7	PIK3R4	PMP22	PPIA	PROCR
PCSK9	PFAS	PIK3R5	PMPCA	PPIB	PRODH
PCYT1A	PFKFB1	PIKFYVE	PMS1	PPIG	PROK1
PDCD1	PFKL	PIN1	PMS2	PPM1B	PROK2
PDCD10	PFKM	PINK1	PMS2P3	PPM1D	PROKR1
PDCD5	PFN1	PINK1-AS	PNKD	PPM1E	PROKR2
PDCD6IP	PGAM1	PIP4K2A	PNKP	PPOX	PROM1
PDE10A	PGAM2	PIP5K1B	PNLIP	PPP1R1A	PROP1
PDE11A	PGAM5	PIP5K1C	PNMT	PPP1R3A	PROS1
PDE3A	PGAP2	PITPNM3	PNP	PPP1R3C	PROX2
PDE3B	PGAP3	PITX1	PNPLA1	PPP2R1A	PROZ
PDE4B	PGBD1	PITX2	PNPLA2	PPP2R1B	PRPF3
PDE4D	PGBD3	PITX3	PNPLA3	PPP2R2B	PRPF31
PDE6A	PGC	PIWIL3	PNPLA6	PPP2R2C	PRPF6
PDE6B	PGD	PKD1	PNPO	PPP2R5D	PRPF8
PDE6C	PGK1	PKD1L1	PNPT1	PPP6C	PRPH
PDE6G	PGM1	PKD2	POC1A	PPT1	PRPH2
PDE6H	PGR	PKHD1	POF1B	PPY	PRPS1
PDE7B	PGRMC1	PKLR	POGZ	PQBP1	PRPS2
PDE8B	PHACTR1	PKM	POLA1	PRB3	PRR19
PDGFB	PHB	PKN3	POLB	PRB4	PRRC2A
PDGFC	PHEX	PKP1	POLD1	PRCC	PRRT2
PDGFRA	PHEX-AS1	PKP2	POLE	PRCD	PRRX1
PDGFRB	PHF11	PLA2G10	POLE2	PRCP	PRSS1
PDGFRL	PHF2	PLA2G2A	POLG	PRDM16	PRSS12
PDHA1	PHF3	PLA2G2D	POLG2	PRDM2	PRSS2
PDHB	PHF6	PLA2G4A	POLH	PRDM5	PRSS23
PDHX	PHF8	PLA2G4C	POLL	PRDM9	PRSS3P2
PDK1	PHGDH	PLA2G5	POLQ	PREPL	PRSS56
PDK2	PHIP	PLA2G6	POLR1C	PREX2	PRSS8
PDK3	PHKA1	PLA2G7	POLR1D	PRF1	PRX
PDK4	PHKA2	PLAG1	POLR2E	PRG4	PSAP
PDLIM3	PHKA2-	PLAGL1	POLR2F	PRH1	PSAT1
PDLIM5	AS1	PLAT	POLR2M	PRICKLE1	PSCA

PSEN1	PTPRT	RALGAPA	RGR	ROR2	RTN4R
PSEN2	PTPRU	1P	RGS2	RORA	RTTN
PSENEEN	PTPRZ1	RALGDS	RGS6	ROS1	RUFY2
PSMA3	PTRF	RAMP3	RGS7	RP1	RUNX1
PSMA6	PTRH1	RANBP2	RGS9	RP1L1	RUNX2
PSMA7	PTRH2	RANGRF	RGS9BP	RP2	RUNX3
PSMB4	PTS	RAPGEF1	RHAG	RP9	RUVBL1
PSMB8	PUS1	RAPSN	RHBDD2	RPA1	RUVBL2
PSMB8-AS1	PUS10	RARA	RHBDF2	RPA4	RXFP2
PSMB9	PUS3	RARA-AS1	RHCE	RPE65	RXRA
PSMC2	PVR	RARB	RHD	RPEL1	RXRG
PSMC3IP	PVRL1	RARS	RHO	RPGR	RYK
PSMD1	PVRL3	RARS2	RHOB	RPGRIP1	RYR1
PSMD7	PVRL4	RASA1	RHOBTB2	RPGRIP1L	RYR2
