

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biochemie a patobiochemie

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Mgr. Jana Jedličková

Vrozené vady čočky a předního segmentu oka

Developmental disorders of the lens and anterior segment of the eye

Disertační práce

Školitelka: Ing. Lubica Ďud'áková, Ph.D

Školitelka konzultantka: prof. MUDr. Petra Lišková, M.D., Ph.D

Praha, 2023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou 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, 10. 8. 2023

Mgr. Jana Jedličková

Proclamation:

I hereby state that I have prepared my thesis independently and that I have cited all the used references and other sources. I also state that this work was not used to obtain any other academic degree.

I agree with archiving of my thesis in electronic form in the archive of the system Theses.cz, because of the possibility to search for instances of plagiarism.

Prague, 10. 8. 2023

Mgr. Jana Jedličková

Identifikační záznam:

JEDLIČKOVÁ, Jana. *Vrozené vady čočky a předního segmentu oka. [Developmental disorders of the lens and anterior segment of the eye]*. Praha 2023. 75 s., 7 příl. Disertační práce, Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu, Laboratoř pro studium vzácných nemocí. Vedoucí práce Ďudřáková, Ľubica.

ABSTRAKT

Přední segment oka zahrnuje oční víčka, řasy a slzný film, rohovku, spojivku, duhovku, zornici, řasnaté tělísko, komorový úhel a oční čočku. Katarakta (neboli zákal oční čočky) a dysgeneze předního segmentu oka jsou značně heterogenní skupinou onemocnění, která jsou z velké části monogenně dědičná.

Hlavním cílem této disertační práce byla molekulárně genetická analýza 51 pacientů z 23 rodin s kataraktami a dysgenezemi předního segmentu oka, přičemž byla použita řada moderních i konvenčních metod, jako např. sekvenování nové generace, přímé sekvenování, bioinformatické a funkční analýzy včetně sestřihových vektorů.

Identifikovali jsme 24 kauzálních variant v kódujících, nekódujících i regulačních oblastech genů *PAX6*, *FTL*, *FOXC1*, *PITX2*, *FOXE3* a *CHRDL1*. Potvrdili jsme roli varianty n.37C>T v *MIR204* na vzniku chorioretinální dystrofie variabilně asociované s kolobomem duhovky, časně manifestující kataraktou a kongenitálním glaukomem. Pomocí sestřihového vektoru byl prokázán patogenní efekt dvou nekódujících variant v genu *PAX6* na sestřih pre-mRNA, vedoucí k vynechání exonů z kódující sekvence.

Výsledky této práce napomohly ustanovit molekulární diagnózu u řady pacientů, což následně umožnilo zlepšit poradenství pacientům a jejich příbuzným z hlediska prognózy ztráty zrakových funkcí a rizika vzniku sekundárního glaukomu.

Klíčová slova: molekulárně-genetická analýza, dysgeneze předního segmentu oka, sekvenování nové generace, nové kauzální varianty, katarakta

ABSTRACT

The anterior segment of the eye includes the eyelids, eyelashes, tear film, cornea, conjunctiva, iris, pupil, ciliary body, chamber angle, and lens. Cataracts and anterior segment dysgenesis are a highly heterogeneous group of diseases exhibiting all types of Mendelian inheritance.

The aim of this thesis was molecular genetic analysis of 51 patients from 23 families with congenital and early onset cataracts and/or anterior segment dysgenesis, using a modern as well as conventional methods, such as next-generation sequencing, direct sequencing, bioinformatic and functional analyses including the use of artificial splicing vectors.

We identified 24 causal variants in the coding, non-coding and regulatory regions of the *PAX6*, *FTL*, *FOXC1*, *PITX2*, *FOXE3*, and *CHRDL1* genes. We confirmed the role of the n.37C>T variant in *MIR204* in the development of chorioretinal dystrophy variably associated with iris coloboma, early-onset cataracts and congenital glaucoma. Splicing assay confirmed pathogenic effect of two mutations on pre-mRNA splicing of the *PAX6* gene.

Establishing molecular genetics diagnosis improves patient counselling and their relatives in terms of the prognosis and risk of developing secondary glaucoma

Key words: molecular-genetic diagnosis, anterior segment dysgenesis, next-generation sequencing, novel variants, cataract

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Ing. Lubici Ďudákové, Ph.D. a své školitelce konzultantce prof. MUDr. Petře Liškové, M.D., Ph.D. za odborné vedení a za čas, který obě věnovaly korekcím a vedení celé mé práce. Vážím si všech cenných rad, podnětných připomínek a hlavně trpělivosti. Chtěla bych také poděkovat celému rozsáhlému kolektivu Kliniky pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1. LF UK a VFN za veškerou pomoc při vypracování mé práce. Speciální díky pak náleží skupině Oční genetiky, které po dobu vypracování mé práce byly součástí Ing. Monika Pankievič a Bc. Natálie Rysková, za pomoc při laboratorní práci na molekulárně genetické analýze pacientů a také Mgr. Kristýně Barvíkové za závěrečnou korekturu.

V neposlední řadě také děkuji všem pracovníkům z Oční kliniky 1. LF UK a VFN v Praze, především pak MUDr. Pavlíně Skalické, Ph.D., MUDr. Ing. Marii Vajter a MUDr. Bohdanu Kousalovi, Ph.D. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Tomáši Bártovi, Ph.D. a jeho týmu z Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity za možnosti spolupráce na jednotlivých částech mé disertační práce.

Děkuji také všem zahraničním spolupracovníkům, zvláště prof. Alison J. Hardcastle a dr. Alici Davidson, z UCL Institutu Oftalmologie v Londýně a prof. Eleně V. Semina z Oddělení pediatrie Medical College of Wisconsin za možnost kooperace a společné přípravy publikací.

Tato práce vznikla za finanční podpory následujících grantových agentur: institucionální podpora Univerzity Karlovy – programy PROGRES-Q26/LF1 a PROGRES-Q25/LF1/2, Grantová agentura Univerzity Karlovy (projekty 82318/2018, 136121/2021, 321522/2022), Specifický vysokoškolský výzkum Univerzity Karlovy (260367/2017), Univerzitní výzkumné centrum Univerzity Karlovy (204011), Grantová agentura České republiky (17-12355S a 20-19278S), Agentura pro zdravotnický výzkum České republiky (NU20-07-00182 a 17-30500A), Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (8F20004) a Hlávková nadace.

