

# Univerzita Karlova

## 1.lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



### **Geneticky podmíněná onemocnění rohovky: možnosti včasné detekce, ovlivnění vzniku a progresu**

MUDr. Pavlína Skalická

Praha 2020

# **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

**Obor: Preventivní medicína**

**Předseda oborové rady: doc. MUDr. Alexander M. Čelko, CSc.**

**Školící pracoviště:**

**Laboratoř pro studium vzácných nemocí, Klinika dětského a dorostového**

**lékařství, 1. LF UK a VFN v Praze**

**Oční klinika, 1. LF UK a VFN v Praze**

**Školitelka: doc. MUDr. Petra Lišková, M.D., Ph.D.**

# OBSAH

SOUHRN .....	4
SUMMARY .....	5
1 ÚVOD .....	6
1.1 Základní charakteristika rohovky.....	6
1.2 Dědičná onemocnění rohovky .....	6
1.2.1 Rohovkové dystrofie .....	7
1.2.2 Diferenciální diagnostika rohovkových dystrofií.....	9
1.2.3 Vývojové anomálie rohovky .....	9
2 HLAVNÍ CÍLE PRÁCE.....	10
3 MATERIÁL A METODIKA .....	11
3.1 Klinické vyšetření a genealogická analýza .....	11
3.2 Laboratorní vyšetření .....	11
4 VÝSLEDKY .....	12
4.1 Mřížková dystrofie rohovky.....	12
4.2 Schnyderova dystrofie rohovky .....	12
4.3 Fuchsova endotelová dystrofie rohovky .....	13
4.4 Zadní polymorfni dystrofie rohovky typu 4.....	13
4.5 Zadní polymorfni dystrofie rohovky typu 3.....	15
4.6 Kongenitální hereditární endotelová dystrofie rohovky .....	15
4.7 Paraproteinová keratopatie.....	16
4.8 Cornea plana .....	17
4.9 Syndrom křehkých rohovek .....	17
5 DISKUZE.....	19
5.1 Charakterizované klinické jednotky.....	19
5.2 Fenotypová variabilita a korelace s genotypem.....	19
5.3 Přínos molekulárně genetického vyšetření v diferenciální diagnostice .....	20
5.4 Význam masivního paralelního sekvenování .....	21
5.5 Průkaz příčinné souvislosti mezi variantou a fenotypem.....	21
5.6 Aplikace poznatků do výzkumu cílených léčebných postupů na buněčné úrovni.....	22
5.7 Preventivní aspekty využití získaných poznatků .....	23
6 ZÁVĚR .....	24
SEZNAM WEBOVÝCH ZDROJŮ.....	25
LITERATURA.....	26
SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORKY .....	29

## SOUHRN

**Úvod:** Rozvoj molekulárně genetických metod vyvolal v řadě oborů potřebu jejich zařazení do běžné klinické praxe, oftalmologii nevyjímaje. Hlavním cílem této disertační práce byla detailní klinická charakterizace českých pacientů s podezřením na dědičná onemocnění rohovky, využití genetického testování ke stanovení nebo upřesnění jejich diagnózy a následně pak i v klinickém a genetickém poradenství, v konečném důsledku vedoucí k preventivním opatřením bránícím ztrátě zrakové ostrosti.

**Materiál a metody:** Jedinci zařazení do výzkumu byli buď dlouhodobě sledováni, nebo nově odesláni oftalmology ke konziliárnímu vyšetření na Rohovkovou ambulanci Oční kliniky 1. LF UK a VFN v Praze. Detailní klinické vyšetření zahrnovalo rohovkovou tomografii, zrcadlovou mikroskopii, optickou koherenční tomografii se spektrální doménou, biometrii a genealogickou analýzu. DNA byla izolována z leukocytů venózní krve, popř. buněk bukalní sliznice. Příčinné varianty byly hledány pomocí Sangerova a masivně paralelního sekvenování a jejich patogenita prokazována pomocí různých algoritmů, sledováním segregace u rodinných příslušníků. V některých případech bylo přistoupeno i k funkčním studiím, např. analýze sestřihu. U pacientů s Fuchsovou endotelovou dystrofií rohovky (FECD) bylo provedeno genotypování trinukleotidové repetice v genu *TCF4*.

**Výsledky:** Celkem bylo klinicky charakterizováno a ve formě publikačních výstupů zpracována molekulárně genetická příčina u 44 českých pacientů z 19 rodin s různými monogenně děděnými dystrofiemi a vývojovými anomáliemi rohovky. Studované klinické jednotky zahrnovaly mřížkovou dystrofii, Schnyderovu dystrofii, zadní polymorfni dystrofii (PPCD) typ 3, kongenitální hereditární endotelovou dystrofii, cornea plana a syndrom křehkých rohovek. Nejvýznamnější byl objev *GRHL2* jako nového genu, jehož mutace způsobují PPCD typ 4, což umožnilo prokázat, že společným mechanismem známých typů PPCD je abnormální aktivace epitel-mezenchymální tranzice rohovkového epitelu. Genotypování 132 českých pacientů s FECD vedlo k průkazu přítomnosti repetice u 107 (81,1 %). Podařilo se také shromáždit z diferenciálně diagnostického hlediska unikátní soubor 6 případů vzácné paraproteinové keratopatie.

**Závěr:** Správně provedená a interpretovaná molekulárně genetická analýza potvrdila onemocnění u postižených jedinců, identifikovala rodinné příslušníky rizikové pro vznik dědičné nemoci, pomohla v odhadu její prognózy a začlenila se tak do standardní klinické praxe. Získané poznatky byly využity v prevenci rozvoje a progresu této skupiny chorob a jejich komplikací.

**Klíčová slova:** dědičná onemocnění rohovky, genotypování, genetické poradenství, prevence

## SUMMARY

**Introduction:** The development of molecular genetic methods has in many fields necessitated their inclusion in routine clinical practice, including ophthalmology. The main aim of this thesis was detailed clinical characterization of Czech patients with suspected inherited corneal disorders, followed by genetic testing to determine or specify their clinical diagnosis and subsequently to use the knowledge gained in clinical and genetic counselling and to apply preventive measures in order to avoid loss of vision.

**Material and Methods:** Individuals included in this research were either followed up or newly referred to the Cornea clinic of the Department of Ophthalmology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague. Detailed clinical examination included corneal tomography, specular microscopy, spectral domain optical coherence tomography, biometry and genealogical analysis. DNA was extracted from peripheral blood leucocytes or buccal cells. Disease-causing variants were searched for using Sanger or massively parallel sequencing, variant pathogenicity was assessed in silico using various algorithms and by segregation analyses within the families. In some cases assessment of the functional impact on the pre-mRNA splicing process was performed. In patients with Fuchs endothelial corneal dystrophy (FECD) CTG triplet repeat in *TCF4* was genotyped.

**Results:** In total, 44 Czech patients from 19 families with various monogenic corneal disorders were characterized and their clinical and molecular genetic findings reported in scientific literature. The disorders studied included lattice corneal dystrophy, Schnyder corneal dystrophy, posterior polymorphous corneal dystrophy (PPCD) type 3, congenital hereditary endothelial dystrophy, cornea plana, and brittle cornea syndrome. The most important discovery was that mutations in a novel gene *GRHL2* cause PPCD type 4. This has enabled to prove that abnormal activation of epithelial-to-mesenchymal transition in corneal endothelial cells is a common mechanism implicated in all currently known PPCD types. Genotyping of 132 Czech individuals with FECD found repeat expansion in 107 (81.1%). A unique group of 6 cases with rare paraproteinemic keratopathy was also collected as a part of differential diagnostic procedure.

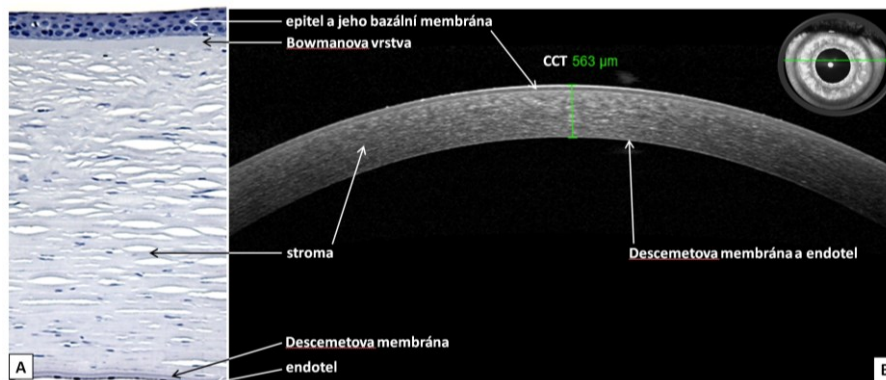
**Conclusion:** Correctly performed and interpreted molecular genetic analysis confirmed the suspected diagnoses, identified family members at risk, helped to estimate prognosis and improved clinical counselling. The results were used in the prevention of development and progression of inherited corneal disorders and their complications.

**Key words:** inherited corneal disorders, genotyping, genetic counselling, preventive measures

# 1 ÚVOD

## 1.1 Základní charakteristika rohovky

Fyziologická rohovka je bezcévná a čirá tkáň, která propouští a láme světlo vstupující do oka. Ze všech komponent oka má největší lomivou sílu s hodnotou 40,0 až 44,0 dioptrií. Rohovka je tvořena pěti základními vrstvami: epitelem a jeho bazální membránou, Bowmanovou vrstvou, stromatem, Descemetovou membránou a endotelem (Obrázek 1). Změna v jejím zakřivení nebo poškození struktury a funkce jednotlivých vrtev rohovky, jež má za následek snížení až ztrátu průhlednosti, vede ke klinicky signifikantnímu poklesu zrakové ostrosti.



**Obrázek 1.** Stavba rohovky

(A) Histologický řez lidskou rohovkou obarvenou hematoxylinem-eosinem a (B) její zobrazení pomocí předně-segmentového SD-OCT. CCT - centrální tloušťka rohovky. Za poskytnutí histologického snímku děkuji doc. Mgr. Kateřině Jirsově, Ph.D. z Laboratoře biologie a patologie oka, Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. LF UK a VFN v Praze.

## 1.2 Dědičná onemocnění rohovky

Hereditární onemocnění rohovky představují heterogenní skupinu chorob, které lze etiologicky rozdělit na monogenně podmíněné řídicí se Mendelovými zákony a komplexní. Monogenně dědičné choroby rohovky jsou vzácné, tj. postihují méně než 5 osob na 10 000 obyvatel, a jejich vznik je výsledkem vlivu jedné či dvou patogenních variant v jediném genu (Aronson 2006; Klintworth 2009). Etiopatogeneze častějších komplexních chorob rohovky je dána interakcí mezi genetickými faktory a zevním prostředím (Macek 2019). V současné době rozlišujeme více než třicet různých chorob rohovky s Mendelovským typem dědičnosti, jedná se o rohovkové dystrofie a různé vývojové poruchy ovlivňující její velikost nebo zakřivení. Nejčastějšími představiteli komplexních chorob jsou pak keratokonus a Fuchsova endotelová dystrofie rohovky.

### 1.2.1 Rohovkové dystrofie

Dystrofie rohovky je skupina chorob, které bývají oboustranně symetrické, pomalu progredující s časnou manifestací (většinou v prvních dvou dekádách života), bez výskytu primární vaskularizace, zánětu a systémového postižení (Klintworth 2009). Rohovkové dystrofie se člení na základě lokalizace nejvýraznějších změn na epitelové a subepitelové, epitelostromální, stromální a endotelové (Weiss et al. 2015; Lisch a Weiss 2019). Vzhledem k tomu, že jednotlivé dystrofie nelze někdy spolehlivě odlišit jen na základě klinického obrazu, bere nejmodernější klasifikace v potaz i jejich molekulárně genetickou podstatu (Weiss et al. 2015; Lisch a Weiss 2019).

Hlavními klinickými znaky *epitelových a subepitelových* dystrofií jsou drobné léze nejrůznějšího vzhledu nacházející se na úrovni epitelu a jeho bazální membrány, případně i Bowmanovy vrstvy. V populaci je nejčastější dystrofie bazální membrány epitelu (Epithelial basement membrane dystrophy; EBMD), také známá jako Coganova dystrofie rohovky nebo „map-dot-fingerprint“ dystrofie. Vzhledem k tomu, že naprostá většina případů je sporadických, jsou projevy v současné době považovány odborníky za degenerativní nebo poúrazové (Weiss et al. 2015).

**Stromální** dystrofie rohovky jsou charakterizované rozmanitě organizovanými základy v různých vrstvách stromatu. V české populaci se lze nejčastěji setkat s makulární dystrofií rohovky (Macular corneal dystrophy; MCD) s autozomálně recesivní dědičností (AR) a s dystrofiemi rohovky asociovanými s mutacemi v genu *TGFBI* (Transforming growth factor  $\beta$ -induced). Vzácnější je autozomálně dominantní (AD) Schnyderova dystrofie rohovky (Schnyder corneal dystrophy; SCD), jejímž základním znakem je hromadění neesterifikovaného cholesterolu a fosfolipidů ve stromatu. Tato dystrofie je podmíněna mutacemi v genu *UBIAD1* (Ubia prenyltransferase domain-containing protein 1) (Weiss et al. 2007; Orr et al. 2007).

**Endotelové** dystrofie rohovky se projevují změnami endotelu a jeho bazální membrány (Descemetovy membrány). Pokud dojde k výraznějšímu poklesu hustoty endotelových buněk anebo ke ztrátě jejich funkce vlivem morfologických změn, projeví se porucha endotelové bariérové funkce, což vede ke vzniku edému rohovky (Eghrari et al. 2015a; Vedana et al. 2016). Pacienti nejprve popisují vidění jako v mlze nebo „přes igelit“, které se typicky objeví po probuzení a během dne se upraví. S progresí onemocnění je zamlžené vidění trvalé v důsledku neustupujícího prosáknutí rohovky (Vedana et al. 2016; Liskova et al. 2010).