PSORS1C1	PVT1	RASGRP2	RHOG	RPH3AL	RYR3
PSPC1	PWRN1	RASSF1	RHPN2	RPIA	S100A14
PSPH	PXDN	RASSF1-AS1	RIC1	RPL10	S100B
PSPN	PXMP2	RASSF4	RIMS1	RPL11	S100G
PSTPIP1	PYCR1	RAX	RIMS3	RPL15	S1PR1
PTAFR	PYCRL	RAX2	RIN2	RPL21	SAA1
PTCD1	PYGB	RB1	RIPK3	RPL21P28	SAA2
PTCSC3	PYGL	RB1CC1	RIPK4	RPL26	SAA2-
PTDSS1	PYGM	RBCK1	RIT1	RPL35A	SAA4
PTEN	PYY	RBBP8	RLBP1	RPL36	SACS
PTENP1	PZP	RBCK1	RLF	RPL36A-	SAG
PTF1A	QDPR	RBFOX1	RLIM	HNRNPH2	SAGE1
PTGDR	QKI	RBM10	RM1	RPL5	SALL1
PTGDR2	RAB11FIP5	RBM12	RMND1	RPN2	SALL2
PTGDS	RAB18	RBM14	RMRP	RPS10	SALL4
PTGER2	RAB23	RBM14-	RNASE2	RPS10-	SAMD9
PTGER4	RAB27A	RBM4	RNASE3	NUDT3	SAMHD1
PTGES2	RAB28	RBM15	RNASE4	RPS12	SAR1B
PTGIR	RAB29	RBM20	RNASEH2	RPS14	SARDH
PTGIS	RAB2A	RBM28	A	RPS15	SARM1
PTGS1	RAB39B	RBM8A	RNASEH2	RPS15A	SARS
PTGS2	RAB3GAP1	RBMXL2	B	RPS19	SARS2
PTH	RAB3GAP2	RBP3	RNASEH2	RPS24	SART1
PTH1R	RAB3GAP2	RBP4	B-AS1	RPS26	SART3
PTHLH	RAB4B-	RBPJ	RNASEH2	RPS27A	SAT1
PTCH1	EGLN2	RCAN1	C	RPS3	SATB2
PTCH2	RAB7A	RCVRN	RNASEL	RPS4X	SATL1
PTCHD1	RABGGTA	RD3	RNASET2	RPS4Y1	SBDS
PTCHD1-AS	RABL6	RDH12	RNF113A	RPS4Y2	SBF1
PTCHD3	RAC1	RDH5	RNF114	RPS6KA3	SBF2
PTK2B	RAC2	RDX	RNF135	RPS6KB1	SBF2-AS1
PTK7	RAD1	RECQL4	RNF139	RPS6KL1	SBK3
PTPN1	RAD21	REEP1	RNF168	RPS7	SBNO1
PTPN11	RAD21L1	REEP2	RNF170	RPSA	SC5D
PTPN13	RAD23B	REG1A	RNF212	RPSAP52	SCAP
PTPN14	RAD50	RELN	RNF213	RPTOR	SCAPER
PTPN18	RAD51	REN	RNF216	RRH	SCARB1
PTPN2	RAD51B	RENBP	RNF6	RRM1	SCARB2
PTPN21	RAD51C	REPS2	RNLS	RRM2B	SCARF2
PTPN22	RAD51D	RET	RNU5F-1	RRP1B	SCG2
PTPN6	RAD52	RETN	RNU6-19P	RS1	SCG3
PTPRB	RAD54B	REV3L	RNU6-28P	RSC1A1	SCGB1A1
PTPRC	RAD54L	REXO4	RNU6-71P	RSPH1	SCGB1D2
PTPRCAP	RAD9A	RFC2	RNU6-72P	RSPH3	SCGB3A2
PTPRD	RAET1L	RFT1	RNU6-83P	RSPH4A	SCN10A
PTPRF	RAF1	RFWD2	ROBO1	RSPH9	SCN11A
PTPRJ	RAG1	RFX2	ROBO2	RSPO1	SCN1A