Seznam zkratek

Zkratka	Termín v anglickém jazyce	Termín v českém jazyce
AA	amino acid	aminokyselina
ACMG	American College of Medical Genetics	Americká společnost lékařské genetiky a genomiky
AD	autosomal dominant	autozomálně dominantní
ASD	anterior segment dysgenesis	dysgeneze předního segmentu
AR	autosomal recessive	autozomálně recesivní
ARS	Axenfeld-Rieger syndrome	Axenfeldův-Riegerův syndrom
NKZO	best-corrected visual acuity	nejlépe korigovaná zraková ostrost
bp	base pair	pár bází
CNV	copy number variation	variabilita počtu kopií
D	dioptre	dioptrie
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
EMSA	electrophoretic mobility shift assay	gelová retardační analýza
FHD	forkhead domain	forkhead doména
FOX	forkhead box	rodina genů forkhead
HD	homeodomain	homeodoména
HEK	human embryonic kidney cells	lidské embryonální buňky ledviny
hg19	Homo sapiens (human) genome assembly 19	verze lidského genomu 19
HH	hereditary hemochromatosis	hereditární hemochromatóza
HHCS	Hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome	syndrom hereditární hyperferritinémie-katarakty
HLE	human lens epithelial cells	epiteliální buňky lidské čočky
IPSCs	induced pluripotent stem cells	indukované pluripotentní kmenové buňky
IRE	iron response element	element responzivní na železo

MIM	Mendelian inheritance in man	Mendelovská dědičnost u člověka
miRNA	microRNA	mikroRNA
mm Hg	millimetre of mercury	milimetr rtuťového sloupce
MRI	magnetic resonance imaging	magnetická rezonance
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
MUT	mutant	mutovaná
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Národní centrum biotechnologických informací
NMD	nonsense-mediated decay	rozklad mRNA zprostředkovaný nesmyslným kodonem
OL	left eye	oko levé
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man	Online databáze onemocnění s Mendelovskou dědičností
OP	right eye	oko pravé
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
pre-mRNA	precursor messenger RNA	prekurzorová mediátorová RNA
RPE	retinal pigment epithelium	retinální pigmentový epitel
RT-PCR	reverse transcription PCR	PCR s reverzní transkripcí
SD-OCT	spectral domain optical coherence tomography	optická koherenční tomografie se spektrální doménou
SNP	single-nucleotide polymorphism	jedno-nukleotidový polymorfismus
UTR	untranslated region	nepřekládaná oblast
VFN	General University Hospital in Prague	Všeobecná fakultní nemocnice v Praze
WAGR	Wilms tumour, aniridia, genitourinary anomalies, and mental retardation	Wilmsův tumor, aniridie, genitourinární anomálie a mentální retardace
WT	wild type	divoká alela
MGC1	X-linked megalocornea	X-vázaná megalokornea

Obsah

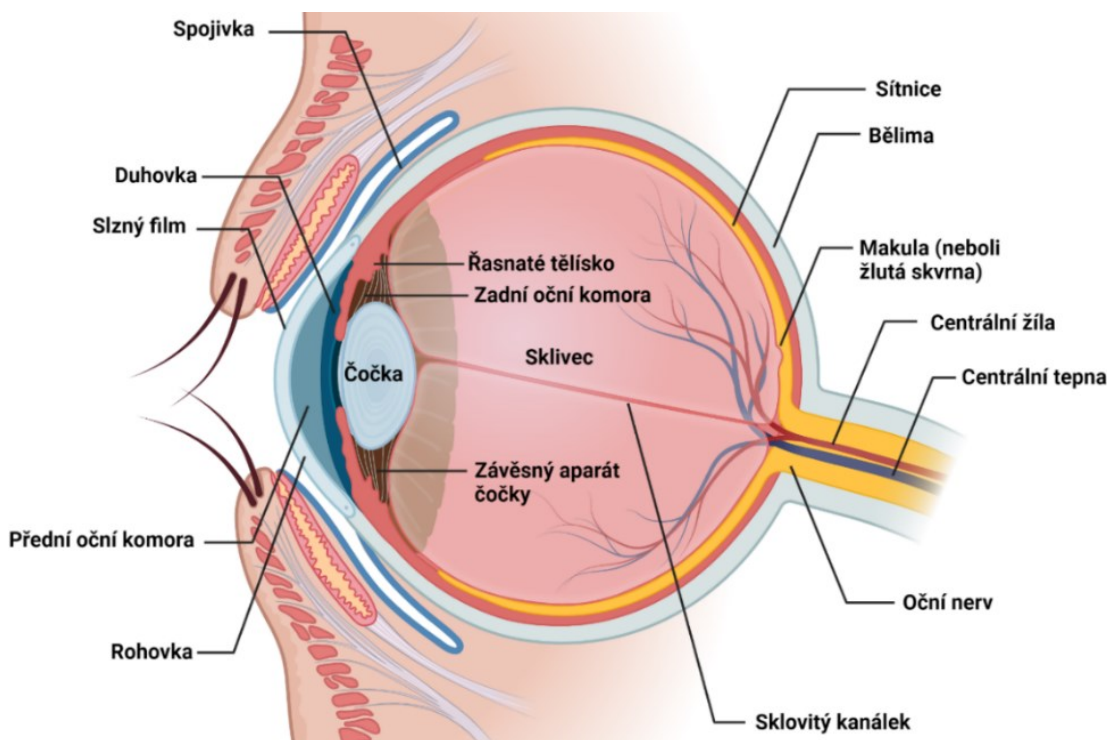
1. Úvod	10
1.1. Anatomie oka	10
1.2. Embryologie oka	14
1.3. Geny a faktory účastníci se vývoje oka.....	15
1.4. Dysgeneze předního segmentu.....	17
1.4.1. ASD spojené primárně s očními fenotypy.....	20
1.4.2. Vybrané ADS spojené s očními i systémovými anomáliemi	22
2. Hypotéza a cíle práce.....	26
3. Seznam publikací, které jsou podkladem pro vznik disertační práce.....	27
4. Metodika.....	28
5. Výsledky a komentáře k publikovaným pracím	31
5.1. Identifikace příčinných variant v genu <i>PAX6</i> a ověření vlivu dvou variant na sestřih pre-mRNA	31
5.2. Molekulárně genetická diagnostika syndromu hereditární hyperferitinemie-katarakty ve třech českých rodinách	35
5.3. Molekulárně genetická analýza v rodině s chorioretinální dystrofií variabilně asociovanou s kolobomem duhovky, presenilní kataraktou, vrozeným glaukomem a albinismem.....	39
5.4. Komplexní fenotypová a funkční analýza autozomálně dominantních i recesivních variant v genu <i>FOXE3</i>	46
5.5. Molekulárně genetická analýza X-vázané megalokornei	51
5.6. Genetická a fenotypová charakterizace kohorty pacientů s výskytem Axenfeldova-Riegerova syndromu	53
5.7. Molekulárně genetická analýza pacientky s dysgenezí předního segmentu oka a výskytem tzv. slimáčích stop na rohovce	57
6. Diskuze	60
7. Závěr.....	63
8. Seznam publikací, které nebyly podkladem pro vznik disertační práce	65
9. Webové zdroje.....	66
10. Seznam použité literatury.....	67
11. Přílohy.....	75

1. Úvod

Vzácná onemocnění tvoří různorodou skupinu život ohrožujících nebo závažných chronických stavů čítající mezi 5 000 až 8 000 různými klinickými jednotkami (Haendel et al. 2020). Dle Evropské unie jsou tato onemocnění definována jako ta, které postihují méně než 5 osob z 10 000 obyvatel (Bax 2021). Přibližně 80 % je geneticky podmíněno, nicméně kauzální geny mnohých z nich nebyly doposud určeny (Bax 2021). Nejčastější typy těchto chorob zahrnují dědičné metabolické poruchy, systémová autoimunitní a revmatologická onemocnění, endokrinologická, kardiovaskulární onemocnění, v neposlední řadě také onemocnění oka (Haendel et al. 2020). Molekulárně genetický výzkum těchto vzácných onemocnění často umožňuje identifikaci a definici kandidátních genů a efektivní studium základních patofyziologických a molekulárních procesů v lidských buňkách a metabolických dráhách.