U jedinců evropského původu je nejběžnější Fuchsova endotelová dystrofie rohovky (Fuchs endothelial corneal dystrophy; FECD), která se typicky manifestuje po páté dekádě života a je pomalu progredující (Eghrari a Gottsch 2010; Eghrari et al. 2015a). Onemocnění vykazuje variabilní expresivitu a inkompletní penetranci. Pouze u velmi malé části pacientů lze FECD pozorovat u více členů jedné rodiny, typ přenosu je AD (Magovern et al. 1979; Biswas et al. 2001; Gottsch et al. 2005; Liskova et al. 2007).

Výzkum genetických faktorů podílejících se na etiologii FECD přinesl zcela nový pohled na tuto klinickou jednotku. V roce 2010 byly publikovány výsledky celogenomové asociační studie (genome-wide association study; GWAS), které odhalily silnou souvislost FECD s pozdní manifestací s jednonukleotidovým polymorfismem (single nucleotide polymorphism; SNP) v genu *TCF4* (Transcription factor 4; transkripční faktor 4), jenž se účastní replikace DNA (Baratz et al. 2010). V roce 2012 bylo zjištěno, že 79 % postižených jedinců má v nekódující části genu *TCF4* (intronu 2) expanzi tripletových repetitivních sekvencí CTG ( $\geq 50$  kopií na jedné alele nebo obou alelách) (Wieben et al. 2012). Tato expanze je v literatuře standardně označována jako CTG18.1. Transkripty obsahující expandované kopie CUG repetyce se hromadí v endotelových buňkách pacientů s FECD jako oddělená jaderná RNA ohniska, podobně jako u jiných onemocnění s expanzí repetitivních sekvencí, například myotonické dystrofie typu 1 (DM1) (Mahadevan et al. 1992; Taneja et al. 1995; Du et al. 2015).

V české populaci se můžeme relativně často setkat se zadní polymorfní dystrofií rohovky (Posterior polymorphous corneal dystrophy; PPCD). Jak vyplývá z názvu, její fenotyp a průběh jsou velmi různorodé (Cibis et al. 1977). V počátečních asymptomatických fázích sledujeme na zadní ploše rohovky polymorfní léze geografického vzhledu, drobné vezikuly a proužkům podobné opacity. S věkem může patologických změn přibývat, postupně dochází k selhání funkce endotelu a vzniká edém celé rohovky, který vyžaduje její transplantaci (Krachmer 1985; Liskova et al. 2018; Studeny et al. 2012). Současně bylo prokázáno, že patologické endotelové buňky proliferují, transformují se v buňky podobné epitelovým a migrují do trámčiny komorového úhlu a duhovky. Tyto změny jsou zodpovědné za adherenci duhovky k rohovce, korektopii zornice a obtížně léčitelný sekundární glaukom (Cibis et al. 1977; Krachmer 1985; Liskova et al. 2010; Liskova et al. 2012). Jde tedy o potenciálně oslepující chorobu s AD dědičností (Krachmer 1985).

Z genetického hlediska rozlišujeme několik typů PPCD: typ 1 je způsoben mutacemi v promotorové regulační oblasti genu *OVOL2* (Ovo-like 2) (Davidson et al. 2016), typ 3 je podmíněn heterozygotními mutacemi v genu kódující transkripční faktor *ZEB1* (Zinc finger e-box-binding homeobox 1) (Krafchak et al. 2005) a typ 4 je dán mutacemi v intronové regulační oblasti genu *GRHL2* (Grainyhead-like 2) (Liskova et al. 2018).

V případě pokročilého nálezu se endotelové dystrofie rohovky léčí jejím nahrazením, přičemž FECD představuje v Evropě a USA v současné době nejčastější indikaci k transplantaci rohovky (Park et al. 2015; Gain et al. 2016; Rock et al. 2017; Flockerzi et al. 2018). V dnešní době je v České republice běžně prováděnou a z klinického hlediska nejúspěšnější technikou zadní lamelární keratoplastika typu DMEK (Descemet membrane endothelial keratoplasty) (Melles et al. 2006).



### **1.2.2 Diferenciální diagnostika rohovkových dystrofií**

Klinická diferenciální diagnostika rohovkových dystrofií je velmi široká (Weiss a Khemichian 2011). Zahrnuje infekční a postinfekční stavy, ale i některé systémové poruchy se mohou projevit ukládáním různých substancí v rohovce ve formě opacit, krystalů či jiných zákalů. Příkladem je hromadění paraproteinů (tzv. paraproteinová keratopatie) u monoklonální expanze lymfocytů (Milman et al. 2015; Lisch et al. 2012, 2016; Glavey a Leung 2016; Dammacco et al. 2019) a vrozené poruchy metabolismu, jež jsou dány poruchou enzymů podílejících se na metabolické přeměně proteinů, aminokyselin, lipidů a mukopolysacharidů (Poll-The et al. 2003).

### **1.2.3 Vývojové anomálie rohovky**

Vrozená vývojová onemocnění rohovky zahrnují klinické jednotky: cornea plana, sklerokornea, megalokornea a mikrokornea. Cornea plana je bilaterální, převážně AR onemocnění vyznačující se plochými rohovkami, nejasným přechodem mezi rohovkou a sklérou, centrálním stromálním zákalem, předčasně vznikajícím *arcus senilis corneae* a nepravidelnou tloušťkou rohovky (Forsius et al. 1998; Ebenezer et al. 2005; Dudakova et al. 2014, 2018). V literatuře je někdy cornea plana zaměňována za sklerokorneu, u které však sklerální tkáň přesahuje přes fyziologickou hranici limbu (Khan 2007).

Velmi vzácným geneticky podmíněným systémovým onemocněním s projevy na rohovce je syndrom křehkých rohovek (Brittle cornea syndrom; BCS1 a BCS2). Ztenčování a vyklenování rohovky a její perforace po minimálním traumatu, popř. dokonce i spontánní perforace, je jednou ze základních charakteristik syndromu. Jedná se o AR onemocnění podmíněné mutacemi v genech *ZNF469* (BCS1) a *PRDM5* (BCS2), které se kromě nálezu na rohovkách, také projevuje u části pacientů nedoslýchavostí až hluchotou, hyperelasticitou kůže, hypermobilitou kloubů, kyfokoliózou a dentálními abnormalitami (Khan et al. 2012; Burkitt Wright et al. 2013; Davidson et al. 2015).

## 2 HLAVNÍ CÍLE PRÁCE

- Identifikovat v české populaci jedince a rodiny s geneticky podmíněnými chorobami rohovky pomocí klinického vyšetření a zobrazovacích metod
- Charakterizovat specifické klinické znaky rozšiřující poznatky o fenotypu
- Odebrat biologický materiál od postižených jedinců a jejich rodinných příslušníků
- Identifikovat patogenní varianty a prokázat její příčinnou souvislost s popsáním fenotypem
- Zavést molekulárně genetické metody do klinické praxe
- Aplikovat poznatky do výzkumu nových cílených léčebných postupů na buněčné úrovni
- Využít získané poznatky v klinickém a genetickém poradenství

### 3 MATERIÁL A METODIKA

Studie byla provedena v souladu s Helsinskou deklarací etických zásad v lékařském výzkumu. Před začátkem byl vypracován informovaný souhlas a informace pro pacienty, které byly projednány a schváleny Etickou komisí VFN v Praze. Pokud studie vznikala ve spolupráci se zahraničním pracovištěm, vždy splňovala podmínky dané etickou komisí v příslušném výzkumném nebo klinickém zařízení, např. etickou komisí v Moorfieldské oční nemocnici, (Moorfields Eye Hospital), Londýn, Velká Británie.

#### 3.1 Klinické vyšetření a genealogická analýza

Pacienti se podrobili detailnímu očnímu vyšetření, které se skládalo z odebrání anamnestických dat, vyšetření nejlépe korigované zrakové ostroty (NKZO), měření nitroočního tlaku, fotografie předního segmentu oka a vyšetření fundu v mydriáze. Ze zobrazovacích metod jsme použili rohovkový tomograf, bezkontaktní endotelový zrcadlový mikroskop, optickou koherenční tomografii se spektrální doménou (SD-OCT) a ke zjištění keratometrie, hloubky přední komory, horizontálního rozměru rohovky, axiální délky bulbu přístroj IOLMaster V.5.

Zakreslení rodokmenu probíhalo pomocí programu HaploPainter. Mendelovský typ dědičnosti byl odhadován dle rodinné anamnézy a klinického nálezu. U sporadických pacientů vykazující známky dominantního onemocnění byl zvažován možný výskyt mutace *de novo*.

#### 3.2 Laboratorní vyšetření

DNA z leukocytů byla izolována ze vzorku venózní krve pomocí kitu Gentra Puregene Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Izolace DNA z buněk bukalní sliznice ze vzorku slin probíhala pomocí kitu Oragene kit (Oragene OG-300, DNA Genotek, Canada).

Amplifikace DNA (polymerázová řetězová reakce; PCR) byla provedena pomocí námi navržených nebo již publikovaných primerů (odkazy anebo jejich sekvence jsou uvedeny v jednotlivých přílohách k této práci). Sangerovo sekvenování PCR produktů bylo realizováno na kapilárním sekvenátoru ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA). Sekvenování nové generace (masivní paralelní sekvenování), tj. exomové sekvenování (screening kódujících úseků všech genů), genomové sekvenování nebo hluboké amplikonové sekvenování bylo odesíláno do velkých servisních laboratoří (např. Macrogen, Jižní Korea a Novogene, Čína). V naší laboratoři probíhalo zpracování dat, anotace a vyhodnocování vlivu detekovaných variant a funkční průkazy jejich patogenity.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Mřížková dystrofie rohovky

Příloha 1: Novel *TGFBI* mutation p.(Leu558Arg) in a lattice corneal dystrophy patient

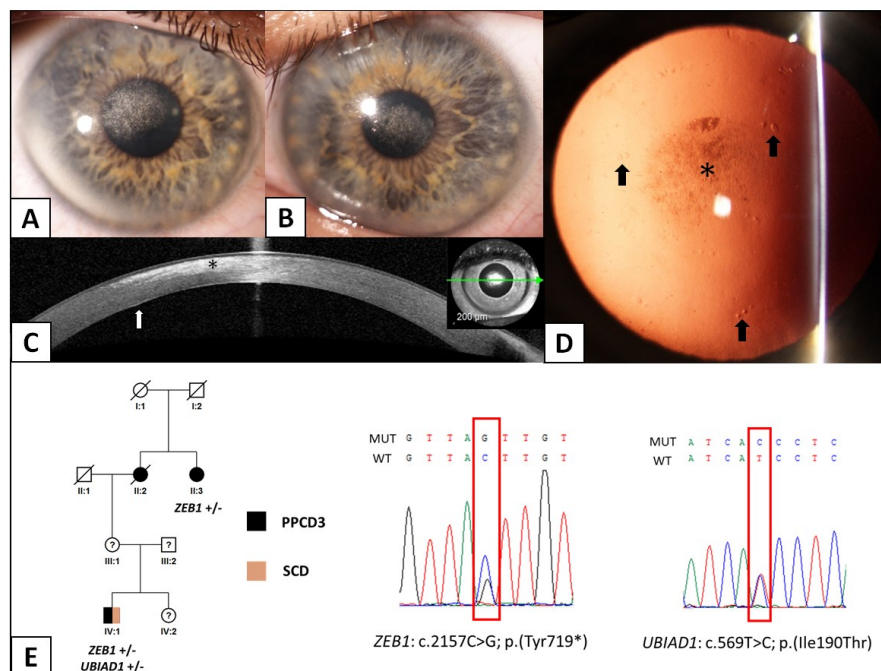
U 53leté probandky s klinickými znaky mřížkové dystrofie rohovky byla nalezena nová heterozygotní varianta v exonu 12 genu *TGFBI*, která byla zodpovědná za aminokyselinovou záměnu p.(Leu558Arg).

### 4.2 Schnyderova dystrofie rohovky

Příloha 2: Schnyder corneal dystrophy and associated phenotypes caused by novel and recurrent mutations in the *UBIAD1* gene

Příloha 3: Coincidental occurrence of Schnyder corneal dystrophy and posterior polymorphous corneal dystrophy type 3

Příkladem nutnosti přesného popisu klinického nálezu v kontextu cíleného genetického testování je případ 30letého muže s již známou mutací pro zadní polymorfni dystrofii typu 3 (PPCD3) v genu *ZEB1* a současně novou heterozygotní mutací v genu *UBIAD1* prokazující současně i přítomnost Schnyderovy dystrofie rohovky (Příloha 3) (Obrázek 2).



**Obrázek 2.** Výsledky klinického vyšetření a genetického testování 30letého muže s přítomnými mutacemi pro PPCD3 a Schnyderovu dystrofií rohovky

(A) Pravá rohovka s krystalovými depozity v centru a neúplným *arcus lipoides* v temporální dolní periférii a (B) levá rohovka s menším množstvím krystalových depozit. (C) Řez rohovkou z předně-segmetového SD-OCT dokumentuje změny převážně v předním stromatu (hvězdička) odpovídající krystalovým depozitům a šipka ukazuje na nerovnost zadní plochy rohovky. (D) V retroiluminaci zachycené změny na zadní ploše pravé rohovky typické pro PPCD3 jsou označeny šipkou a změny typické pro Schnyderovu dystrofií rohovky jsou označeny hvězdičkou. (E) Rodokmen a sekvenogram znázorňující zjištěné heterozygotní mutace c.2157C>G; p.(Tyr719\*) v genu *ZEB1* způsobující PPCD3 a c.569T>C; p.(Ile190Thr) v genu *UBIAD1* způsobující Schnyderovu dystrofií rohovky. PPCD3 – zadní polymorfni dystrofie rohovky typu 3

### 4.3 Fuchsova endotelová dystrofie rohovky

#### Příloha 4: Antisense Therapy for a Common Corneal Dystrophy Ameliorates *TCF4* Repeat Expansion-Mediated Toxicity

Vyšetřili jsme a izolovali DNA 132 pacientů s klinickými známkami FECD. Genotypování alely CTG18.1 v intronu 2 genu *TCF4* probíhalo v laboratoři našich zahraničních spolupracovníků pomocí dříve popsané STR metody (Wieben et al. 2012). Jako hranice positivity byla zvolena hodnota  $\geq 50$  opakování tří nukleotidů CTG na jedné alele (Wieben et al. 2012). U 81,1 % jedinců (107/132) byla prokázána přítomnost expanze CTG18.1, z toho ve 3,0 % (4/132) na obou alelách.