PTPRK	RAG2	RFX5	ROBO3	RSPO4	SCN1B
PTPRO	RAI1	RFX6	ROCK1	RSRC1	SCN2A
PTPRQ	RALGAPA1	RFX8	ROCK2	RTEL1	SCN2B
PTPRR	1	RFXANK	ROGDI	RTEL1-	SCN3A
		RFXAP	ROM1	TNFRSF6B	SCN3B
		RGMA	ROPN1L	RTN2	SCN4A

SCN4B	SETBP1	SLC10A2	SLC25A18	SLC34A1	SLC9B1
SCN5A	SETD2	SLC10A3	SLC25A19	SLC34A2	SLCO1A2
SCN8A	SETD5	SLC11A1	SLC25A2	SLC34A3	SLCO1B1
SCN9A	SETD8	SLC11A2	SLC25A20	SLC35A1	SLCO1B3
SCNN1A	SETDB1	SLC12A1	SLC25A21	SLC35A2	SLCO1C1
SCNN1B	SETDB2	SLC12A3	SLC25A21-	SLC35C1	SLCO2A1
SCNN1G	SETX	SLC12A4	AS1	SLC35D1	SLCO2B1
SCO1	SEZ6	SLC12A5	SLC25A22	SLC35G2	SLCO3A1
SCO2	SEZ6L2	SLC12A6	SLC25A23	SLC36A2	SLCO4A1
SCP2	SF1	SLC13A1	SLC25A26	SLC37A1	SLCO4A1-
SCRIB	SF3B1	SLC13A2	SLC25A27	SLC37A4	AS1
SCT	SF3B4	SLC13A3	SLC25A28	SLC39A13	SLCO4C1
SCUBE2	SFPQ	SLC14A1	SLC25A29	SLC39A4	SLCO6A1
SDC3	SFTPA1	SLC14A2	SLC25A3	SLC3A1	SLFN5
SDCCAG8	SFTPA2	SLC15A1	SLC25A30	SLC40A1	SLIT3
SDHA	SFTPB	SLC15A2	SLC25A31	SLC41A1	SLITRK1
SDHAF1	SFTPC	SLC16A1	SLC25A32	SLC44A2	SLURP1
SDHAF2	SFTPD	SLC16A12	SLC25A33	SLC45A2	SLX4
SDHB	SFXN4	SLC16A12-	SLC25A34	SLC46A1	SMAD1
SDHC	SGCA	AS1	SLC25A35	SLC47A1	SMAD2
SDHD	SGCB	SLC16A2	SLC25A37	SLC47A2	SMAD3
SEC16B	SGCD	SLC16A3	SLC25A38	SLC4A1	SMAD4
SEC23A	SGCE	SLC17A1	SLC25A39	SLC4A10	SMAD6
SEC23B	SGCG	SLC17A3	SLC25A4	SLC4A11	SMAD7
SEC63	SGK1	SLC17A5	SLC25A40	SLC4A3	SMAD9
SECISBP2	SGSH	SLC17A8	SLC25A41	SLC4A4	SMAP2
SEL1L	SH2B1	SLC18A1	SLC25A42	SLC4A5	SMARCA2
SELE	SH2B3	SLC18A2	SLC25A43	SLC4A7	SMARCA4
SELL	SH2D1A	SLC19A1	SLC25A44	SLC52A1	SMARCA
SELP	SH2D2A	SLC19A2	SLC25A45	SLC52A2	D1
SELPLG	SH3BP2	SLC19A3	SLC25A46	SLC52A3	SMARCAL
SEMA3A	SH3GL1	SLC1A1	SLC25A5	SLC5A1	1
SEMA3E	SH3PXD2	SLC1A2	SLC25A5-	SLC5A11	SMARCB1
SEMA4A	B	SLC1A3	AS1	SLC5A2	SMARCE1
SEMA4C	SH3TC2	SLC20A2	SLC26A1	SLC5A3	SMC1A
SEMA4G	SHANK2	SLC22A1	SLC26A10	SLC5A5	SMC1B