1.1. Anatomie oka

Oční koule (*bulbus oculi*), která je uložena v měkkých tkáních v očníci (*orbita*), je vysoce specializovaný orgán, který nám umožňuje přesnou analýzu forem předmětů, barev a intenzity světla. Anatomické složení oka je schematicky zachyceno na Obrázku 1.

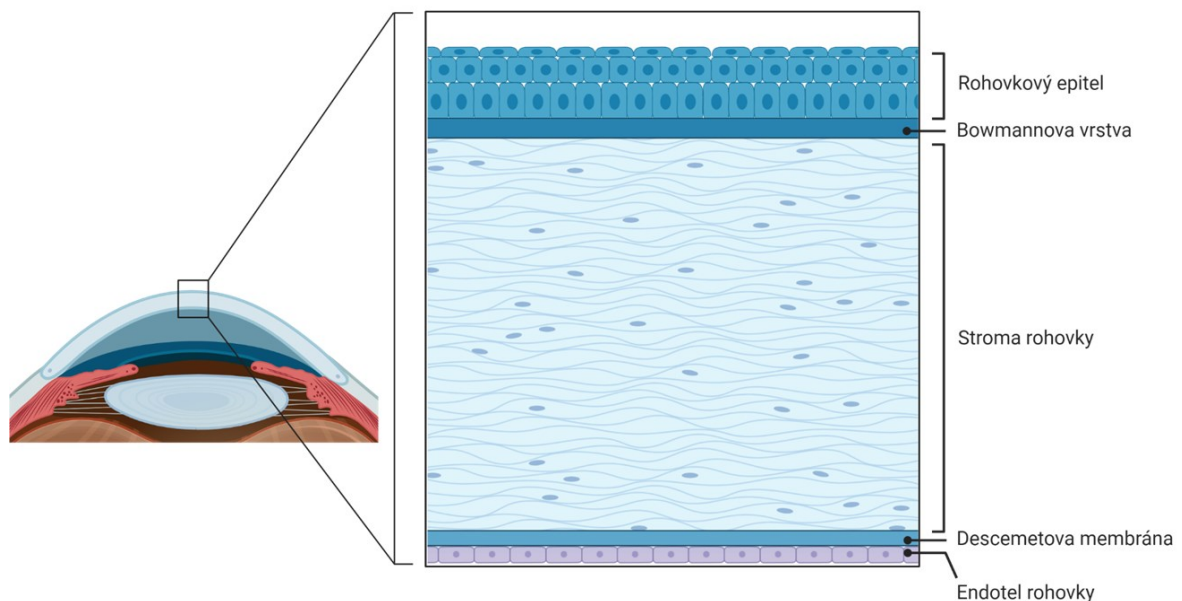


Obrázek 1: Schéma anatomie oka. Převzato a upraveno z předlohy „Eye (sagittal with eye lids)“ v programu BioRender.com (2023).

Kromě struktur, které jsou uloženy v očníci, jsou součástí očního orgánu také dráhy centrální nervové soustavy (oční nerv), cévní zásobení, okohybné svaly a také jeho vnější části (oční víčka, řasy, slzný film, spojivka). Vchod do očnice uzavírají oční víčka (McCaa 1982, Kels et al. 2015).

Pevný obal očního bulbu je tvořen třemi různými vrstvami, které jsou složené z dalších jednotlivých struktur: zevní část (*tunica fibrosa*), střední část (*tunica vasculosa*) a vnitřní část (*tunica nervosa*).

Zevní, pevnou vazivovou část vytváří z velké části bílá, neprůhledná bělma (*sclera*), která v přední části přechází v průhlednou rohovku (*cornea*). Bělma je avaskulární struktura, kterou tvoří husté kolagenní vazivo s malým množstvím fibroblastů. Svazky kolagenních vláken nejsou tak pravidelně uspořádány, jak je tomu v případě rohovky, a proto není bělma průhledná. V zadní části se nachází otvor pro výstup zrakového nervu a pro vstup a výstup cév. Rohovka je transparentní, bezcévná struktura, která se skládá z pěti vrstev: rohovkový epitel, Bowmannova vrstva, vazivové stroma rohovky, Descemetova membrána a jednovrstevný zadní endotel rohovky. Anatomické znázornění rohovky je zachyceno na Obrázku 2 (Sridhar 2018).



Obrázek 2: Anatomické znázornění rohovky, včetně jednotlivých vrstev. Převzato a upraveno z předlohy „Corneal Anatomy“ v programu BioRender.com (2023).

Epitel rohovky je vícevrstevný, dlaždicový a nerohovějící. Skládá se z 5-7 vrstev buněk, které obsahují lipidy a glykoproteiny. Buňky na bazální membráně rohovky mají schopnost se dělit a tím získává rohovka své reparační schopnosti. Bowmannova vrstva je

složená především z nepravidelně se křížících kolagenních vláken a vytváří prostor mezi bazální vrstvou a stromatem rohovky. Zajišťuje stabilitu a odolnost rohovky. Stroma rohovky je nejsilnější, avaskulární vrstvou, složenou z oploštěných fibroblastů a mezibuněčné hmoty obsahující proteoglykany bohaté na chondroitin sulfát. Descementova membrána má charakter bazální membrány a je tvořena kolagenními fibrily jiného složení než u rohovkového stromtu. Endotel odděluje rohovku od přední komory oční a udržuje ji v mírně dehydrovaném stavu, což je nezbytné pro její optickou průhlednost (Sridhar 2018).

Střední vrstvou očního bulbu je živnatka (*uvea*), vysoce vaskularizovaná vrstva bohatá na kolagen, fibroblasty a melanocyty, která se dále skládá z duhovky (*iris*), řasnatého tělíska (*corpus ciliare*) a cévnatky (*choroidea*). Tato vrstva je zodpovědná za výživu oka (Kels et al. 2015).

Střední vrstvou očního bulbu je živnatka (*uvea*), vysoce vaskularizovaná vrstva bohatá na kolagen, fibroblasty a melanocyty, která se dále skládá z duhovky (*iris*), řasnatého tělíska (*corpus ciliare*) a cévnatky (*choroidea*). Tato vrstva je zodpovědná za výživu oka (Kels et al. 2015).