### 4.4 Zadní polymorfni dystrofie rohovky typu 4

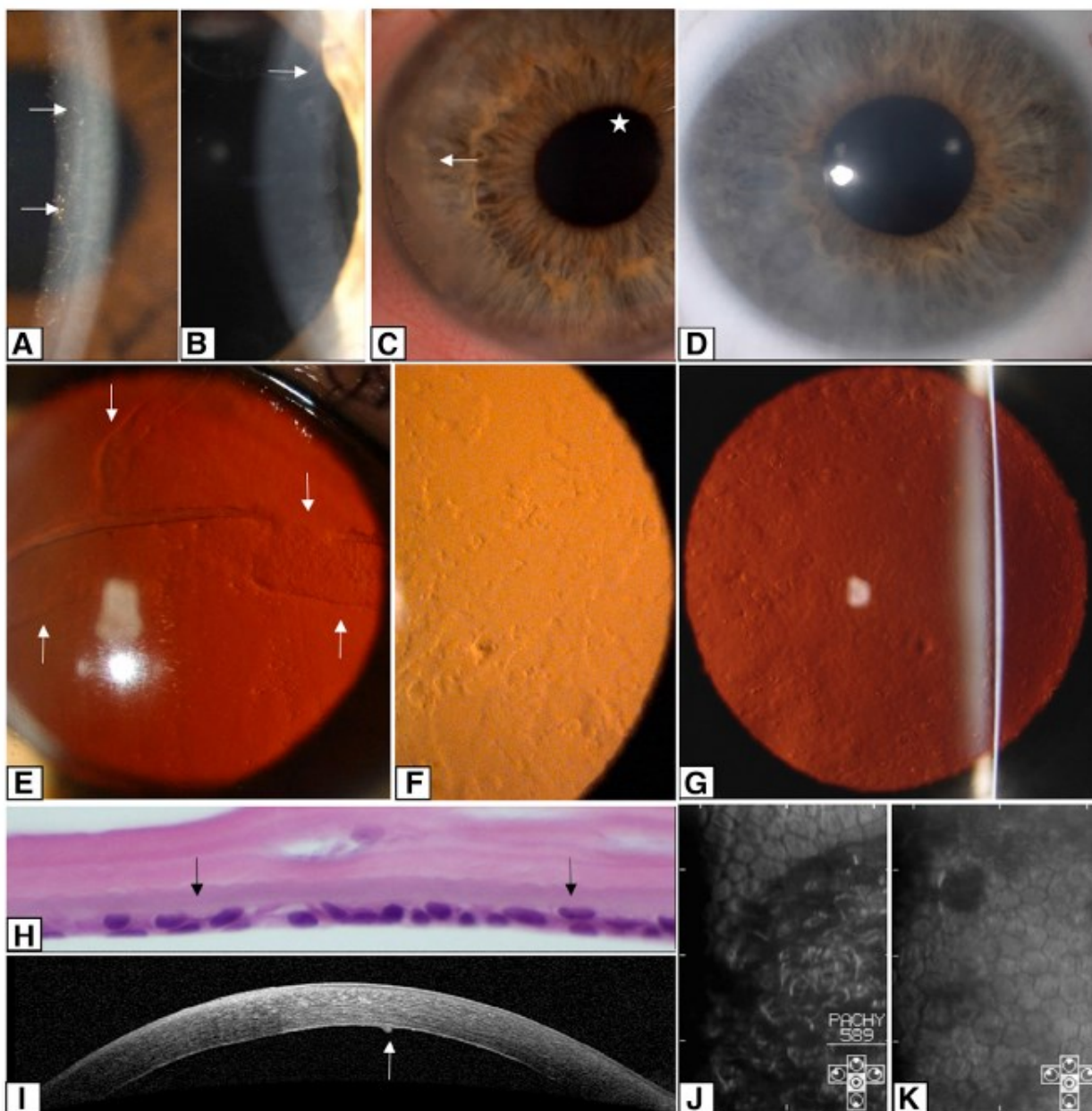
#### Příloha 5: Ectopic *GRHL2* Expression Due to Non-coding Mutations Promotes Cell State Transition and Causes Posterior Polymorphous Corneal Dystrophy 4

Identifikovali jsme rozsáhlou rodinu (C15) se známkami PPCD, u které jsme vyloučili dosud známé genetické příčiny pro toto onemocnění (Liskova et al. 2007, 2012). Při hledání genetické příčiny jsme pokračovali metodou masivního paralelního sekvenování, nejprve jsme provedli exomové sekvenování a to celkem 8 postižených a tří nepostižených jedinců, avšak ani poté nebyla nalezena patogenní mutace, proto jsme přistoupili k vazebné analýze a genomovému sekvenování. Statisticky byla zjištěna vazba na chromozom 8, konkrétně do oblasti 8q22.3-q24.12, což jednoznačně prokázalo existenci nového typu PPCD, který jsme označili jako 4.

Genomové sekvenování bylo provedeno u čtyř velmi vzdálených příbuzných jedinců s typickými známkami PPCD. Tento postup nám umožnil zjistit, jaké heterozygotní varianty tyto jedinci sdílejí v mapované oblasti pro PPCD4. Vzhledem k tomu, že onemocnění je vzácné, byly primárně hledány především unikátní varianty, která nejsou přítomny v žádných kontrolních databázích. Celkem byly nalezeny tři, jejich přítomnost pak byla potvrzena Sangerovým sekvenováním. Dvě varianty byly v nekódujících oblastech mezi geny a jedna se nalézala v intronu 1 genu *GRHL2*. Tato intronová varianta c.20+544G>T byla vyhodnocena, na základě funkce proteinu kódovaným genem *GRHL2*, tj. jeho role v procesu epitelu-mezenchymové tranzice a vzájemnou regulací s již známými geny uplatňujícími se v patogenezi PPCD, jako pravděpodobně patogenní. Tato mutace byla dále zjištěna u dalších nevyřešených PPCD případů, konkrétně ve 3 rodinách českého původu (C23, C26 a C33) bez příbuzenského sňatku.

Vzhledem k tomu, že se oblast, kde se nacházely zjištěné mutace, jevila jako regulační, provedli jsme bioinformatické vyhodnocení jejich možného vlivu. Z této analýzy vyplynulo, že přítomnost varianty c.20+544G>T porušuje vazebné místo pro transkripční faktor, což navozuje odblokování suprese *GRHL2* a tím dochází k dysregulaci procesu epitelu-mezenchymální tranzice. V konečném důsledku dochází ke změně fenotypu endotelových buněk. Expresi *GRHL2*, ke které v normálním endotelu nedochází, jsme prokázali imunohistochemickým vyšetřením rohovkové tkáně získané

od jednoho pacienta z rodiny C23, který prodělal keratoplastiku (Obrázek 3H). Popsali jsme i klinické nálezy u 27 nositelů *GRHL2* mutace c.20+544G>T (Obrázek 3).



**Obrázek 3.** Příklady klinických nálezů u pacientů s PPCD4 zapříčiněnou mutacemi v regulační oblasti genu *GRHL2*

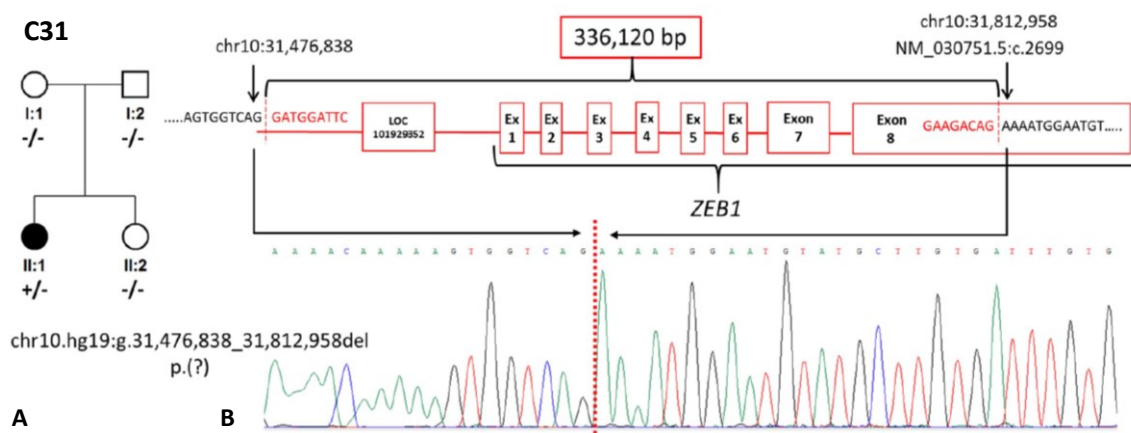
(A) Proužky a vezikuly (šipky) rohovky u 30leté ženy II:4 z rodiny B5. (B) Prominující proužky na zadní ploše rohovky u 46letého muže II:3 z rodiny C23. (C) Subepitelově uložená depozita vápníku (šipka) a korektomie (hvězdička) u 29letého muže VII:6 z C15. (D) Difuzní stromální zašednutí rohovky u 11letého chlapce III:2 z C23. (E-G) V retroiluminaci patrné pruhy (šipky), vezikuly a geografické léze (E) u 53letého muže II:1 z B4, (F) 30leté ženy II:4 z B5, (G) 58letého muže VI:9 z C15. (H) Histologický řez (barvení hematoxylin-eosin, zvětšení 600krát) explantované rohovky 8,5letého chlapce III:2 z C23; endotelové buňky formují dvojitou vrstvu (šipka). (I) Rohovka 58letého muže VI:9 z rodiny C15 zobrazena pomocí předně-segmentového SD-OCT; nepravidelnosti zadní plochy rohovky a šipka ukazuje prominenci na úrovni Descemetovy membrány a endotelu. (J a K) Obrázky endotelu získané pomocí zrcadlového mikroskopu ukazují změny tvaru a velikosti endotelových buněk u (J) 37leté ženy VIII:3 z C15 a (K) 5,5leté dívky II:2 z rodiny C33. Tmavé okrsky bez přítomných endotelových buněk velmi pravděpodobně odpovídají prominencím a nepravidelnostem zadní plochy rohovky. PPCD – zadní polymorfní dystrofie rohovky

## 4.5 Zadní polymorfni dystrofie rohovky typu 3

### Příloha 6: The utility of massively parallel sequencing for posterior polymorphous corneal dystrophy type 3 molecular diagnosis

Část výzkumu byla zaměřena na PPCD typ 3, která je podmíněna haploinsuficiencí a následnou sníženou expresí *ZEB1* v endotelových buňkách rohovky (Liskova et al. 2016). Celkem bylo v *ZEB1* identifikováno 10 nových heterozygotních variant a dvě známé mutace.

U jedné probandky českého původu (rodina C31, II:1) byla molekulárně genetická analýza obzvláště rozsáhlá. Nejprve podstoupila Sangerovo sekvenování, potom exomové a posléze i genomové sekvenování. Až touto poslední metodou byla odhalena částečná delece zahrnující exony 1-7 a část exonu 8 v genu *ZEB1* (Obrázek 4).



**Obrázek 4.** Rodina C31

(A) Genealogické schéma rodiny C31 s *de novo* vzniklou mutací v *ZEB1*; (B) Sekvenogram dokumentuje částečnou deleci chr.10.hg19:g.31 476 838\_31 812 958del zahrnující exony 1-7 a část exonu 8.

## 4.6 Kongenitální hereditární endotelová dystrofie rohovky

### Příloha 7: iPSC-derived corneal endothelial-like cells act as an appropriate model system to assess the impact of *SLC4A11* variants on pre-mRNA splicing

Studovali jsme šest probandů s prokazatelnými klinickými známkami kongenitální hereditární endotelové dystrofie rohovky (CHED). V genu *SLC4A11* bylo identifikováno 11 různých variant vyhodnocených jako patogenní pro CHED, z toho byly čtyři mutace nové.