SEMA6D	SHANK3	SLC22A11	SLC26A2	SLC5A6	SMC3
SEMG1	SHBG	SLC22A12	SLC26A3	SLC5A7	SMG1
SENCR	SHFM1	SLC22A13	SLC26A4	SLC6A1	SMG6
SEPN1	SHH	SLC22A14	SLC26A4-	SLC6A1-	SMCHD1
SEPP1	SHMT1	SLC22A15	AS1	AS1	SMNDC1
SEPSECS	SHOC2	SLC22A16	SLC26A5	SLC6A11	SMO
SEPT12	SHPK	SLC22A17	SLC26A6	SLC6A12	SMOC1
SEPT9	SHROOM3	SLC22A18	SLC26A9	SLC6A13	SMOC2
SERAC1	SHROOM4	SLC22A18	SLC27A1	SLC6A14	SMPD1
SERPINA1	SI	AS	SLC27A4	SLC6A17	SMPX
SERPINA1	SIAE	SLC22A2	SLC27A5	SLC6A18	SMS
0	SIGLEC12	SLC22A3	SLC28A1	SLC6A19	SMUG1
SERPINA3	SIGLEC14	SLC22A4	SLC28A2	SLC6A2	SMYD3
SERPINA6	SIGLEC16	SLC22A5	SLC28A3	SLC6A20	SNAI2
SERPINA7	SIGMAR1	SLC22A6	SLC29A1	SLC6A3	SNAP29
SERPINB1	SIL1	SLC22A7	SLC29A2	SLC6A4	SNAPC4
1	SIM1	SLC22A8	SLC29A3	SLC6A5	SNAPC5
SERPINB3	SIPA1	SLC22A9	SLC29A4	SLC6A6	SNCA
SERPINB5	SIRT1	SLC23A1	SLC2A1	SLC7A1	SNCAIP
SERPINB6	SIRT3	SLC24A1	SLC2A10	SLC7A10	SNCB
SERPINC1	SIRT5	SLC24A2	SLC2A2	SLC7A2	SND1
SERPIND1	SIX1	SLC24A5	SLC2A4	SLC7A5	SNHG22
SERPINE1	SIX2	SLC25A1	SLC2A5	SLC7A7	SNHG4
SERPINF1	SIX3	SLC25A10	SLC2A6	SLC7A8	SNHG5
SERPINF2	SIX5	SLC25A11	SLC2A9	SLC7A9	SNIP1
SERPING1	SIX6	SLC25A12	SLC30A10	SLC8A1	SNRK
SERPINH1	SKI	SLC25A13	SLC30A2	SLC8A1-	SNRK-AS1
SERPINI1	SKIV2L	SLC25A14	SLC30A5	AS1	SNRNP200
SERPINI2	SLA	SLC25A15	SLC30A8	SLC9A3R1	SNRPE
SERTAD1	SLBP	SLC25A16	SLC31A1	SLC9A6	SNRPN
SESN2	SLC10A1	SLC25A17	SLC33A1	SLC9A9	SNTA1

SNTG2	SPRED1	STK39	T	TCF4	THBS1
SNURF	SPRN	STK4	TAAR6	TCF7	THBS2
SNX10	SPRR3	STMN1	TAAR9	TCF7L1	THBS4
SNX14	SPRY2	STON1-	TAB2	TCF7L2	THOC2
SNX19	SPRY4	GTF2A1L	TAC3	TCIRG1	THPO
SNX22	SPTA1	STOX1	TACO1	TCL1A	THRA
SNX3	SPTAN1	STPG1	TACR1	TCN1	THRB
SNX31	SPTB	STRA6	TACR3	TCN2	THSD7A
SOAT2	SPTBN2	STRADA	TACSTD2	TCOF1	TIA1
SOBP	SPTBN5	STRC	TAF1	TCP1	TIAL1
SOCS1	SPTLC1	STS	TAF15	TCTE1	TICAM1