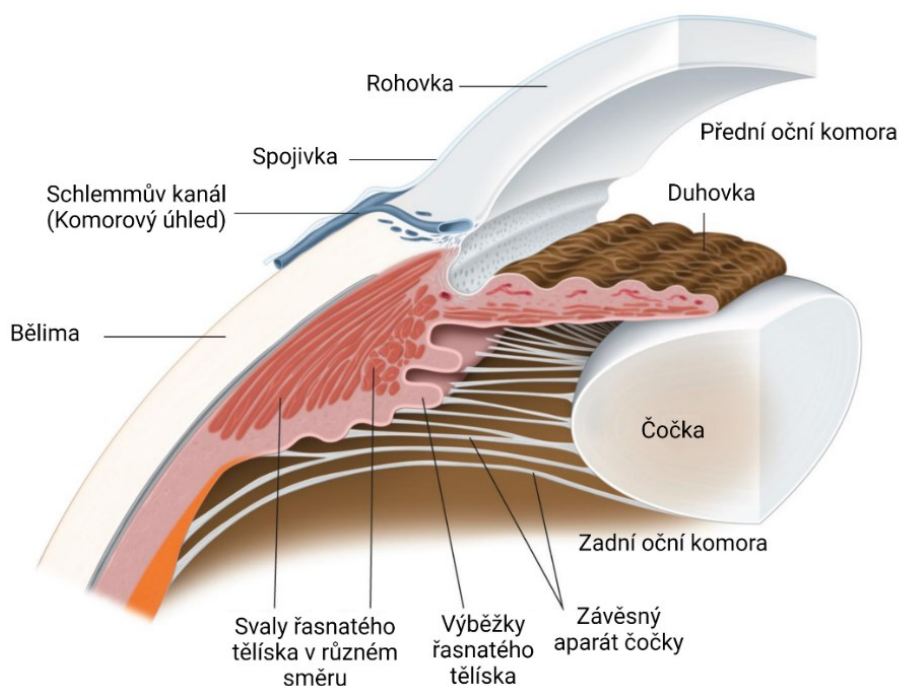
Poslední, **vnitřní vrstvu** tvoří původem nervová tkáň zvaná sítnice (*retina*), která je zodpovědná za zpracovávání a vytváření zrakových vjemů a anatomicky se člení na 10 jednotlivých vrstev: vrstva pigmentových buněk (RPE, retinální pigmentový epitel), vrstva světločivých elementů (tyčinek a čípků), zevní ohraničující membrána, zevní jádrová vrstva, zevní plexiformní vrstva, vnitřní jádrová vrstva (vrstva bipolárních buněk), vnitřní plexiformní vrstva, vrstva gangliových buněk, vrstva nervových vláken (axonů) a vnitřní limitující membrána. Makroskopicky jsou na sítnici dobře znatelné dva útvary. Prvním je terč zrakového nervu (neboli slepá skvrna), kudy vystupuje zrakový nerv, vstupuje céva a vystupuje žíla. Druhým útvarem je makulární oblast (neboli žlutá skvrna, *macula lutea*). Tato žlutá skvrna je místem maximální ostrosti vidění, jelikož obsahuje pouze čípky, které zprostředkovávají barevné vidění a zrakovou ostrost a jsou zde hustě umístěné do jednoho prostoru. V její centrální části se nachází malá jamka *fovea centralis*. Ostatní vrstvy sítnice a ostatní typy buněk (bipolární buňky, gangliové buňky atd.) jsou v tomto místě odsunuty stranou, takže světelné paprsky nemusí procházet vícero vrstvami sítnice jako v jiných oblastech a vzniká tak prohlubeň, která žlutou skvrnu definuje (Kaplan 2007).

Dále se oční bulbus skládá ze tří rozdílných prostorů: z přední oční komory (*camera oculi anterior*), zadní komory (*camera oculi posterior*) a ze sklivce (*corpus vitreum*), který vyplňuje zbývající prostor mezi čočkou, řasnatým tělískem a sítnicí (Obrázek 1).

Přední oční komora se nachází ihned za rohovkou a je vyplněna nitrooční tekutinou, která je aktivně vytvářena řasnatým tělískem. Řasnaté tělísko, vytváří nitrooční tekutinu, dále přechází jednou svou hranou v oční duhovku a druhou svou hranou v závěsný aparát čočky a v ciliární sval, který je zodpovědný za její akomodaci. Za čočkou se pak nachází druhá, **zadní oční komora**, která také obsahuje nitrooční tekutinu. Nitrooční tekutina je vytvářena směrem do zadní komory, odkud protéká do přední komory, kde se její přebytečné množství vstřebává (v místě komorového úhlu) a odtéká z oka pryč (Rudnicka et al. 2006, Quigley a Broman 2006).

Oční čočka (*lens*) je průhledná, vysoce elastická struktura bikonvexního tvaru. Vytváří ji tři části: čočkové pouzdro (*capsula lentis*), čočkový epitel a samotná čočková vlákna. Čočkové pouzdro obaluje celou čočku a skládá se z glykoproteinů a kolagenu typu IV. Čočkový epitel se nachází mezi pouzdrem čočky a vnější vrstvou vláken čočky, tedy pouze na přední straně čočky. Samotná čočka postrádá inervaci a cévní zásobení a je z velké části (90 % jejího vlastního objemu) tvořena transparentními proteiny krystalíny, které vytváří vhodné optické prostředí a umocňují její optickou mohutnost (Ma et al. 1998).

Přední segment zahrnuje nejpřednější části oka včetně těch vnějších, jakými jsou oční víčka, řasy, slzný film, spojivka a rohovka, ale také vnitřní části oka představující jeho pomyslnou první třetinu jako slzný kanálek, přední oční komora, duhovka, zornice, řasnaté tělísko, komorový úhel, zadní oční komora a oční čočka (Sowden 2007). Schematicky je přední segment oka zachycen na Obrázku 3.

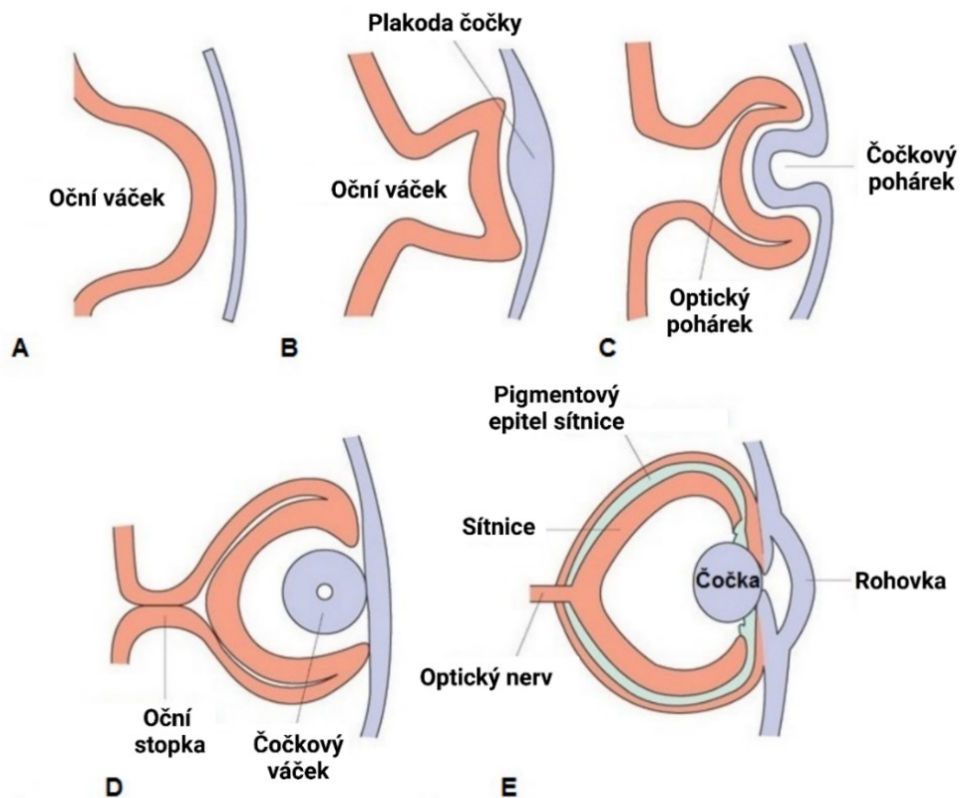


Obrázek 3: Anatomie předního segmentu oka. Převzato a upraveno z © 2023 American Academy of Ophthalmology, <https://www.aao.org>, Autor ilustrace: Mark M. Miller.