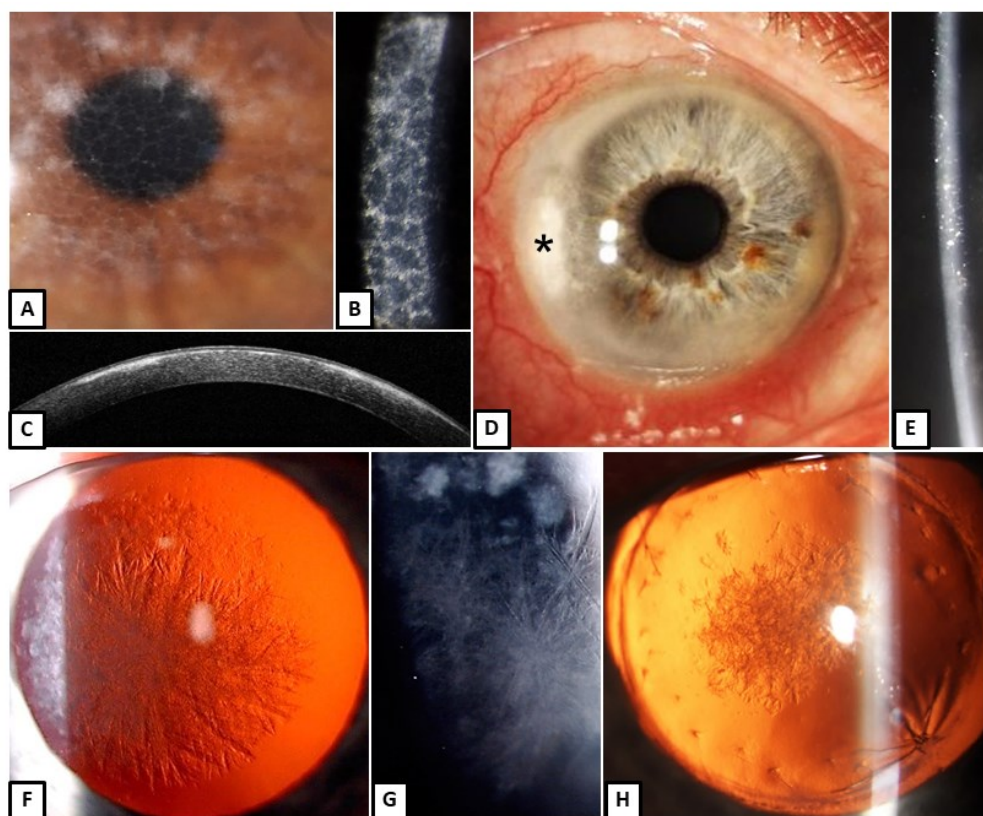
Zraková ostrost očí, které nepodstoupily transplantaci rohovky, se pohybovala od 0,64 u nejmladšího tříletého probanda do 0,01 u 70leté ženy. U poloviny očí se podařilo zdokumentovat významně ztlustělou rohovku v rozmezí od 1032 do 1098  $\mu\text{m}$  (normální hodnoty 510–624  $\mu\text{m}$ ) (Lopez de la Fuente et al. 2016). U čtyř ze šesti jedinců bylo oční postižení kombinováno se sluchovým, přičemž u chlapce z rodiny C5 percepční neprogresivní porucha sluchu vyžadovala od 8,5 let naslouchadla.

## 4.7 Paraproteinová keratopatie

### Příloha 8: Paraproteinemic keratopathy associated with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS): clinical findings in twelve patients including recurrence after keratoplasty

V průběhu výzkumu bylo identifikováno 12 jedinců (9 mužů a 3 ženy), kteří splňovali kritéria pro monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS) manifestující se jako paraproteinová keratopatie, z toho 6 pacientů bylo vyšetřeno v Moorfieldské oční nemocnici.

Klinické obrazy u tří pacientů natolik připomínaly stromální rohovkové dystrofie podmíněné mutacemi v genu *TGFBI*, že bylo nejprve provedeno Sangerovo sekvenování exonů 4, 11–14 (Liskova et al. 2008) k vyloučení mřížkové dystrofie rohovky typu 1 a Thielovy-Behnkeho dystrofie (Obrázek 5A a B). Oční nálezy dalších tří pacientů byly mylně považovány za cystinózu a u jednoho pacienta bylo onemocnění spojeno s hyperémií spojivek a recidivujícími episkleritidami (Obrázek 5D). Charakter depozit byl velmi rozmanitý a klinicky se jevily jako lineární, retikulární a granulární, popř. tečkovité a numulární léze (Obrázek 5A, B, F a G). U jednoho pacienta bylo pozorováno difuzní zašednutí stromatu rohovky, u dalších jedinců jsme pak zdokumentovali cirkulární prstencovité zašednutí (Obrázek 5D), depozita podobná krystalům (Obrázek 5E) a povrchní zašednutí rohovky.



**Obrázek 5.** Příklady různorodých klinických očních nálezů u pacientů s paraproteinovou keratopatií asociovanou s monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS)

(A a B) Retikulární a numulární léze a (C) jejich uložení převážně v předním stromatu rohovky (zobrazeno na předně-segmentovém SD-OCT) (#3). (D) Periferní cirkulární prstencovité zašednutí rohovky (D, E) s krystalovými depozity v temporální okraji stromatu rohovky (hvězdička) (#5). (F a G) Větvící se lineární a granulární opacities postihující centrální část rohovky a (H) recidiva podobných depozit na rohovkovém transplantátu (#12).



## 4.8 Cornea plana

### Příloha 9: Analysis of *KERA* in four families with cornea plana identifies two novel mutations

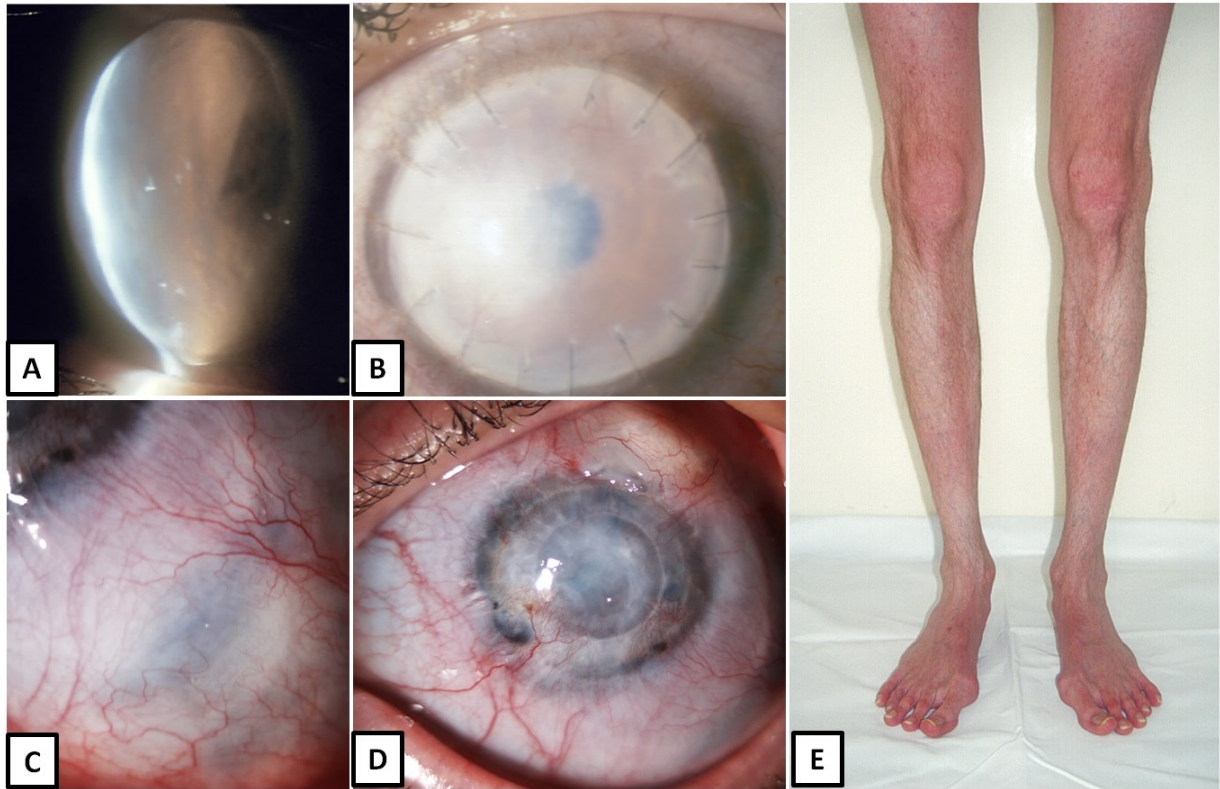
V rámci studia byli vyšetřeni tři jedinci s cornea plana, konkrétně v první rodině dva sourozenci mužského pohlaví ve věku 13 a 20 let a v druhé rodině 70letá žena. U všech vyšetřených osob jsme našli charakteristické klinické znaky pro diagnózu cornea plana. Výjimkou bylo levé oko 20letého muže, u kterého byly naměřeny abnormálně vysoké hodnoty keratometrie (K1/K2 44,47/49,93 dioptrie) a tomu odpovídala myopická a cylindrická korekce. Z dostupné dokumentace vyplynulo, že mezi jeho 18. a 20. rokem života poklesla zraková ostrost z 0,5 na 0,3 a změnila se refrakce v cykloplegii z +3,00/-4,50 x 90° na -4,75/-6,75 x 53°. Vysoká keratometrie byla vysvětlena biomikroskopicky patrným ztenčením a ektázií rohovky, která byla potvrzena pomocí předně-segmentového SD-OCT. Největší ztenčení rohovky bylo naměřeno v její horní periférii (216 μm).

## 4.9 Syndrom křehkých rohovek

### Příloha 10: Brittle cornea syndrome: A systemic review of disease-causing mutations in *ZNF469* and two novel variants identified in a patient followed for 26 years

Proband česko-polského původu byl sledován od tří let věku, kdy byla zjištěna myopie, která v pozdějším dětském věku dosáhla hodnot až -23,0 dioptrií na obou očích. Onemocnění bylo klasifikováno jako oboustranná ektázie a pro hydrops levé rohovky byla ve věku 16,5 let provedena první perforující keratoplastika (Obrázek 6A a B). Vzhledem k selhávání transplantátů následovaly další dvě rekeratoplastiky (Obrázek 6D). Pravé oko bylo poprvé operováno ve věku 26 let pro rozsáhlou perforaci rohovky způsobenou nevelkým tupým traumatem, avšak pooperační období bylo komplikováno netěsností rány a odchlípením sítnice, které vyžadovalo další operace. Také vlivem refrakterního glaukomu na obou očích bylo pravé oko ve 32 letech zcela slepé a levé vnímalo pouze zbytky světla při poslední kontrole ve 42 letech. Jedním z dalších očních klinických znaků syndromu křehkých rohovek je okrskově ztenčená skléra namodralé barvy (Obrázek 6C).

Ze systémových klinických znaků jsme zdokumentovali astenický habitus, mírnou kyfoslózu, klinodaktylii, hallux valgus, skrotální hernii, poruchu sluchu a funkčně nevýznamné postižení srdce, tj. mitrální a trikuspidální insuficienci a nekompletní blok pravého Tawarova raménka (Obrázek 6E). Celkové a oční projevy onemocnění byly příčinou nesprávné diagnózy *de novo* vzniklého Sticklerova syndromu, pod kterou byl veden od 13 do 40 let věku.



**Obrázek 6.** Příklady očních a ostatních klinických znaků u muže se syndromem křehkých rohovek způsobených mutacemi v genu *ZNF469*

(A) Akutní hrops rohovky levého oka (věk 16,5 let), (B) selhání transplantátu jeden rok po první transplantaci rohovky levého oka, (C) detail na tenkou sklěru s prosvítající uveou a (D) vaskularizovaný zašedlý transplantát po třetí transplantaci rohovky levého oka. (E) Astenický habitus a vbočené palce.

Genomové sekvenování odhalilo dvě nové mutace v genu *ZNF469*, jež podpořily námi zamýšlenou změnu diagnózy vysvětlující vzácný rohokový nález a obtížně řešitelné oční komplikace syndromu křehkých rohovek. Sangerovým sekvenováním jsme přítomnost obou patogenních mutací u probanda potvrdili a dále zjistili, že c.1402\_1411del v heterozygotním stavu byla zděděna od otce a její nositelkou je také jedna sestra probanda. U druhé sestry a matky byla nalezena mutace c.1705C>T také v heterozygotním stavu. Sledováním segregace patogenních variant v rodině jsme tedy prokázali, že proband je složeným heterozygotem, což je v souladu s AR dědičností syndromu křehkých rohovek.

## 5 DISKUZE

### 5.1 Charakterizované klinické jednotky

V rámci postgraduálního studia se nám podařilo vyhledat, klinicky charakterizovat, identifikovat a ve formě publikačních výstupů zpracovat molekulárně genetickou příčinu u 44 českých pacientů z 19 rodin s různými dystrofiemi a vývojovými anomáliemi rohovky. Celkem jsme odebrali biologický materiál a izolovali DNA od 236 osob, nalezeno bylo 14 nových a 7 známých mutací. Předpokládaná diagnóza byla genetickým testováním potvrzena u 40 jedinců. Zjištěná molekulárně genetická příčina zcela změnila diagnózu ve čtyřech případech. Negativní nález při genetickém testování napomohl stanovit diagnózu paraproteinové keratopatie namísto zvažované rohovkové dystrofie.

Tato práce rozšiřuje spektrum monogenně podmíněných chorob na území České republiky. Poprvé jsme popsali a geneticky ověřili diagnózu PPCD4 a syndromu křehkých rohovek (Liskova et al. 2018; Skalicka et al. 2019). Objevením variant v novém genu *GRHL2* asociovaném s PPCD4 vedlo k vyčlenění této dystrofie jako samostatné klinické jednotky a přiřazení vlastního čísla v databázi OMIM (Liskova et al. 2018). Detekována byla řada nových mutací v různých genech (Dudakova et al. 2016, 2018, 2019; Evans et al. 2018; Brejchova et al. 2019; Skalicka et al. 2019).