SOCS3	SPTLC2	STX11	TAF1C	TCTE3	TIMM23B
SOD1	SQSTM1	STX16	TAF1L	TCTN1	TIMM44
SOD2	SRA1	STX16-	TAF2	TCTN2	TIMM8A
SOD3	SRC	NPEPL1	TAF7L	TCTN3	TIMP1
SOGA3	SRCAP	STX1A	TAL1	TDGF1	TIMP2
SOHLH1	SRD5A2	STXBP1	TALDO1	TDO2	TIMP3
SORBS1	SRD5A3	STXBP2	TANC2	TDP1	TINAG
SORCS1	SRD5A3-	STXBP5	TAP1	TDRD7	TINF2
SORL1	AS1	SUCLA2	TAP2	TEAD1	TIRAP
SORT1	SREBF1	SUCLG1	TAPBP	TECPR2	TJP2
SOS1	SREBF2	SUCLG2	TARDBP	TECR	TK2
SOST	SREK1	SUFU	TARID	TECTA	TKT
SOX10	SRGAP2	SUGCT	TARS2	TEK	TLDC2
SOX15	SRGAP3	SULF1	TAS1R1	TEKT2	TLK1
SOX17	SRI	SULT1A1	TAS1R2	TENM3	TLL1
SOX18	SRP72	SULT1B1	TAS1R3	TENM4	TLN1
SOX2	SRPX	SULT1C2	TAS2R16	TEP1	TLN2
SOX2-OT	SRPX2	SULT1C4	TAS2R19	TERC	TLR1
SOX3	SRR	SULT1E1	TAS2R3	TERT	TLR10
SOX5	SRY	SULT2A1	TAS2R38	TET1	TLR2
SOX6	SSH1	SULT2B1	TAS2R46	TET2	TLR3
SOX7	SST	SULT4A1	TAS2R50	TEX14	TLR4
SOX8	SSTR2	SUMF1	TAS2R9	TEX9	TLR5
SOX9	SSTR5	SUMO1	TAT	TF	TLR6
SP100	ST14	SUN2	TAZ	TFAM	TLR7
SP110	ST20-	SUOX	TBC1D1	TFAP2A	TLR8
SP7	MTHFS	SUPT16H	TBC1D20	TFAP2A-	TLR8-AS1
SP8	ST3GAL3	SUPT3H	TBC1D23	AS1	TLR9
SPACA6P-	ST3GAL5	SUPT6H	TBC1D24	TFAP2B	TLX1
AS	ST5	SURF1	TBC1D4	TFB1M	TM4SF19
SPAG1	ST7	SUV420H1	TBCD	TFCP2	TM4SF19-
SPAG16	ST7-AS1	SV2B	TBCE	TFE3	AS1
SPAG17	ST7-AS2	SYCE2	TBCK	TFF1	TM4SF19-
SPAG5-	ST8SIA2	SYCP2	TBK1	TFG	CTEX1D
AS1	STAB2	SYCP3	TBL1X	TFPI	2
SPAG6	STAG1	SYN1	TBL1XR1	TFR2	TMC1
SPAG8	STAMBP	SYN3	TBL1Y	TFRC	TMC6
SPAST	STAR	SYNCRIP	TBP	TG	TMC8
SPATA13	STAT1	SYNE1	TBX1	TGFB1	TMCO1
SPATA16	STAT2	SYNE1-	TBX10	TGFB2	TMEM114
SPATA21	STAT3	AS1	TBX15	TGFB3	TMEM126
SPATA7	STAT5A	SYNE2	TBX19	TGFB1	A
SPECC1L	STAT5B	SYNGAP1	TBX2	TGFBR1	TMEM127
SPECC1L-	STAT6	SYNGR1	TBX20	TGFBR2	TMEM135
ADORA2A	STEAP3	SYNJ1	TBX21	TGFBR3	TMEM138
SPEF2	STEAP4	SYNM	TBX22	TGFBRAP	TMEM165
SPG11	STH	SYNPO	TBX3	1	TMEM173
SPG20	STIL	SYP	TBX4	TGIF1	TMEM185