1.2. Embryologie oka

Embryonální vývoj oka je velmi komplexní a dynamický proces, který u člověka, začíná již ve fázi rané gastruly během 3. týdne intrauterinního vývoje embrya (Chow a Lang 2001). Funkce oka, jako smyslového orgánu, je úzce propojena s centrální nervovou soustavou, konkrétně se zrakovým centrem, které je umístěno v týlním laloku koncového mozku (*telencephalon*). Toto propojení vzniká již embryonálně, jelikož mají obě soustavy podobný tkáňový původ, kdy základ očního bulbu vzniká jako vychlípenina neurální ploténky v místě budoucího předního mozku (Hoar 1982). Na vzniku očních struktur se podílí tkáň neuroektodermu, ektodermu, mesodermu a buněk neurální lišty (Hoar 1982).

Vlastní základy očního orgánu se začínají vytvářet okolo 22. dne intrauterinního vývoje ve frontální části embrya, kde se nachází neurální ploténka, později neurální trubice. Zde dojde k invaginaci povrchu a k vzniku mělkých vkleslin po stranách, které se postupem času vklenou směrem k povrchovému ektodermu a pomalu se mění v oční vāčky (Obrázek 4A). Ektoderm se iniciován kontaktem s očními vāčkami ztlustí a vytváří tzv. čočkovou plakodu (Obrázek 4B). V místě této plakody se dramaticky změní exprese mnohých proteinů (hlavně pak transkripčních faktorů) a zpětně působí také na oční vāček. Ten se vlivem oční plakody začne oplošřovat a vchlipovat, čímž vzniká oční pohárek (Hoar 1982).



Obrázek 4: Znázornění raného stádia vývoje lidského oka. Převzato a upraveno z Johnson et al. 2016.

Vchlípení pohárku není symetrické a na ventrální straně vzniká lineární zářez, který je nezbytný pro následující spojení mezi vnitřním listem pohárku a stopkou. Do tohoto žlábků budou postupně pronikat buňky mezenchymu a následně bude obsahovat arterii, věnu a nervová vlákna optického nervu. Oční pohárek má tedy už stěnu dvojitou a vytváří základ sítnice. Zevní vrstva stěny se dále během vývoje přemění na RPE a vnitřní vrstva v buňky fotoreceptorů, bipolární a gangliové buňky. Spolu s invaginací a dalším uzavíráním očního pohárku se do něj také vchlipuje i plakoda čočky a vytváří tak čočkový pohárek, ze kterého se postupně utvoří čočkový váček (Obrázek 4C-D). Čočkový váček je zprvu v těsném kontaktu s povrchovým ektodermem, ze kterého se odloučil, ale postupem času se zcela oddělí a do prostoru mezi ektodermem a čočkou také migruje mesenchym (Obrázek 4E). Mezi čočkou a budoucí rohovkou postupně vzniká přední oční komora (Hoar 1982).

Rohovka se dále vyvíjí z povrchového ektodermu a z mesenchymu, který se v tento moment nachází přímo pod ním. Důležitou roli během vývoje a dotváření jednotlivých vrstev rohovky hraje transkripční faktor *PITX2* (Gage et al. 2014). Ze spodní části mesenchymu, která je v kontaktu s oční čočkou a je silně vaskularizovaná, se vytváří postupně primární cévní obal čočky (pupilární membrána). Periferní část této membrány se postupem času přeměňuje v duhovkové stroma a centrální část cca v 7. měsíci vývoje embrya postupně atrofuje a tím vytváří zornici (pupila). Diferenciace pigmentované epitelialní vrstvy dozrávající duhovky je pod vlivem exprese genu *PAX6*, což následně vede také k diferenciaci epitelu řasnatého tělíska (Ma et al. 2019).

1.3. Geny a faktory účastníci se vývoje oka

V průběhu embryogeneze oka se odehrává velké množství na sebe navazujících dějů, které vyžadují striktně časově i místně regulovanou expresi. Expresí a regulace mnoha genů a signálních molekul, především pak transkripčních faktorů, je naprosto klíčová, přičemž úloha řady z nich nebyla doposud zcela objasněna (Zagozewski et al. 2014). Nejvýznamnější roli ve vývoji oka hrají regulátorové geny homeoboxu *RAX*, *HESX1*, *PAX6*, *OTX2*, *SIX3* a *SOX2* (Zhang et al. 2000, Chow a Lang 2001). V sestupné kaskádě reakcí se pod těmito geny nachází další, neméně důležité regulátory jako *FOXC1*, *FOXE3*, *PITX2*, *PITX3*, *PAX2*, *MAF*, a také velké množství regulačních mikroRNA (miRNA) molekul, například *MIR204* (Semina et al. 1996, Jordan et al. 1992, Xie et al. 2014).

PAX6 (MIM *601542) se řadí mezi geny, které obsahují ve své sekvenci homeobox, díky němuž se v podobě homeodomény (HD) může vázat na DNA a regulovat tak

transkripci jiných genů (Xu et al. 1999). *PAX6* je naprosto klíčovou složkou správného vývoje oka jak u savců, tak i jiných organismů (Gehring a Ikeo 1999). Jeho esenciální význam pro organogenezi oka je podložen vysoce konzervovanou sekvenční podobností ve skupině *Metazoa* (živočichové). Úloha, genu *PAX6* během embryogeneze není klíčová jen pro okulogenezi, ale účastní se také vývoje jiných orgánů a struktur (např. centrální nervové soustavy, nebo pankreatu) (Glaser et al. 1994).

Transkripční faktor ***FOXE3*** (MIM *601094), člen rodiny Forkhead box (Fox), která hraje klíčovou roli v metabolismu a během embryonálního vývoje, je sám velmi důležitý pro správný vývoj čočky obratlovců (Semina et al. 2001, Blixt et al. 2000, Brownell et al. 2000). Navzdory skutečnosti, že exprese genu *FOXE3* je v oční tkáni myšího embrya omezena pouze na oční čočku, myši i lidé nesoucí patogenní varianty v tomto genu vykazují kromě anomálií čočky také komplexní oční fenotypy včetně postižení předního segmentu oka a/nebo mikroftalmie (Golson a Kaestner 2016, Ormestad et al. 2002). Byly popsány jak autozomálně dominantní, pak také autozomálně recesivní případy dědičnosti ve spojení s variantami v genu *FOXE3*, přičemž obě tyto skupiny se liší fenotypovými projevy (Semina et al. 2001, Iseri et al. 2009). Autozomálně recesivní typy mutací zahrnují nejčastěji missense varianty v oblasti forkhead DNA-vazebné domény (FHD), posunové (frameshift), nebo nesmyslné (nonsense) varianty, které vedou k tvorbě zkráceného proteinu (Iseri et al. 2009). Autozomálně dominantní dědičnost se vyskytuje především v případě variant, které vedou k C-terminálnímu prodloužení proteinu, často při zachování celé stávající sekvence *FOXE3* (out-of-frame) (Iseri et al. 2009). Takto vzniklé proteiny pravděpodobně selhávají při tvorbě dimerů *FOXE3* a mají tak dominantně negativní efekt. Je důležité zmínit, že v případě proteinu *FOXE3* nedochází k likvidaci mutantní mRNA mechanismem NMD (nonsense-mediated decay), jelikož je kódován pouze jedním exonem a může tak snáze docházet k produkci aberantních proteinů s C-koncovým prodloužením.