### 5.2 Fenotypová variabilita a korelace s genotypem

Pokud je klinický obraz natolik specifický, že je asociován pouze s mutacemi v jednom genu, lze přikročit k jeho cílenému testování pomocí Sangerova sekvenování. Schnyderova dystrofie rohovky je příkladem onemocnění, kdy lze na základě fenotypových projevů přímo přistoupit ke screeningu konkrétního genu. Tato dystrofie byla před započítáním této práce popsána s určením příčinné mutace pouze v jedné české rodině (Weiss et al. 2008). V rámci postgraduálního studia jsme detekovali další tři pacienty ze tří rodin a provedli u nich screening genu *UBIAD1*, u dvou z nich byla nalezena nová, dosud nepopsaná mutace (Dudakova et al. 2019; Evans et al. 2018). Detailní klinická charakterizace našeho souboru pacientů vedla ke zjištění, že u všech bylo možno nalézt alespoň ve velmi malém okrsku krystaly v rohovkách, což je v kontrastu s literaturou, která udává jejich přítomnost pouze u 54 % jedinců (Weiss 2009). Tuto skutečnost lze vysvětlit malým počtem osob v našem souboru.

U jednoho muže byla pozorována unikátní duální diagnóza dvou vzácných dystrofií rohovek, PPCD3 a Schnyderovy dystrofie. Jde o první popsáný případ výskytu dvou vzácných monogenních rohovkových dystrofií u jednoho jedince (Dudakova et al. 2019).

Podrobně jsme zdokumentovali rohovkový nález, zejména centrální zákal a nepravidelnou tloušťku rohovky, u dvou sourozenců, složených heterozygotů pro dvě nové mutace v genu *KERA*. Přesná přístrojová vyšetření zobrazila plaky v centru rohovky lemované ztenčením, jež rovněž pomocí předně-segmentového OCT popsal Rantala u dvou nepříbuzných finských dětí (Rantala a Majander 2015). Navíc jsme u staršího sourozence zjistili, pro cornea plana, výjimečný klinický nález ektázie

v horní části rohovky projevující se i změnou refrakce. Tento méně obvyklý nález byl v literatuře zaznamenán u jedné ze sester britského původu s recesivně dědičnou cornea plana (Liskova et al. 2007). Také Khan popsal případ 16letého chlapce s ektázií v horní periférii rohovky a vznikem hydrofusu, který spontánně ustoupil po konzervativní léčbě (Khan et al. 2006a).

### **5.3 Přínos molekulárně genetického vyšetření v diferenciální diagnostice**

Společným znakem vzácných chorob, rohovku nevyjímaje, je často pozdní stanovení správné diagnózy. Situaci komplikuje i fakt, že v průběhu let může dojít ke změně fenotypu po opakovaných operacích nebo klinický nález není před transplantací rohovky podrobně zdokumentován a původní diagnózu tak nelze objektivně posoudit. Příkladem je prezentovaný případ muže česko-polského původu, který byl do 13 let sledován s diagnózou keratokonus či jiná ektázie rohovky a následně do 40 let jako Sticklerův syndrom (Skalicka et al. 2019). Nepříznivý průběh onemocnění, poruchy sluchu a celkový habitus pacienta nás vedl k podezření na syndrom křehkých rohovek (BCS), nicméně dle dokumentace byl zvažován i Marfanův syndrom a Ehlersův-Danlosův syndrom, se kterým je BCS často zaměňován (Ramappa et al. 2014).

Lze se domnívat, že řada rohovkových nálezů, včetně paraproteinové keratopatie, byla v minulosti publikována a označena jako rohovkové dystrofie mylně, a to i proto, že nebylo možné prokázat příčinnou mutaci. V české populaci jsme se setkali s paraproteinovou keratopatií asociovanou s MGUS u šesti pacientů, z toho tři byli iniciálně diagnostikováni jako rohovkové dystrofie a jedna žena jako cystinóza (Skalicka et al. 2019).

Depozita monoklonálních imunoglobulinů se ukládala v různých částech a vrstvách rohovky, vyjma endotelu. Pozorovali jsme, stejně jako autoři jiných publikací, velkou variabilitu očních nálezů a stále je možné nalézt nové, dosud nepopsané kombinace projevů (Lisch et al. 2012, 2016; Milman et al. 2015; Wasielica-Poslednik et al. 2019). Prokázali jsme tedy, že diferenciální diagnostika rohovkových dystrofií a paraproteinové keratopatie může být komplikovaná, proto jsme do vyšetřovacího postupu nevysvětlitelných bilaterálních depozit zařadili i krevní testy k vyloučení paraproteinémie (monoklonální gamapatie).

U poloviny českých pacientů však byla zjištěna zraková ostrost 0,5 a nižší. V jednom případě si pokles vidění vyžádal transplantaci rohovky na obou očích. Proto se v případě poklesu zrakové ostrosti, přikláníme k novému konceptu „klinicky signifikantní monoklonální gamapatie“ (Ferland et al. 2018). Dále z našeho pozorování vyplývá, že postiženou skupinou není jen starší populace, ale i jedinci v mladším produktivním věku.

Vzhledem k tomu, že rohovka je snadno přístupný orgán k neinvazivnímu vyšetření, může být oftalmolog první lékař, který odhalí depozita monoklonálních imunoglobulinů a upozorní na paraproteinémii, což může mít pro pacienta zásadní význam v prevenci pozdějších systémových komplikací. Spektrum hematologických chorob, které se vyznačují produkcí monoklonálních

imunoglobulinů, je totiž široké, od benigních po maligní: monoklonální gamapatie nejasného významu (monoclonal gammopathy of undetermined significance; MGUS), mnohočetný myelom, plazmacytom, Waldenströmova makroglobulinémie, chronický lymfocytární lymfom a jiné low grade lymfomy (Kyle et al. 2006).

#### **5.4 Význam masivního paralelního sekvenování**

U onemocnění způsobených mutacemi v mnoha genech nebo v genech extrémně dlouhých se v poslední době využívá masivní paralelní sekvenování, které umožňuje vyšetření mnoha úseků genomu a současně nad určitou velikost je ekonomicky výhodnější. Prokázali jsme přínos masivního paralelního sekvenování při identifikaci mutací způsobujících BCS a PPCD3 a 4 (Liskova et al. 2018; Skalicka et al. 2019; Dudakova et al. 2019).

#### **5.5 Průkaz příčinné souvislosti mezi variantou a fenotypem**

Všechny níže uvedené logické kroky při prokazování fenotypu byly v roce 2015 sepsány a vydány jako doporučení Americké společnosti lékařské genetiky a genomiky. Bylo doporučeno hodnotit zjištěné varianty na pětistupňové škále jako patogenní, pravděpodobně patogenní, varianty neznámého významu, pravděpodobně benigní a benigní (Richards et al. 2015).

Prvním krokem při zjištění varianty je její hledání v populačních databázích, které obsahují vzorky nepříbuzných, předpokládá se, zdravých jedinců. Mezi největší, a námi nejčastěji používané, patří Genome Aggregation Database (gnomAD) a česká databáze spravovaná Národním centrem lékařské genomiky. Vyskytuje-li se varianta, o které se snažíme zjistit, zda má vliv na vznik monogenně podmíněného onemocnění, v populaci s vysokou frekvencí, potom je její zásadní vliv na pozorovaný fenotyp vyloučen. V opačném případě je vhodné provést segregaci analýzu u dostupných členů rodiny, nejlépe společně s klinickým vyšetřením.

Druhým krokem je hledání v literatuře a různých internetových databázích (např. Human Gene Mutation Database), zda byla zjištěná varianta již popsána v souvislosti s nalezeným fenotypem. Pokud ano, je vysoce pravděpodobné, že je zodpovědná za popsáný klinický obraz. Je-li zjištěna nová, dosud nepopsaná varianta, je nutné za pomoci predikčních algoritmů (MutPred, PolyPhen2 apod.) zhodnotit její vliv na fenotyp.

Proto třetím krokem, který nejenže zvýší spolehlivost předchozích procesů, ale zkoumá i patogenetické mechanismy, je funkční analýza. Jelikož neexistuje zvířecí model věrně simulující CHED, byl vyvinut model buněčný. Diferenciace indukovaných pluripotentních kmenových buněk (autologous induced pluripotent stem cells; iPSC) v různé buňky je atraktivní možností, jak testovat choroby (Ebert et al. 2012). V našem případě byl k ověření patogenity nové varianty c.2240+5G>A v genu *SLC4A11* u CHED použit model buňky podobné endotelové. Leukocyty, získané od asymptomatického otce, byly přeprogramovány do stadia pluripotentních buněk a dále

diferenciovány do endotelu se podobajících buněk, které exprimovaly *SLC4A11*. Bylo prokázáno, že nová varianta c.2240+5G>A indukuje aberantní *SLC4A11* pre-mRNA sestřih (Brejchova et al. 2019). Do dnešní doby byly publikovány jen tři studie (Ali et al. 2018; Wagoner et al. 2018; Zhao a Afshari 2016), které diferencovaly iPSC do endotelových buněk rohovky, avšak na rozdíl od naší práce, ještě nikdy nebyly využity pro studium chorob asociovaných s variantami v genu *SLC4A11*.

V případě identifikace variant v genu, který nebyl doposud s daným onemocněním spojován, je třeba také vycházet ze známých mechanismů vzniku obdobných onemocnění. Na základě znalosti jeho funkce je nutné si položit otázku, zda se jedná o vhodný kandidátní gen. Například u genu *GRHL2*, jsme usoudili, že jeho změny by se mohly podílet na etiologii PPCD, neboť se jedná o transkripční faktor, který hraje roli v diferenciaci epitelu a supresi epitelu-mezenchymální tranzice (EMT) (Kitazawa et al. 2016; Xiang et al. 2017). *GRHL2* působí jako přímý transkripční represor *ZEB1* (Frisch et al. 2017). Také se předpokládá, že *GRHL2* se podílí na aktivaci exprese *OVOL2*, je součástí signalizační sítě, která reguluje EMT a stabilizuje specifickou expresi genů v epitelu (Aue et al. 2015). Jelikož se v patogenezi PPCD uplatňuje *ZEB1* haploinsuficience a aberantní ektopická exprese *OVOL2*, jevíla se varianta c.20+544G>T v *GRHL2* jako příčina onemocnění PPCD4, což bylo ověřeno funkční studií a nálezem dalších mutací u jiných pacientů.

## 5.6 Aplikace poznatků do výzkumu cílených léčebných postupů na buněčné úrovni

Znalost příčinné mutace otevírá cestu k budoucím cíleným terapiím, které mohou spočívat v náhradě funkce chorobné alely dodáním alely zdravé genovou terapií nebo zablokováním jejího přepisu pomocí antisense oligonukleotidů. Pro mnoho pacientů s dosud nevléčitelnými onemocněními představují tyto terapie novou nadějí, jedná se totiž o léčbu kauzální, která se neomezuje pouze na zmírňování příznaků.

Jedním ze základních cílů současného výzkumu je zabránit u pacientů s endotelovými dystrofiemi rohovky selhání bariérové funkce endotelu. V tomto ohledu naše práce přispěla v mnoha rovinách. Potvrdili jsme, podobně jako Wieben a kol., že CTG18.1 expanze významně zvyšuje riziko rozvoje FECD u jedinců evropského původu (Wieben et al. 2012; Zarouchlioti et al. 2018). V endotelových buňkách jsme prokázali hromadění transkriptů s expanzí, které vede k ložiskovému vychytávání faktorů účastnících se sestřihu, což se v konečném důsledku pravděpodobně podílí na apoptóze endotelové buňky. Na modelu kultivovaných endotelových buněk získaných od pacientů s klinickými projevy FECD a expanzí CTG18.1 bylo ověřeno, že navázání synteticky připravených oligonukleotidů do krátkého úseku toxického produktu genu *TCF4* vede k jeho vyřazení („antisense“ terapie). Jinými slovy, „antisense“ terapie snížila výskyt toxických RNA ohnisek. Význam tohoto procesu spočívá v prevenci úbytku endotelových buněk, tím je zachována jejich základní bariérová funkce a nedochází ke klinické progresi FECD (Zarouchlioti et al. 2018).

## 5.7 Preventivní aspekty využití získaných poznatků

Včasná detekce geneticky podmíněných onemocnění rohovky je rozhodující pro další péči o postiženého jedince či celou jeho rodinu, nabízí totiž možnost, dle závažnosti nálezu, přizpůsobit frekvenci klinických kontrol. U dětí hraje významnou roli v prevenci vzniku tupozrakosti možnost záchytu onemocnění spojeného s refrakční vadou, jako je například PPCD3 a cornea plana. Nastavení nebo úprava korekce umožňuje snížit stupeň tupozrakosti na nejnižší možnou míru. U dětí s CHED je pak nutno myslet na možný výskyt poruchy sluchu, její včasnou detekci a řešení např. naslouchadly. To má nemalý význam při začleňování dítěte do kolektivu a vzdělávacího systému státu. Na celý proces navazuje vhodný výběr povolání s ohledem na správně stanovenou oční diagnózu a jejího dalšího očekávaného vývoje.

Konkrétním příkladem včasné a přesné diagnostiky je případ šestileté dívky se Schnyderovou dystrofií rohovky, u které byla zjištěna *de novo* vzniklá mutace (Evans et al. 2018). Němá rodinná anamnéza a záchyt jen diskretních krystalových depozit ve velmi raném věku by mohl bez genetického vyšetření vést k mylné diagnóze infantilní cystinózy. Dalšími diagnózami, které jsme odhalili v předškolním věku, jsou CHED a PPCD3 a 4 (Liskova et al. 2018; Brejchova et al. 2019; Dudakova et al. 2019).

Důkazem nezbytnosti přesné diagnózy vedoucí k zamezení zbytečné léčby s možnými vedlejšími účinky jsou dva bratři, kteří byli od narození sledováni pod jinou diagnózou, dysgeneze předního segmentu oka. Obavy z glaukomu zapříčinily neopodstatněné předepisování kombinované antiglaukomové terapie od raného věku (Dudakova et al. 2018). Potvrzení diagnózy cornea plana na genové úrovni a vyloučení jiných klinických jednotek přispělo ke změně terapeutického plánu, včetně možnosti správně informovat jedince a jejich rodinu o dalším vývoji onemocnění.