SPG21	STIM1	SYP-AS1	TBX5	TGM1	A
SPG7	STIM2	SYT11	TBX6	TGM2	TMEM187
SPI1	STK10	SYT14	TBXA2R	TGM5	TMEM2
SPINK1	STK11	SYT2	TBXAS1	TGM6	TMEM216
SPINK5	STK19	SYT9	TCAP	TH	TMEM231
SPINT2	STK3	SYTL3	TCF12	THADA	TMEM237
SPP1	STK32A	SYTL5	TCF21	THAP1	TMEM249
SPR	STK33	SZT2	TCF3	THBD	TMEM39A

TMEM43	TNRC6A	TRIM5	AS1	UGT1A8	VCL
TMEM5	TNS3	TRIM54	TTC37	UGT1A9	VCP
TMEM50B	TNXB	TRIM63	TTC7A	UGT2A1	VDR
TMEM52B	TOE1	TRIM72	TTC8	UGT2A2	VEGFA
TMEM67	TOMM40	TRIO	TTF1	UGT2A3	VGLL1
TMEM70	TOMM40L	TRIOBP	TTF2	UGT2B15	VHL
TMEM8A	TOP1MT	TRIP11	TTI2	UGT2B17	VIM
TMEM9	TOPBP1	TRIP12	TTLL11	UGT2B4	VIM-AS1
TMEM99	TOPORS	TRMT1	TTN	UGT2B7	VIMP
TMIE	TOPORS-	TRMT10C	TTN-AS1	UGT8	VIP
TMLHE	AS1	TRMU	TTPA	UHRF1BP1	VIPAS39
TMPO	TOR1A	TRNT1	TTR	UCHL1	VIPR2
TMPO-AS1	TOX3	TROAP	TTY14	UIMC1	VKORC1
TMPRSS11	TP53	TROVE2	TUBA1A	UMOD	VLDLR
A	TP53AIP1	TRPA1	TUBA8	UMPS	VLDLR-
TMPRSS15	TP53BP1	TRPC1	TUBAL3	UNC119	AS1
TMPRSS3	TP53I3	TRPC3	TUBB1	UNC13D	VMA21
TMPRSS4	TP53RK	TRPC4	TUBB2B	UNC5C	VNN1
TMPRSS4-	TP63	TRPC5	TUBB3	UNC5CL	VPREB1
AS1	TP73	TRPC6	TUBB4A	UNC79	VPS13A
TMPRSS5	TPBG	TRPC7	TUBG1	UNC80	VPS13A-
TMPRSS6	TPCN2	TRPM1	TUBGCP4	UNC93A	AS1
TMX2-	TPH1	TRPM2	TUBGCP5	UNC93B1	VPS13B
CTNND1	TPH2	TRPM2-AS	TUBGCP6	UNG	VPS33B
TNC	TPI1	TRPM3	TUFM	UNKL	VPS35
TNF	TPK1	TRPM4	TULP1	UPB1	VPS37A
TNFAIP2	TPM1	TRPM6	TULP3	UPF3B	VPS45
TNFAIP3	TPM2	TRPM7	TUSC3	UPK3A	VRK1
TNFRSF10	TPM3	TRPS1	TWIST1	UQCR11	VRK2
A	TPMT	TRPV1	TWIST2	UQCRB	VSIG4
TNFRSF10	TPO	TRPV3	TWSG1	UQCRC1	VSX1
B	TPP1	TRPV4	TXN2	UQCRC2	VSX2
TNFRSF11	TPP2	TRPV5	TXNRD2	UQCRCF1	VTN
A	TPR	TRRAP	TYK2	UQCRH	VWF
TNFRSF11	TPRN	TSC1	TYMP	UQCRQ	WAC
B	TPTE2P5	TSC2	TYMS	URB1	WARS2
TNFRSF13	TRADD	TSEN2	TYMSOS	URGCP-	WAS
B	TRAF3	TSEN34	TYR	MRPS24	WASF3
TNFRSF13	TRAF3IP1	TSEN54	TYROBP	UROC1	WDFY3
C	TRAF3IP2	TSFM	TYRP1	UROD	WDFY4