FOXC1 (MIM *601090) patří stejně jako *FOXE3* do rodiny Fox transkripčních faktorů s FHD doménou, z nichž mnohé hrají zásadní roli během diferenciaci neurální lišty a následně mezenchymálních buněk předního segmentu, které jsou zodpovědné za správné formování struktur rohovky a duhovky (Kidson et al. 1999, Gage et al. 2005). Haploinsuficience *FOXC1* v buňkách periokulárního mezenchymu může mít za následek abnormální růst buněk endotelu rohovky nebo anomálie během tvorby přední oční komory (Kidson et al. 1999, Gage et al. 2005).

Transkripční faktor ***PITX2*** (MIM *601542) nese podobně jako *PAX6* HD a hraje také důležitou roli během vývoje jednotlivých struktur oka, zubů, srdce a hypofýzy (Gage et

al. 1999, Gage et al. 2014, Franco a Campione 2003). Působí také jako transkripční regulátor zapojený do bazální a hormonálně regulované aktivity prolaktinu, nebo prokolagenu (Quentien et al. 2002, Hjalt et al. 2001). Koexprese genů *FOXC1* a *PITX2* je nezbytná pro správný vývoj endotelu rohovky (Kidson et al. 1999).

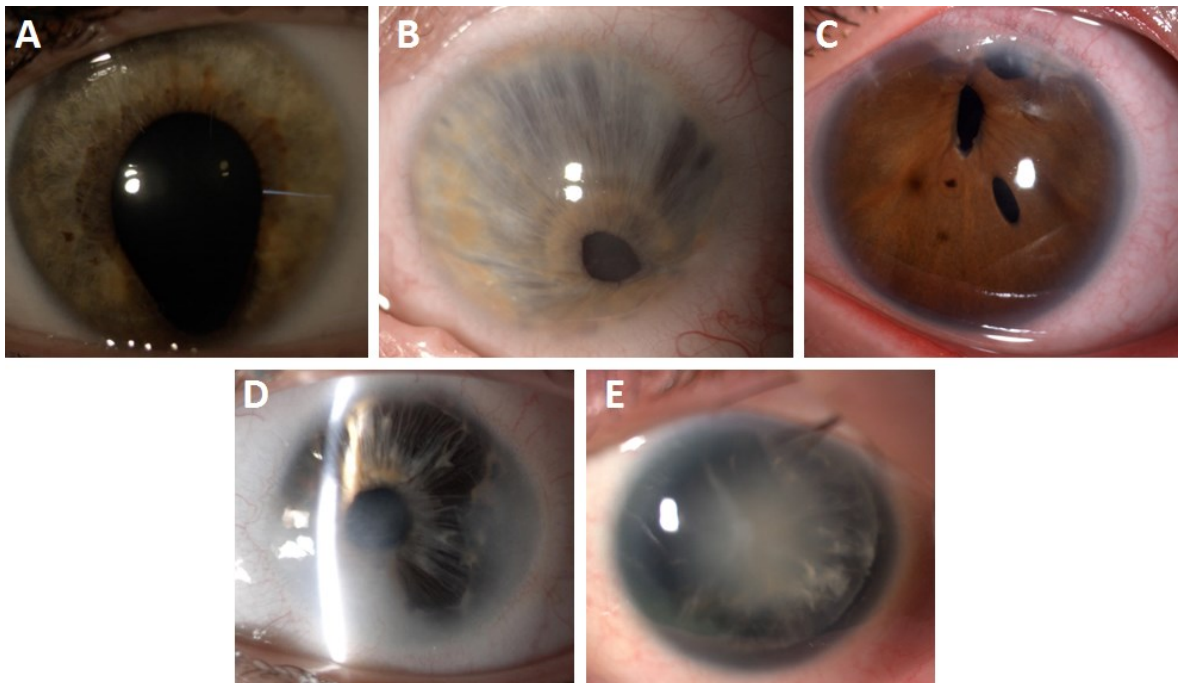
MIR204 (MIM *610942) patří mezi krátké, nekódující miRNA, které se podílejí na post-transkripční regulaci genové exprese tím, že ovlivňují stabilitu svých cílových mRNA. Sekvence *MIR204* se nachází na chromosomu 9 v oblasti intronu genu *TRPM3* (MIM *608961). Koexprese genu *TRPM3* a tím také molekuly miR-204 je společně regulována transkripčním faktorem *PAX6*, jehož role je pro správný vývoj oka nezastupitelná (Xie et al. 2014). Molekula miR-204 je nezbytná i pro diferenciaci a správnou funkci fotoreceptorů. Knockdown miR-204 (zprostředkovaný použitím morpholino oligomerů) na modelu ryb medaka (*Oryzias latipes*), měl za následek mikroftalmii, abnormální tvorbu oční čočky a změněné dorzoventrální vzorování sítnice s kolobomem optické štěrbinou (Conte et al. 2010, Conte et al. 2015). Tyto morpholino ryby měly také významně snížené množství tyčinek a čípků (Conte et al. 2010, Conte et al. 2015).

1.4. Dysgeneze předního segmentu

Dysgeneze předního segmentu (ASD, anterior segment dysgenesis) představují skupinu poruch, které postihují vývoj přední části oka, včetně rohovky, duhovky, spojivky, očních víček, komorového úhlu, řasnatého tělíska a oční čočky (Sowden 2007). ASD představují klinicky i geneticky široké spektrum vývojových poruch, přičemž často vznikají na podkladě abnormální diferenciace mesenchymu, konkrétně pak buněk neurální lišty (Sowden 2007). Jmenovitě se jedná o stavy jako zakalení rohovky (opacifikace), často spojované s vrůstáním cév do jejího stromatu, nedovyvinutí (hypoplazie) duhovky, rozštěpy duhovky (kolobom), přítomností výrazného zadního embryotoxonu (rozšíření Schwalbeho, což je kolagenové zhuštění Descemetovy membrány mezi trabekulární síťovinou a endotelem rohovky), korektopie zornice nebo oční čočky (atypické umístění) (Sowden 2007). Vybrané nálezy jsou zachyceny na Obrázku 5. Může se také jednat o stavy, jakými jsou nanoftalmus (zmenšení celého oka, které je jinak funkčně normální), mikroftalmus (zmenšení předního nebo zadního segmentu oka), anoftalmus (oko zcela chybí), heterochromie (různobarevné duhovky způsobené nerovnoměrnou distribucí melaninu), polykorie (výskyt vícero zornic), kryptoftalmus (nedochází k oddělení očních víček) nebo sklerokornea (částečné, nebo úplné zakalení rohovky). Mezi doprovodné projevy patří také

nystagmus (kmitavé pohyby očí), strabismus (šilhání), nebo ambylopie (tupoizrakost) (Sowden 2007). U více než poloviny pacientů s ASD dochází v důsledku poruchy odtoku komorové tekutiny ke vzniku sekundárního glaukomu, který může v konečném důsledku vést až k neuropatii zrakového nervu (Idrees et al. 2006, Alward 2000).