Včasná a správná diagnostika je důležitá nejenom z hlediska plánování kariéry a rodičovství, ale může mít i další socioekonomické dopady, např. v podobě redukce nákladů na zbytečná vyšetření, nezřídka opakovaně prováděná. Pro zvláště závažná onemocnění způsobující výrazné snížení zrakové ostrosti a slepotu, v případě monogenních onemocnění rohovky např. BCS nebo CHED, lze uvažovat o preimplantační genetické diagnostice (Hlavata et al. 2016). Předpokladem je právě dokonalé zmapování mutací.

Stanovení příčinné mutace(i) umožňuje poskytnout pacientovi informaci stran přenosu onemocnění v dalších generacích. To je zvláště důležité např. u sporadických pacientů s klinickou charakteristikou AD dědičností, kdy je třeba vysvětlit, proč se onemocnění nevyskytovalo v žádné předcházející generaci. Lze zvažovat tzv. nonpenetranci, kdy jedinec je nositelem vlohy pro onemocnění, ale zjevné klinické známky se u něj neprojeví. Další možností je vznik mutace *de novo*, jak jsme pozorovali např. v jednom případě PPCD4 a u jedné dívky se Schnyderovou dystrofií rohovky.

## 6 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala zpracováním výskytu, popisem fenotypu a molekulárně genetickou analýzou různých dystrofií a některých vývojových anomálií rohovky na území České republiky. Zdůrazněn byl dále dopad získaných dat na využití v prevenci vzniku, rozvoje a progresu této skupiny chorob a jejich komplikací s cílem zabránit poklesu či ztrátě zrakové ostrosti.

Genetické testování při správném provedení a interpretaci napomáhá k lepšímu odhadu prognózy vývoje onemocnění, dále vede k identifikaci členů rodiny rizikových pro vznik určitého onemocnění a napomáhá k vývoji a zavedení cílených terapií reflektujících mechanismus vzniku dané choroby. Rohovka, jako snadno přístupná tkáň, se jeví obzvláště vhodná pro tyto nové metody léčby.

Podářilo se učinit několik významných objevů včetně identifikace nového genu, jehož mutace podmiňují PPCD typ 4. Naše práce také prokázala, že všechny typy PPCD mají poruchu na úrovni regulovaných transkripčních faktorů zapojených do epitel-mezenchymální přeměny. Nastínili jsme i možnosti nových terapií pro geneticky podmíněná onemocnění rohovky.

Výsledky postgraduálního studia byly přímo implementovány do klinické praxe zavedením cíleného genetického testování u vybraných pacientů, upřesněním genetického poradenství postiženým jedincům a jejich rodinám a stanovením konkrétních doporučení z hlediska sledování jako prevence vývoje možných sekundárních komplikací.



## SEZNAM WEBOVÝCH ZDROJŮ

1000 Genomes, <http://www.internationalgenome.org/>  
Alibaba 2.1, <http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>  
ClinVar, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>  
dbSNP, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>  
ENCODE, <https://genome.ucsc.edu/ENCODE/>  
Ensembl Genome Browser, <http://www.ensembl.org/index.html>  
Exome Aggregation Consortium (ExAC) Browser, <http://exac.broadinstitute.org/>  
ExomeDepth, <http://cran.r-project.org/web/packages/ExomeDepth/index.html>  
GeneCards, <https://www.genecards.org/>  
GeneMarker Software (SoftGenetics), <https://softgenetics.com/GeneMarker.php>  
Genome Analysis Toolkit (GATK), <https://software.broadinstitute.org/gatk/>  
Genome Aggregation Database (gnomAD) Browser, <http://gnomad.broadinstitute.org/>  
Genomes of the Netherlands (GoNL), <http://www.nlgenome.nl/search/>  
HaploPainter, <http://haploPainter.sourceforge.net/>  
Human Gene Mutation Database (HGMD), <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>  
Human Genome Variation Society, <https://www.hgvs.org/>  
Human Splicing Finder (HSF), <https://www.genomnis.com/access-hsf>  
Interactive Genomics Viewer (IGV), <http://www.broadinstitute.org/software/igv/>  
Kaviar Browser, <http://db.systemsbiology.net/kaviar/>  
Locus Specific Database, <https://databases.lovd.nl/shared/genes/SLC4A11>  
MatInspector, <http://www.genomatix.de/index.html>  
MaxEntScan, [http://hollywood.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan\\_scoreseq.html](http://hollywood.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html)  
MutationTaster, <http://www.mutationtaster.org/>  
MutPred2, <http://mutpred.mutdb.org/>  
Národní centrum lékařské genomiky (The Czech National Center for Medical Genomics), <http://ncmg.cz/en>  
NCBI Genome build GRCh38, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly?term=GRCh38&cmd=DetailsSearch>  
NetGene, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>  
NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) Exome Variant Server, <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>  
NNSplice, [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)  
Novoalign, <http://www.novocraft.com/products/novoalign/>  
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.omim.org/>  
PolyPhen2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>  
PROVEAN and SIFT, <http://provean.jcvi.org/index.php>  
PubMed, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>  
RefSeq, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>  
SAMtools, <http://www.htslib.org/>  
Scopus, <https://www.scopus.com/>  
SeattleSeq Annotation, <http://snp.gs.washington.edu/SeattleSeqAnnotation150/>  
Sequence Variant Nomenclature, <http://varnomen.hgvs.org/>  
SNP&GO, <http://snps.biofold.org/snps-and-go/snps-and-go.html>  
UCSC Genome Browser, <https://genome.ucsc.edu/>  
UK10K Consortium, <http://www.uk10k.org/>  
UniProt, <https://www.uniprot.org/>  
Variant Effect Predictor, [http://useast.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Tools/VEP](http://useast.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/VEP)

## LITERATURA

- Ali, M., S. Y. Khan, S. Vasanth, M. R. Ahmed, R. Chen, C. H. Na, J. J. Thomson, C. Qiu, J. D. Gottsch, and S. A. Riazuddin. 2018. 'Generation and Proteome Profiling of PBMC-Originated, iPSC-Derived Corneal Endothelial Cells', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 59: 2437-44.
- Aronson, J. K. 2006. 'Rare diseases and orphan drugs', *Br J Clin Pharmacol*, 61: 243-5.
- Aue, A., C. Hinze, K. Walentin, J. Ruffert, Y. Yurtdas, M. Werth, W. Chen, A. Rabien, E. Kilic, J. D. Schulzke, M. Schumann, and K. M. Schmidt-Ott. 2015. 'A Grainyhead-Like 2/Ovo-Like 2 Pathway Regulates Renal Epithelial Barrier Function and Lumen Expansion', *J Am Soc Nephrol*, 26: 2704-15.
- Baratz, K. H., N. Tosakulwong, E. Ryu, W. L. Brown, K. Branham, W. Chen, K. D. Tran, K. E. Schmid-Kubista, J. R. Heckenlively, A. Swaroop, G. Abecasis, K. R. Bailey, and A. O. Edwards. 2010. 'E2-2 protein and Fuchs's corneal dystrophy', *N Engl J Med*, 363: 1016-24.
- Biswas, S., F. L. Munier, J. Yardley, N. Hart-Holden, R. Perveen, P. Cousin, J. E. Sutphin, B. Noble, M. Batterbury, C. Kielty, A. Hackett, R. Bonshek, A. Ridgway, D. McLeod, V. C. Sheffield, E. M. Stone, D. F. Schorderet, and G. C. Black. 2001. 'Missense mutations in COL8A2, the gene encoding the alpha2 chain of type VIII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy', *Hum Mol Genet*, 10: 2415-23.
- Brejchova, K., L. Dudakova, P. Skalicka, R. Dobrovolny, P. Masek, M. Putzova, M. Moosajee, S. J. Tuft, A. E. Davidson, and P. Liskova. 2019. 'iPSC-Derived Corneal Endothelial-like Cells Act as an Appropriate Model System to Assess the Impact of SLC4A11 Variants on Pre-mRNA Splicing', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 60: 3084-90.
- Burkitt Wright, E. M., L. F. Porter, H. L. Spencer, J. Clayton-Smith, L. Au, F. L. Munier, S. Smithson, M. Suri, M. Rohrbach, F. D. Manson, and G. C. Black. 2013. 'Brittle cornea syndrome: recognition, molecular diagnosis and management', *Orphanet J Rare Dis*, 8: 68.
- Cibis, G. W., J. A. Krachmer, C. D. Phelps, and T. A. Weingeist. 1977. 'The clinical spectrum of posterior polymorphous dystrophy', *Arch Ophthalmol*, 95: 1529-37.
- Dammacco, R., G. Merlini, W. Lisch, T. T. Kivela, E. Giancipoli, A. Vacca, and F. Dammacco. 2019. 'Amyloidosis and Ocular Involvement: an Overview', *Semin Ophthalmol*: 1-20.
- Davidson, A. E., E. Borasio, P. Liskova, A. O. Khan, H. Hassan, M. E. Cheetham, V. Plagnol, F. S. Alkuraya, S. J. Tuft, and A. J. Hardcastle. 2015. 'Brittle cornea syndrome ZNF469 mutation carrier phenotype and segregation analysis of rare ZNF469 variants in familial keratoconus', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 56: 578-86.
- Davidson, A. E., P. Liskova, C. J. Evans, L. Dudakova, L. Noskova, N. Pontikos, H. Hartmannova, K. Hodanova, V. Stranecky, Z. Kozmik, H. J. Levis, N. Idigo, N. Sasai, G. J. Maher, J. Bellingham, N. Veli, N. D. Ebenezer, M. E. Cheetham, J. T. Daniels, C. M. Thaug, K. Jirsova, V. Plagnol, M. Filipec, S. Knoch, S. J. Tuft, and A. J. Hardcastle. 2016. 'Autosomal-Dominant Corneal Endothelial Dystrophies CHED1 and PCD1 Are Allelic Disorders Caused by Non-coding Mutations in the Promoter of OVOL2', *Am J Hum Genet*, 98: 75-89.
- Du, J., R. A. Aleff, E. Soragni, K. Kalari, J. Nie, X. Tang, J. Davila, J. P. Kocher, S. V. Patel, J. M. Gottesfeld, K. H. Baratz, and E. D. Wieben. 2015. 'RNA toxicity and missplicing in the common eye disease fuchs endothelial corneal dystrophy', *J Biol Chem*, 290: 5979-90.
- Dudakova, L., C. J. Evans, N. Pontikos, N. J. Hafford-Tear, F. Malinka, P. Skalicka, A. Horinek, F. L. Munier, N. Voide, P. Studeny, L. Vanikova, T. Kubena, K. E. Rojas Lopez, A. E. Davidson, A. J. Hardcastle, S. J. Tuft, and P. Liskova. 2019. 'The utility of massively parallel sequencing for posterior polymorphous corneal dystrophy type 3 molecular diagnosis', *Exp Eye Res*, 182: 160-66.
- Dudakova, L., M. Palos, A. J. Hardcastle, and P. Liskova. 2014. 'Corneal endothelial findings in a Czech patient with compound heterozygous mutations in KERA', *Ophthalmic Genet*, 35: 252-4.
- Dudakova, L., M. Palos, K. Jirsova, P. Skalicka, P. Dunder, and P. Liskova. 2016. 'Novel TGFBI mutation p.(Leu558Arg) in a lattice corneal dystrophy patient', *Ophthalmic Genet*, 37: 473-74.
- Dudakova, L., P. Skalicka, A. E. Davidson, and P. Liskova. 2019. 'Coincidental Occurrence of Schnyder Corneal Dystrophy and Posterior Polymorphous Corneal Dystrophy Type 3', *Cornea*, 38: 758-60.
- Dudakova, L., J. H. J. Vercreyssen, I. Balikova, L. Postolache, B. P. Leroy, P. Skalicka, and P. Liskova. 2018. 'Analysis of KERA in four families with cornea plana identifies two novel mutations', *Acta Ophthalmol*, 96: e87-e91.
- Ebenezer, N. D., C. B. Patel, S. M. Hariprasad, L. L. Chen, R. J. Patel, A. J. Hardcastle, and R. C. Allen. 2005. 'Clinical and molecular characterization of a family with autosomal recessive cornea plana', *Arch Ophthalmol*, 123: 1248-53.
- Ebert, A. D., P. Liang, and J. C. Wu. 2012. 'Induced pluripotent stem cells as a disease modeling and drug screening platform', *J Cardiovasc Pharmacol*, 60: 408-16.
- Eghrari, A. O., and J. D. Gottsch. 2010. 'Fuchs' corneal dystrophy', *Expert Rev Ophthalmol*, 5: 147-59.
- Eghrari, A. O., S. A. Riazuddin, and J. D. Gottsch. 2015. 'Fuchs Corneal Dystrophy', *Prog Mol Biol Transl Sci*, 134: 79-97.
- Evans, C. J., L. Dudakova, P. Skalicka, G. Mahelkova, A. Horinek, A. J. Hardcastle, S. J. Tuft, and P. Liskova. 2018. 'Schnyder corneal dystrophy and associated phenotypes caused by novel and recurrent mutations in the UBIAD1 gene', *BMC Ophthalmol*, 18: 250.
- Fernand, J. P., F. Bridoux, A. Dispenzieri, A. Jaccard, R. A. Kyle, N. Leung, and G. Merlini. 2018. 'Monoclonal gammopathy of clinical significance: a novel concept with therapeutic implications', *Blood*, 132: 1478-85.