TNFRSF1A	TRAF3IP2-	TSG101	UBA1	UROS	WDPCP
TNFRSF1B	AS1	TSHB	UBA2	USB1	WDR1
TNFRSF25	TRAF6	TSHR	UBA3	USF1	WDR11
TNFRSF4	TRAK2	TSHZ1	UBAC2	USH1C	WDR13
TNFSF10	TRAP1	TSIX	UBD	USH1G	WDR19
TNFSF11	TRAPPC10	TSLP	UBE2A	USH2A	WDR34
TNFSF12	TRAPPC11	TSNAX-	UBE2B	USP15	WDR35
TNFSF12-	TRAPPC2	DISC1	UBE2I	USP24	WDR36
TNFSF13	TRAPPC9	TSPAN12	UBE3A	USP26	WDR4
TNFSF13B	TRDN	TSPAN17	UBE3C	USP46	WDR45
TNFSF14	TREH	TSPAN7	UBIAD1	USP7	WDR45B
TNFSF15	TREM2	TSPEAR	UBN2	USP9X	WDR60
TNFSF4	TRERF1	TSPEAR-	UBQLN2	USP9Y	WDR62
TNFSF8	TREX1	AS1	UBR1	UTF1	WDR66
TNKS	TRH	TSPO	UBR3	UTP14C	WDR72
TNNC1	TRHR	TSPYL1	UBR7	UTRN	WDR81
TNNI2	TRIB1	TSR1	UCP1	UTS2	WFS1
TNNI3	TRIB3	TSSC4	UCP2	UTS2B	WHSC1
TNNI3K	TRIL	TSSK2	UCP3	UVSSA	WHSC1L1
TNNT1	TRIM17	TSSK3	UFD1L	VAMP1	WIPF1
TNNT2	TRIM2	TSSK4	UGT1A1	VANGL1	WISP3
TNNT3	TRIM21	TST	UGT1A10	VANGL2	WNK1
TNP1	TRIM22	TTBK2	UGT1A3	VAPB	WNK4
TNPO1	TRIM24	TTC14	UGT1A4	VARS2	WNT10A
TNPO2	TRIM32	TTC19	UGT1A5	VAX1	WNT10B
TNPO3	TRIM33	TTC21B	UGT1A6	VCAM1	WNT3
TNR	TRIM37	TTC21B-	UGT1A7	VCAN	WNT4

WNT5A	XPNPEP2	ZBTB18	ZFP36	ZMYND10	ZNF526
WNT5B	XPNPEP3	ZBTB24	ZFP36L1	ZMYND11	ZNF592
WNT7A	XRCC1	ZBTB40	ZFP57	ZNF202	ZNF627
WRAP53	XRCC2	ZBTB41	ZFP90	ZNF213	ZNF644
WRN	XRCC3	ZC3H14	ZFP91-	ZNF224	ZNF674
WT1	XRCC4	ZC3H3	CNTF	ZNF24	ZNF711
WT1-AS	XRCC5	ZC3HAV1	ZFPM2	ZNF276	ZNF750
WTAPP1	XRCC6	ZC4H2	ZFPM2-	ZNF335	ZNF75D
WWC1	XYLT1	ZCCHC12	AS1	ZNF33A	ZNF80
WWOX	XYLT2	ZCCHC13	ZFX	ZNF35	ZNF804A
WWP2	YAP1	ZCCHC8	ZFY	ZNF350	ZNF81
WWTR1	YARS	ZDHHC15	ZFYVE26	ZNF350-	ZNHIT6
XBP1	YARS2	ZDHHC8	ZFYVE27	AS1	ZNRF1
XCR1	YBX2	ZDHHC9	ZHX3	ZNF365	ZPBP
XDH	YTHDF2	ZEB1	ZIC1	ZNF385B	ZPBP2
XIAP	YWHAE	ZEB2	ZIC2	ZNF41	ZSWIM7
XIST	YY1	ZEB2-AS1	ZIC3	ZNF423	
XK	ZAN	ZFAT	ZIC4	ZNF469	
XKR4	ZAP70	ZFAT-AS1	ZMPSTE24	ZNF480	
XPA	ZBTB11	ZFHX3	ZMYM3	ZNF507	