Vrozené vývojové vady očních tkání mohou vznikat jak na podkladě genetických příčin, pak také během intrauterinního vývoje embrya, působením nejrozličnějších mutagenů (např. intrauterinní infekce), vnějších faktorů (alkoholový fetální syndrom), nebo nevhodnou medikací matky během těhotenství (teratogeny) (Idrees et al. 2006). Na základě důkladných prenatalních screeningů, které jsou v České republice už běžnou praxí, se předpokládá, že většina ASD (především pak bilaterálních) vzniká na podkladě genetických příčin (Haargaard et al. 2004).

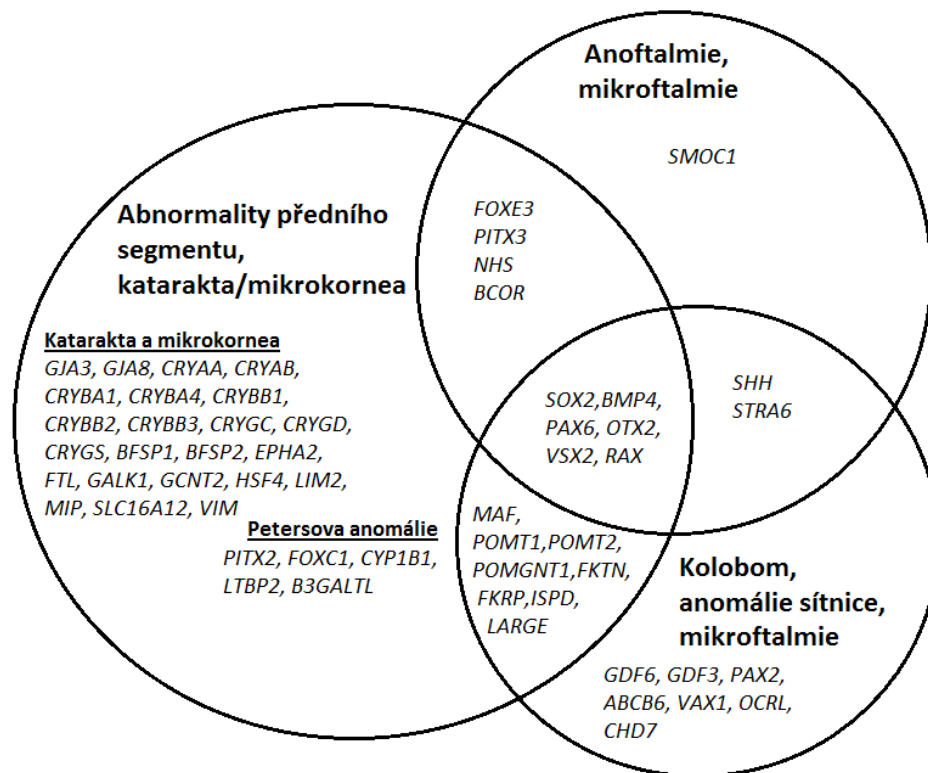


Obrázek 5: Vybrané nálezy pacientů s ASD. (A) Kolobom duhovky; (B) Ektopie zornice; (C) Polykorie; (D) Zákal rohovky a atrofie duhovky; (E) Aniridie a presenilní katarakta. Zdroj: Archiv Oční kliniky VFN a 1. LF UK

ASD bývají spojovány se všemi typy dědičnosti: autozomálně dominantní, autozomálně recesivní, X-vázané, často s neúplnou penetrancí a variabilní expresivitou (Ma et al. 2019). ASD se mohou vyskytovat izolovaně, ale mohou se také manifestovat v rámci nejrozličnějších syndromů (Axenfeldův-Riegerův syndrom, Petersova anomálie, aj.) (Ma et al. 2019).

Prevalence ASD se pohybuje v závislosti na konkrétní populaci a na typu onemocnění od 1 postiženého na 200 000 obyvatel v případě Axenfeldova-Riegerova syndromu, až po 1 postiženého na 10 000 jedinců v případě kongenitálního glaukomu (Meyer-Marcotty et al. 2008, Titheradge et al. 2014, Aponte et al. 2010).

Vývoj oka je řízen složitou sítí molekulárních interakcí, které závisí na přesné časové i místní expresi četných transkripčních faktorů. Z tohoto důvodu nejčastějšími geny, jejichž mutace vedou ke vzniku ASD, jsou právě transkripční faktory, mezi které patří geny *PAX6*, *PITX2*, *FOXC1*, *FOXE3* aj. (Reis a Semina 2011). Na Obrázku 6 je zachycen široký fenotypový překryv mutací v jednotlivých genech, z čehož vyplývá, že ASD nejsou izolovanou klinickou entitou, ale na molekulárně-genetické úrovni se prolínají také jinými klinickými jednotkami např. s anomáliemi postihujícími sítnici.



Obrázek 6: Vybrané geny, účastníci se raného vývoje oka, jejichž mutace jsou zodpovědné za vznik ASD. Fenotypový překryv v případě mutací v jednotlivých genech je velmi široký. Převzato a upraveno z Prokudin et al. 2014.

Fenotypová a genotypová heterogenita a překrývání se s jinými klinickými jednotkami komplikuje kategorizaci a klasifikaci tohoto typu onemocnění. Pokusy kategorizovat ASD za účelem zjednodušení diagnózy se často zakládají pouze na fenotypu, genotypu, nebo typu postižených buněk a pravděpodobně se jedná o nedostatečný systém (Ma et al. 2019).

V následující části bude podrobněji popsáno několik onemocnění, které jsou součástí širokého spektra ASD. Nejprve budou popsány poruchy spojené pouze s očním fenotypem a následně také syndromy, které kombinují oční i systémové nálezy.

1.4.1. ASD spojené primárně s očními fenotypy

Aniridie

Aniridie (MIM #106210) je vzácná vrozená panokulární porucha s incidencí v rozmezí 1 postižený na 40 000 - 96 000 jedinců a manifestuje jako úplné nebo částečné chybění duhovky (Lim et al. 2017). Jedná se o nejznámější ASD postihující duhovku. Kromě malformací duhovky může být u pacientů s aniridií přítomna také hypoplazie makuly, která vede k nystagmu a snížení zrakové ostrosti, což může být u některých pacientů dále komplikováno hypoplazií zrakového nervu (Mayer et al. 2003, Hingorani et al. 2009, Netland et al. 2011). V pozdějším věku vzniká u pacientů s aniridií často keratopatie, glaukom a presenilní katarakta (Valenzuela a Cline 2004). Pacienti trpící aniridií mají často těžké zrakové postižení, se zrakovou ostroší horší než 0,3 a až v 86 % případů trpí fotofobií (světloplachostí) (Nelson et al. 1984, Landsend et al. 2021). Vzácně byly u postižených jedinců pozorovány abnormality chování, jako například opoždění psychomotorického vývoje (Malandrini et al. 2001, Graziano et al. 2007, Chien et al. 2009).