- Flockerzi, E., P. Maier, D. Bohringer, H. Reinshagen, F. Kruse, C. Cursiefen, T. Reinhard, G. Geerling, N. Torun, B. Seitz, and Contributors all German Keratoplasty Registry. 2018. 'Trends in Corneal Transplantation from 2001 to 2016 in Germany: A Report of the DOG-Section Cornea and its Keratoplasty Registry', *Am J Ophthalmol*, 188: 91-98.
- Forsius, H., M. Damsten, A. W. Eriksson, J. Fellman, S. Lindh, and E. Tahvanainen. 1998. 'Autosomal recessive cornea plana. A clinical and genetic study of 78 cases in Finland', *Acta Ophthalmol Scand*, 76: 196-203.
- Frisch, S. M., J. C. Farris, and P. M. Pifer. 2017. 'Roles of Grainyhead-like transcription factors in cancer', *Oncogene*, 36: 6067-73.
- Gain, P., R. Jullienne, Z. He, M. Aldossary, S. Acquart, F. Cognasse, and G. Thuret. 2016. 'Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking', *JAMA Ophthalmol*, 134: 167-73.
- Glavey, S. V., and N. Leung. 2016. 'Monoclonal gammopathy: The good, the bad and the ugly', *Blood Rev*, 30: 223-31.
- Gottsch, J. D., O. H. Sundin, S. H. Liu, A. S. Jun, K. W. Broman, W. J. Stark, E. C. Vito, A. K. Narang, J. M. Thompson, and M. Magovern. 2005. 'Inheritance of a novel COL8A2 mutation defines a distinct early-onset subtype of fuchs corneal dystrophy', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46: 1934-9.
- Hlavata, L., L. Dudakova, M. Trkova, I. Soldatova, P. Skalicka, B. Kousal, and P. Liskova. 2016. 'Preimplantation genetic diagnosis and monogenic inherited eye diseases', *Cesk Slov Oftalmol*, 72: 167-71.
- Khan, A. O. 2007. 'Sclerocornea and cornea plana are distinct entities', *Surv Ophthalmol*, 52: 325; author reply 25-6.
- Khan, A. O., M. A. Aldahmesh, and F. S. Alkuraya. 2012. 'Brittle cornea without clinically-evident extraocular findings in an adult harboring a novel homozygous ZNF469 mutation', *Ophthalmic Genet*, 33: 257-9.
- Khan, A. O., M. Aldahmesh, and B. Meyer. 2006. 'Corneal ectasia and hydrops in a patient with autosomal recessive cornea plana', *Ophthalmic Genet*, 27: 99-101.
- Kitazawa, K., T. Hikichi, T. Nakamura, K. Mitsunaga, A. Tanaka, M. Nakamura, T. Yamakawa, S. Furukawa, M. Takasaka, N. Goshima, A. Watanabe, K. Okita, S. Kawasaki, M. Ueno, S. Kinoshita, and S. Masui. 2016. 'OVOL2 Maintains the Transcriptional Program of Human Corneal Epithelium by Suppressing Epithelial-to-Mesenchymal Transition', *Cell Rep*, 15: 1359-68.
- Klintworth, G. K. 2009. 'Corneal dystrophies', *Orphanet J Rare Dis*, 4: 7.
- Krafchak, C. M., H. Pawar, S. E. Moroi, A. Sugar, P. R. Lichter, D. A. Mackey, S. Mian, T. Nairus, V. Elnor, M. T. Schteingart, C. A. Downs, T. G. Kijek, J. M. Johnson, E. H. Trager, F. W. Rozsa, M. N. Mandal, M. P. Epstein, D. Vollrath, R. Ayyagari, M. Boehnke, and J. E. Richards. 2005. 'Mutations in TCF8 cause posterior polymorphous corneal dystrophy and ectopic expression of COL4A3 by corneal endothelial cells', *Am J Hum Genet*, 77: 694-708.
- Krachmer, J. H. 1985. 'Posterior polymorphous corneal dystrophy: a disease characterized by epithelial-like endothelial cells which influence management and prognosis', *Trans Am Ophthalmol Soc*, 83: 413-75.
- Kyle, R. A., T. M. Therneau, S. V. Rajkumar, D. R. Larson, M. F. Plevak, J. R. Offord, A. Dispenzieri, J. A. Katzmann, and L. J. Melton, 3rd. 2006. 'Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance', *N Engl J Med*, 354: 1362-9.
- Lisch, W., P. Saikia, S. Pitz, U. Pleyer, C. Lisch, M. Jaeger, and J. M. Rohrbach. 2012. 'Chameleon-like appearance of immunotactoid keratopathy', *Cornea*, 31: 55-8.
- Lisch, W., J. Wasielica-Poslednik, T. Kivela, U. Schlotzer-Schrehardt, J. M. Rohrbach, W. Sekundo, U. Pleyer, C. Lisch, A. Desuki, H. Rossmann, and J. S. Weiss. 2016. 'The Hematologic Definition of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance in Relation to Paraproteinemic Keratopathy (An American Ophthalmological Society Thesis)', *Trans Am Ophthalmol Soc*, 114: T7.
- Lisch, W., and J. S. Weiss. 2019. 'Clinical and genetic update of corneal dystrophies', *Exp Eye Res*, 186: 107715.
- Liskova, P., L. Dudakova, C. J. Evans, K. E. Rojas Lopez, N. Pontikos, D. Athanasiou, H. Jama, J. Sach, P. Skalicka, V. Stranecky, S. Kmoch, C. Thaug, M. Filipec, M. E. Cheetham, A. E. Davidson, S. J. Tuft, and A. J. Hardcastle. 2018. 'Ectopic GRHL2 Expression Due to Non-coding Mutations Promotes Cell State Transition and Causes Posterior Polymorphous Corneal Dystrophy 4', *Am J Hum Genet*, 102: 447-59.
- Liskova, P., C. J. Evans, A. E. Davidson, M. Zaliova, L. Dudakova, M. Trkova, V. Stranecky, N. Carnt, V. Plagnol, A. L. Vincent, S. J. Tuft, and A. J. Hardcastle. 2016. 'Heterozygous deletions at the ZEB1 locus verify haploinsufficiency as the mechanism of disease for posterior polymorphous corneal dystrophy type 3', *Eur J Hum Genet*, 24: 985-91.
- Liskova, P., M. Filipec, S. Merjava, K. Jirsova, and S. J. Tuft. 2010. 'Variable ocular phenotypes of posterior polymorphous corneal dystrophy caused by mutations in the ZEB1 gene', *Ophthalmic Genet*, 31: 230-4.
- Liskova, P., R. Gwilliam, M. Filipec, K. Jirsova, S. Reinstein Merjava, P. Deloukas, T. R. Webb, S. S. Bhattacharya, N. D. Ebenezer, A. G. Morris, and A. J. Hardcastle. 2012. 'High prevalence of posterior polymorphous corneal dystrophy in the Czech Republic; linkage disequilibrium mapping and dating an ancestral mutation', *PLoS One*, 7: e45495.
- Liskova, P., P. G. Hysi, D. Williams, J. R. Ainsworth, S. Shah, A. de la Chapelle, S. J. Tuft, and S. S. Bhattacharya. 2007. 'Study of p.N247S KERA mutation in a British family with cornea plana', *Mol Vis*, 13: 1339-47.
- Liskova, P., G. K. Klintworth, B. L. Bowling, M. Filipec, K. Jirsova, S. J. Tuft, S. S. Bhattacharya, A. J. Hardcastle, and N. D. Ebenezer. 2008. 'Phenotype associated with the H626P mutation and other changes in the TGFBI gene in Czech families', *Ophthalmic Res*, 40: 105-8.
- Liskova, P., Q. Prescott, S. S. Bhattacharya, and S. J. Tuft. 2007. 'British family with early-onset Fuchs' endothelial corneal dystrophy associated with p.L450W mutation in the COL8A2 gene', *Br J Ophthalmol*, 91: 1717-8.
- Liskova, P., S. J. Tuft, R. Gwilliam, N. D. Ebenezer, K. Jirsova, Q. Prescott, R. Martincova, M. Pretorius, N. Sinclair, D. L. Boase, M. J. Jeffrey, P. Deloukas, A. J. Hardcastle, M. Filipec, and S. S. Bhattacharya. 2007. 'Novel mutations in

- the ZEB1 gene identified in Czech and British patients with posterior polymorphous corneal dystrophy', *Hum Mutat*, 28: 638.
- Lopez de la Fuente, C., A. Sanchez-Cano, F. Segura, E. O. Hospital, and I. Pinilla. 2016. 'Evaluation of Total Corneal Thickness and Corneal Layers With Spectral-Domain Optical Coherence Tomography', *J Refract Surg*, 32: 27-32.
- Macek, M., Jr. 2019. 'Rare diseases in the year 2019 - the Czech and international context', *Cas Lek Cesk*, 158: 33-37.
- Magovern, M., G. R. Beauchamp, J. W. McTigue, B. S. Fine, and R. C. Baumiller. 1979. 'Inheritance of Fuchs' combined dystrophy', *Ophthalmology*, 86: 1897-923.
- Mahadevan, M., C. Tsilfidis, L. Sabourin, G. Shutler, C. Amemiya, G. Jansen, C. Neville, M. Narang, J. Barcelo, K. O'Hoy, and et al. 1992. 'Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene', *Science*, 255: 1253-5.
- Melles, G. R., T. S. Ong, B. Ververs, and J. van der Wees. 2006. 'Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK)', *Cornea*, 25: 987-90.
- Milman, T., A. A. Kao, D. Chu, M. Gorski, A. Steiner, C. Z. Simon, C. Shih, A. J. Aldave, R. C. Eagle, Jr., F. A. Jakobiec, and I. Udell. 2015. 'Paraproteinemic Keratopathy: The Expanding Diversity of Clinical and Pathologic Manifestations', *Ophthalmology*, 122: 1748-56.
- Orr, A., M. P. Dube, J. Marcadier, H. Jiang, A. Federico, S. George, C. Seamone, D. Andrews, P. Dubord, S. Holland, S. Provost, V. Mongrain, S. Evans, B. Higgins, S. Bowman, D. Guernsey, and M. Samuels. 2007. 'Mutations in the UBIAD1 gene, encoding a potential prenyltransferase, are causal for Schnyder crystalline corneal dystrophy', *PLoS One*, 2: e685.
- Park, C. Y., J. K. Lee, P. K. Gore, C. Y. Lim, and R. S. Chuck. 2015. 'Keratoplasty in the United States: A 10-Year Review from 2005 through 2014', *Ophthalmology*, 122: 2432-42.
- Poll-The, B. T., L. J. Mailllette de Buy Wenniger-Prick, P. G. Barth, and M. Duran. 2003. 'The eye as a window to inborn errors of metabolism', *J Inherit Metab Dis*, 26: 229-44.
- Ramappa, M., M. E. Wilson, R. C. Rogers, and R. H. Trivedi. 2014. 'Brittle cornea syndrome: a case report and comparison with Ehlers Danlos syndrome', *J AAPOS*, 18: 509-11.
- Rantala, E., and A. Majander. 2015. 'Anterior segment optical coherence tomography in autosomal recessive cornea plana', *Acta Ophthalmol*, 93: e232-3.
- Richards, S., N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, W. W. Grody, M. Hegde, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding, H. L. Rehm, and Acmg Laboratory Quality Assurance Committee. 2015. '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', *Genet Med*, 17: 405-24.
- Rock, T., J. Landenberger, M. Bramkamp, K. U. Bartz-Schmidt, and D. Rock. 2017. 'The Evolution of Corneal Transplantation', *Ann Transplant*, 22: 749-54.
- Skalicka, P., L. Dudakova, M. Palos, L. J. Huna, C. J. Evans, G. Mahelkova, M. Meliska, T. Stopka, S. Tuft, and P. Liskova. 2019. 'Paraproteinemic keratopathy associated with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS): clinical findings in twelve patients including recurrence after keratoplasty', *Acta Ophthalmol*, 97: e987-e92.
- Skalicka, P., L. F. Porter, K. Brejchova, F. Malinka, L. Dudakova, and P. Liskova. 2019. 'Brittle cornea syndrome: A systemic review of disease-causing mutations in ZNF469 and two novel variants identified in a patient followed for 26 years', *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*.
- Studený, P., K. Jirsova, P. Kuchynka, and P. Liskova. 2012. 'Descemet membrane endothelial keratoplasty with a stromal rim in the treatment of posterior polymorphous corneal dystrophy', *Indian J Ophthalmol*, 60: 59-60.
- Taneja, K. L., M. McCurrach, M. Schalling, D. Housman, and R. H. Singer. 1995. 'Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues', *J Cell Biol*, 128: 995-1002.
- Vedana, G., G. Villarreal, Jr., and A. S. Jun. 2016. 'Fuchs endothelial corneal dystrophy: current perspectives', *Clin Ophthalmol*, 10: 321-30.
- Wagoner, M. D., L. R. Bohrer, B. T. Aldrich, M. A. Greiner, R. F. Mullins, K. S. Worthington, B. A. Tucker, and L. A. Wiley. 2018. 'Feeder-free differentiation of cells exhibiting characteristics of corneal endothelium from human induced pluripotent stem cells', *Biol Open*, 7.
- Wasielica-Poslednik, J., A. Gericke, N. Pfeiffer, and W. Lisch. 2019. '[Paraproteinemic Keratopathy as a Clinical Sign of Monoclonal Gammopathy]', *Klin Monbl Augenheilkd*, 236: 289-94.
- Weiss, J. S. 2009. 'Schnyder corneal dystrophy', *Curr Opin Ophthalmol*, 20: 292-8.
- Weiss, J. S., and A. J. Khemichian. 2011. 'Differential diagnosis of Schnyder corneal dystrophy', *Dev Ophthalmol*, 48: 67-96.
- Weiss, J. S., H. S. Kruth, H. Kuivaniemi, G. Tromp, J. Karkera, S. Mahurkar, W. Lisch, W. J. Dupps, Jr., P. S. White, R. S. Winters, C. Kim, C. J. Rapuano, J. Sutphin, J. Reidy, F. R. Hu, D. W. Lu, N. Ebenezer, and M. L. Nickerson. 2008. 'Genetic analysis of 14 families with Schnyder crystalline corneal dystrophy reveals clues to UBIAD1 protein function', *Am J Med Genet A*, 146A: 271-83.
- Weiss, J. S., H. S. Kruth, H. Kuivaniemi, G. Tromp, P. S. White, R. S. Winters, W. Lisch, W. Henn, E. Denninger, M. Krause, P. Wasson, N. Ebenezer, S. Mahurkar, and M. L. Nickerson. 2007. 'Mutations in the UBIAD1 gene on chromosome short arm 1, region 36, cause Schnyder crystalline corneal dystrophy', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48: 5007-12.