XPC	ZBTB16	ZFHX4	ZMYM6	ZNF513	

Příloha 7: Seznam genů NGS panelu pro Kabuki syndrom, hluchotu a geny předního segmentu oka

Hluchota						Syndromická ID
ABHD12	COL9A3	ILDR1	POU3F4	TMPRSS3	FTL	CDL
ACSL4	COQ8B	KARS	POU4F3	TNC	FYCO1	NIPBL
ACTG1	CRYM	KCNE1	PRPS1	TPRN	GALK1	SMC1A
ACVRL1	DCDC2	KCNJ10	PTPRQ	TRIOBP	GCNT2	SMC3
ADCY1	DFNA5	KCNQ1	RASA1	TRMU	GJA3	HDAC8
ADGRV1	DFNB59	KCNQ4	RDX	TSPEAR	GJA8	RAD21
ALMS1	DIABLO	LHFPL5	RMND1	TYR	HSF4	
ANKH	DIAPH1	LOXHD1	RPS6KA3	USH1C	HMX1	KS, WSS
ATP2B2	DIAPH3	LRP2	SALL4	USH1G	LIM2	KMT2A
ATP6V1B1	DLX5	LRTOMT	SEMA3E	USH2A	LGR4	KMT2D
BCS1L	DSPP	MANBA	SERPINB6	VCAN	MAF	KDM6A
BDP1	EDN3	MARVELD2	SIX1	WBP2	MIP	
BSND	EDNRB	MET	SIX5	WFS1	MIR184	Camurati-Engelman syndrom
BTD	ELMOD3	MIR96	SLC17A8	WHRN	NHS	
CABP2	ENG	MITF	SLC19A2		PAX6	
CACNA1D	EPS8	MSRB3	SLC26A4	Slepota	PITX2	TGFB1
CCDC50	ESPN	MYH14	SLC26A5	ABCA4	PITX3	
CD151	ESRRB	MYH9	SLC29A3	B3GLCT	PRDM5	Nefrotický syndrom
CDC14A	EYA1	MYO15A	SLC33A1	BFSP2	PRPF31	
CDH23	EYA4	MYO1A	SLC4A11	CHMP4B	PRPH2	NPHS1
CDKN1C	FAM65B	MYO3A	SLITRK6	COL4A1	PTCH1	NPHS2
CEACAM16	FGF3	MYO6	SMAD4	CPAMD8	PXDN	PLCE1
CHD7	FGFR2	MYO7A	SMPX	CRB1	RDH12	WT1
CHSY1	FGFR3	NARS2	SNAI2	CRYAA	RHO	LAMB2
CIB2	FOXI1	NDP	SOX10	CRYAB	RP1	COQ8B
CLDN14	GATA3	NF2	SPNS2	CRYBA1	RP2	
CLIC5	GIPC3	NLRP3	STRC	CRYBA4	RPGR	
CLRN1	GJA1	OPA1	SUCLA2	CRYBB1	SIL1	
CNTN4	GJB2	OSBPL2	SUCLG1	CRYBB2	SIPA1L3	
CNTN6	GJB3	OTOA	SYNE4	CRYBB3	SOX2	
COCH	GJB6	OTOF	TBC1D24	CRYGA	TULP1	
COL11A1	GPSM2	OTOG	TCOF1	CRYGC	VIM	
COL11A2	GRHL2	OTOGL	TECTA	CRYGD	VSX	
COL2A1	GRXCR1	P2RX2	TFAP2A	CRYGS	ZNF469	
COL4A3	GRXCR2	PAX3	TIMM8A	CYP1B1		
COL4A4	HARS	PCDH15	TJP2	EPHA2		
COL4A5	HGF	PDZD7	TMC1	EYA1		
COL4A6	HOMER2	PNPT1	TMC2	FOXC1		
COL9A1	HOXB1	POLR1C	TMEM132E	FOXD3		
COL9A2	HSD17B4	POLR1D	TMIE	FOXE3		