- Weiss, J. S., H. U. Moller, A. J. Aldave, B. Seitz, C. Bredrup, T. Kivela, F. L. Munier, C. J. Rapuano, K. K. Nischal, E. K. Kim, J. Sutphin, M. Busin, A. Labbe, K. R. Kenyon, S. Kinoshita, and W. Lisch. 2015. 'IC3D classification of corneal dystrophies--edition 2', *Cornea*, 34: 117-59.
- Wieben, E. D., R. A. Aleff, N. Tosakulwong, M. L. Butz, W. E. Highsmith, A. O. Edwards, and K. H. Baratz. 2012. 'A common trinucleotide repeat expansion within the transcription factor 4 (TCF4, E2-2) gene predicts Fuchs corneal dystrophy', *PLoS One*, 7: e49083.
- Xiang, J., X. Fu, W. Ran, and Z. Wang. 2017. 'Grhl2 reduces invasion and migration through inhibition of TGFbeta-induced EMT in gastric cancer', *Oncogenesis*, 6: e284.
- Zarouchlioti, C., B. Sanchez-Pintado, N. J. Hafford Tear, P. Klein, P. Liskova, K. Dulla, M. Semo, A. A. Vugler, K. Muthusamy, L. Dudakova, H. J. Levis, P. Skalicka, P. Hysi, M. E. Cheetham, S. J. Tuft, P. Adamson, A. J. Hardcastle, and A. E. Davidson. 2018. 'Antisense Therapy for a Common Corneal Dystrophy Ameliorates TCF4 Repeat Expansion-Mediated Toxicity', *Am J Hum Genet*, 102: 528-39.
- Zhao, J. J., and N. A. Afshari. 2016. 'Generation of Human Corneal Endothelial Cells via In Vitro Ocular Lineage Restriction of Pluripotent Stem Cells', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 57: 6878-84.

## SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORKY

### Publikace k tématu studia

- Brejchova, K., L. Dudakova, **P. Skalicka**, R. Dobrovolny, P. Masek, M. Putzova, M. Moosajee, S. J. Tuft, A. E. Davidson, and P. Liskova. 2019. 'iPSC-Derived Corneal Endothelial-like Cells Act as an Appropriate Model System to Assess the Impact of SLC4A11 Variants on Pre-mRNA Splicing', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 60: 3084-90. IF: 3,812
- Dudakova, L., C. J. Evans, N. Pontikos, N. J. Hafford-Tear, F. Malinka, **P. Skalicka**, A. Horinek, F. L. Munier, N. Voide, P. Studeny, L. Vanikova, T. Kubena, K. E. Rojas Lopez, A. E. Davidson, A. J. Hardcastle, S. J. Tuft, and P. Liskova. 2019. 'The utility of massively parallel sequencing for posterior polymorphous corneal dystrophy type 3 molecular diagnosis', *Exp Eye Res*, 182: 160-66. IF: 2,998
- Dudakova, L., S. S. Cheong, S. R. Merjava, **P. Skalicka**, M. Michalickova, M. Palos, G. Mahelkova, D. Krizova, M. Hlozaneck, M. Trkova, J. L. Chojnowski, E. Hrdlickova, N. Pontikos, V. Plagnol, V. Vesela, K. Jirsova, A. J. Hardcastle, M. Filipec, J. D. Lauderdale, and P. Liskova. 2018. 'Familial Limbal Stem Cell Deficiency: Clinical, Cytological and Genetic Characterization', *Stem Cell Rev Rep*, 14: 148-51. IF: 4,697
- Dudakova, L., M. Palos, K. Jirsova, **P. Skalicka**, P. Dundr, and P. Liskova. 2016. 'Novel *TGFBI* mutation p.(Leu558Arg) in a lattice corneal dystrophy patient', *Ophthalmic Genet*, 37: 473-74. IF: 1,277
- Dudakova, L., **P. Skalicka**, A. E. Davidson, and P. Liskova. 2019. 'Coincidental Occurrence of Schnyder Corneal Dystrophy and Posterior Polymorphous Corneal Dystrophy Type 3', *Cornea*, 38: 758-60. IF: 2,000
- Dudakova, L., J. H. J. Vercruyssen, I. Balikova, L. Postolache, B. P. Leroy, **P. Skalicka**, and P. Liskova. 2018. 'Analysis of *KERA* in four families with cornea plana identifies two novel mutations', *Acta Ophthalmol*, 96: e87-e91. IF: 3,153
- Evans, C. J., L. Dudakova, **P. Skalicka**, G. Mahelkova, A. Horinek, A. J. Hardcastle, S. J. Tuft, and P. Liskova. 2018. 'Schnyder corneal dystrophy and associated phenotypes caused by novel and recurrent mutations in the *UBIADI1* gene', *BMC Ophthalmol*, 18: 250. IF: 1,431
- Liskova, P., L. Dudakova, C. J. Evans, K. E. Rojas Lopez, N. Pontikos, D. Athanasiou, H. Jama, J. Sach, **P. Skalicka**, V. Stranecky, S. Kmoch, C. Thaug, M. Filipec, M. E. Cheetham, A. E. Davidson, S. J. Tuft, and A. J. Hardcastle. 2018. 'Ectopic *GRHL2* Expression Due to Non-coding Mutations Promotes Cell State Transition and Causes Posterior Polymorphous Corneal Dystrophy 4', *Am J Hum Genet*, 102: 447-59. IF: 8,855
- Skalicka, P.**, L. Dudakova, M. Palos, L. J. Huna, C. J. Evans, G. Mahelkova, M. Meliska, T. Stopka, S. Tuft, and P. Liskova. 2019. 'Paraproteinemic keratopathy associated with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS): clinical findings in twelve patients including recurrence after keratoplasty', *Acta Ophthalmol*, 97: e987-e92. IF: 3,153
- Skalicka, P.**, L. F. Porter, K. Brejchova, F. Malinka, L. Dudakova, and P. Liskova. 2019. 'Brittle cornea syndrome: A systemic review of disease-causing mutations in *ZNF469* and two novel variants identified in a patient followed for 26 years', *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. IF: 1,141
- Stadnikova, A., L. Dudakova, **P. Skalicka**, Z. Valenta, M. Filipec, and K. Jirsova. 2017. 'Active transforming growth factor-beta2 in the aqueous humor of posterior polymorphous corneal dystrophy patients', *PLoS One*, 12: e0175509. IF: 2,766
- Zarouchlioti, C., B. Sanchez-Pintado, N. J. Hafford Tear, P. Klein, P. Liskova, K. Dulla, M. Semo, A. A. Vugler, K. Muthusamy, L. Dudakova, H. J. Levis, **P. Skalicka**, P. Hysi, M. E. Cheetham, S. J. Tuft, P. Adamson, A. J. Hardcastle, and A. E. Davidson. 2018. 'Antisense Therapy for a Common Corneal Dystrophy Ameliorates TCF4 Repeat Expansion-Mediated Toxicity', *Am J Hum Genet*, 102: 528-39. IF: 8,855
- Hlavata, L., L. Dudakova, M. Trkova, I. Soldatova, **P. Skalicka**, B. Kousal, and P. Liskova. 2016. 'Preimplantation genetic diagnosis and monogenic inherited eye diseases', *Cesk Slov Oftalmol*, 72: 167-71. bez IF

## Ostatní recenzované publikace

- Brejchova, K., P. Trosan, P. Studeny, **P. Skalicka**, T. P. Utheim, J. Bednar, and K. Jirsova. 2018. 'Characterization and comparison of human limbal explant cultures grown under defined and xeno-free conditions', *Exp Eye Res*, 176: 20-28. IF: 2,998
- Gkalpakiotis, S., P. Arenberger, **P. Skalicka**, and M. Arenbergerova. 2020. 'Dupilumab therapy in a patient with atopic dermatitis and severe atopic keratoconjunctivitis', *J Eur Acad Dermatol Venereol*. IF: 5,113
- Kousal, B., **P. Skalicka**, L. Valesova, T. Fletcher, N. Hart-Holden, A. O'Grady, C. F. Chakarova, M. Michaelides, A. J. Hardcastle, and P. Liskova. 2014. 'Severe retinal degeneration in women with a c.2543del mutation in ORF15 of the RPGR gene', *Mol Vis*, 20: 1307-17. IF: 2,365
- Liskova, P., T. Colclough, N. Hart-Holden, C. F. Chakarova, A. O'Grady, L. Kondrova, **P. Skalicka**, P. Diblík, and A. J. Hardcastle. 2011. 'Molecular genetic cause of X-linked retinitis pigmentosa in a Czech family', *Acta Ophthalmol*, 89: e213-5. IF: 2,629
- Rihova, Z., M. Merta, R. Rysava, P. Bezdicek, V. Danzig, K. Gorican, J. Lukas, **P. Skalicka**, Z. Vernerova, and V. Tesar. 2001. 'Multiple extrarenal complications in Wegener granulomatosis', *Cas Lek Cesk*, 140: 503-5. IF: 0,140
- Rybickova, I., V. Vesela, I. Fales, **P. Skalicka**, and K. Jirsova. 2016. 'Apoptosis of conjunctival epithelial cells before and after the application of autologous serum eye drops in severe dry eye disease', *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 160: 271-5. IF: 0,894
- Skalicka, P.**, and B. Kalvodova. 2013. 'Problematic issues related to screening for diabetic retinopathy', *Vnitr Lek*, 59: 218-23. IF: 0,360
- Stadnikova, A., P. Trosan, **P. Skalicka**, T. P. Utheim, and K. Jirsova. 2019. 'Interleukin-13 maintains the stemness of conjunctival epithelial cell cultures prepared from human limbal explants', *PLoS One*, 14: e0211861. IF: 2,776
- Kousal, B., **P. Skalicka**, P. Diblík, P. Kuthan, H. Langrova, and P. Liskova. 2013. 'Clinical findings in members of a Czech family with retinitis pigmentosa caused by the c.2426\_2427delAG mutation in RPGR', *Cesk Slov Oftalmol*, 69: 8-15. bez IF
- Mahelkova, G., V. Vesela, P. Seidler Stangova, A. Zidlicka, D. Dotrelova, I. Fales, **P. Skalicka**, and K. Jirsova. 2015. 'Tear Osmolarity in Patients with Severe Dry Eye Syndrome Before and After Autologous Serum Treatment: a Comparison with Tear Osmolarity in Healthy Volunteers', *Cesk Slov Oftalmol*, 71: 184-8. bez IF
- Siskova, A., E. Rihova, **P. Skalicka**, J. Jandusova, and D. Dotrelova. 2003. 'Importance of pars plana vitrectomy in the diagnosis of ocular toxocariasis', *Cesk Slov Oftalmol*, 59: 304-11. bez IF
- Szabo, E., M. Palos, and **P. Skalicka**. 2016. 'Ocular Cicatricial Pemphigoid - a Retrospective Study', *Cesk Slov Oftalmol*, 72: 283-92. bez IF

## Ostatní publikace

- Klímová, A., P. Svozílková, **P. Skalická**. Konjunktivitidy. Remedica. 2015, 25(4), 259-263. ISSN 0862-8947.
- Kalvodová, B., **P. Skalická**. Diabetická retinopatie - možnosti farmakoterapie a pokroky v léčbě. Remedica. 2014, 24(1), 21-24. ISSN 0862-8947.

## Kapitoly v knihách

- Svozílková, P., J. Heissigerová, P. Diblík, J. Becková, A. Beňová, J. Betková, M. Břichová, Z. Dubská, J. Dvořák, M. Fichtl, J. Glezgová, L. Huňa, M. Janek, I. Kaincová, B. Kalvodová, E. Klofáčková, B. Kousal, M. Kováčová, P. Kuthan, M. Meliška, M. Michaličková, M. Palos, E. Růžičková, E. Říhová, K. Sedláková, **P. Skalická**, P. Sklenka, M. Vajter, et al.. Diferenciální diagnostika v oftalmologii v obrazech. 1 vyd. Praha: Mladá fronta, 2015. 222 s. ISBN 978-80-204-3393-0.
- Heissigerová, J., M. Břichová, P. Diblík, Z. Dubská, M. Fichtl, J. Glezgová, L. Huňa, B. Kalvodová, A. Klímová, B. Kousal, P. Kuthan, P. Lišková, M. Michaličková, P. Novák, L. Rezková, E. Růžičková, **P. Skalická**, P. Sklenka, P. Svozílková. Oftalmologie: pro pregraduální i postgraduální přípravu. 1 vyd. Praha: Maxdorf, 2018. 380 s. ISBN 978-80-7345-580-4.

## Stat' ve sborníku prací (nekonferenčním)

- Skalická, P.** Recidivující eroze rohovky a současné možnosti léčby v běžné klinické praxi. In: Oftalmologie pro praxi. Olomouc: Solen, Medical education, 2017. s. 6-8. ISBN 978-80-7471-211-1.
- Skalická, P.**, L. Huňa, N. Járová. Komplikace syndromu suchého oka a jejich řešení. In: Trendy soudobé oftalmologie. Svazek 11. 1. vyd. Praha: Galén, 2018. s. 85-96. ISBN 978-80-7492-377-7.