Tento typ dysgeneze je nejčastěji podmíněn variantami v genu *PAX6*. Rozsáhlejší genomové delece, které zahrnují jak gen *PAX6*, pak také přilehlý gen *WT1* (MIM *607102), jsou spojeny s výskytem WAGR syndromu (MIM #194072), při kterém se u postižených jedinců vyskytuje kombinace následujících symptomů: Wilmsův tumor (zhoubný nádor ledvin), aniridie, urogenitální anomálie nebo mentální retardace (Gronskov et al. 2001). Vzácně, může být aniridie způsobena patogenními variantami ve dvou dalších transkripčních faktorech: *FOXC1* nebo *PITX2* (Samant et al. 2016).

Klinický obraz, včetně stupně zrakového postižení, se může významně lišit mezi jednotlivými rodinami, ale také i mezi jednotlivými členy jedné rodiny, kteří nesou stejnou příčinnou variantu (Malandrini et al. 2001, Gronskov et al. 1999).

Kongenitální katarakta

Kongenitální katarakty (vrozené zákaly oční čočky) jsou hlavní příčinou nevidomosti u dětí, především pak v rozvojových zemích, kde není zdravotní péče na vysoké úrovni a kde není tím pádem katarakta rutinně operována (Chan et al. 2012). Katarakty se u dětí mohou vyskytovat izolovaně, nebo v rámci syndromového onemocnění, jako je například syndrom hereditární hyperferritinémie-katarakty (HHCS, Hereditary Hyperferritinemia Cataract Syndrome, MIM #600886) (Girelli et al. 1995). Genetická podstata kongenitálních katarakt často spočívá v patogenních variantách, které se nachází v genech kódující krystalíny,

příčemž jejich mutace tvoří až polovinu příčin všech autozomálně dominantně děděných katarakt (Ma et al. 1998). Dále se také může jednat o varianty v genech kódující čočkově specifické konexíny, aquaporíny, cytoskeletární proteiny, nebo také transkripční faktory (Yi et al. 2011).

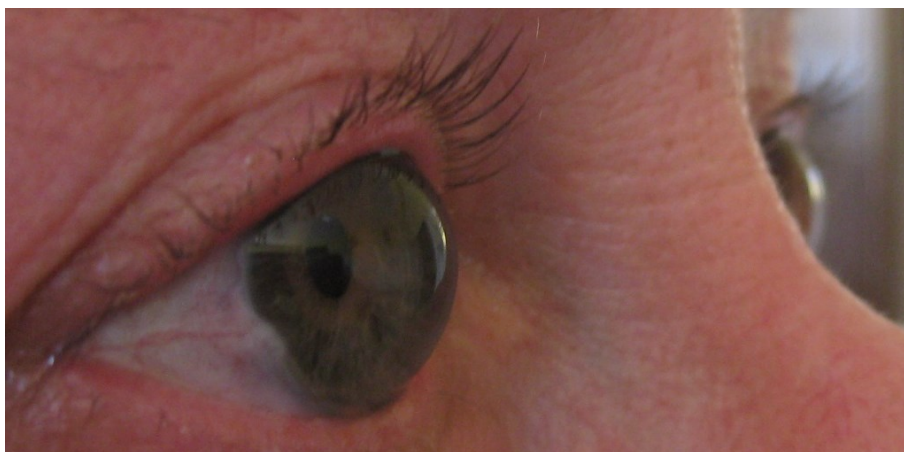
Kongenitální, infantilní a juvenilní glaukom

Primární kongenitální glaukom (vrozený zelený zákal) je charakterizován zvýšeným nitroočním tlakem (>21 mm Hg) již při narození jedince. Infantilní glaukom manifestuje v kojeneckém/batolecím věku a juvenilní glaukom v brzkém dětském věku (od 3 let) až do věku 40 let (Khan 2011, Raymond 1997). Pokud není glaukom adekvátně léčen, může postupně docházet k progresivnímu poškození zrakového nervu (neuropatii) a až k úplné ztrátě zraku (Badawi et al. 2019). Na vzniku glaukomu u dětí se může opět podílet mnoho genetických a také environmentálních faktorů. Genetické příčiny zahrnují mutace v genech zapojených do vývoje jednotlivých částí oka, jako jsou *CYP1B1* (MIM *601771), *MYOC* (MIM *601652), *LTBP2* (MIM *602091) a *FOXC1* (Reis a Semina 2011, Badawi et al. 2019).

Megalokornea

X-vázaná megalokornea (MGC1, megalocornea) je vzácné onemocnění definované bilaterálním neprogresivním zvětšením průměru rohovky > 13 mm (fyziologické rozmezí je 9–12 mm) při jejím ztenčení (pod 0,5 mm) a zachování normálního nitroočního tlaku (Mackey et al. 1991, Webb et al. 2012). Struktura a tloušťka rohovky se během života postiženého jedince zpravidla už dále nemění. MGC1 je obvykle spojena také s poměrně hlubokou přední komorou oka okolo 4,6 – 6,3 mm (fyziologické rozmezí je pod 3,8 mm), která je zachycena na Obrázku 7 (Sharan a Billson 2005, Ong et al. 2021).

Spolu s věkem je MGC1 často variabilně doprovázena závažnou degenerací rohovky, změnami duhovky a kataraktou (Sharan a Billson 2005, Ong et al. 2021). Přestože je u těchto pacientů významně ovlivněna anatomie předního segmentu oka, doposud nebyla MGC1 spojována se zvýšeným rizikem rozvoje sekundárního glaukomu. Příčinou tohoto onemocnění opět může být kombinace genetických a environmentálních faktorů (Ong et al. 2021). Z genetického hlediska je MGC1 spojována s variantami v genu *CHRD1* (MIM *300350), který leží na dlouhém raménku X chromozomu, manifestující recesivní dědičností, tím pádem postihuje pouze muže (Webb et al. 2012, Moshirfar et al. 2023).



Obrázek 7: Fotografie hluboké přední oční komory pacienta s megalokorneou. Zdroj: Archiv Oční kliniky VFN a 1. LF UK

CHRDLI kóduje strukturální glykoprotein ventroptin, nebo také „chordin-like protein 1“, což je antagonist „kostního morfogenetického proteinu 4“ (*BMP4*, MIM *112262), který hraje významnou roli během vytváření embryonálních kostí, regulace retinální angiogeneze, diferenciaci neurálních buněk a také během vývoje předního segmentu oka. V tkáních oka je *CHRDLI* exprimován v rohovce, čočce a sítnici, již v sedmém týdnu intrauterinního vývoje embrya a exprese přetrvává až do dospělosti (Skuta et al. 1983, Nakayama et al. 2001, Webb et al. 2012). Absence *CHRDLI* může vést k zvýšené expresi *BMP4* a tím také k neregulované proliferaci některých typů buněk (Pfirrmann et al. 2015). Dále je *CHRDLI* exprimován také v lidském fetálním mozku, konkrétně v tkáni mozečku a neokortexu (mozková kůra) (Webb et al. 2012). Snímky magnetické rezonance (MRI) již v minulosti u několika pacientů ukázaly, že přestože jejich kognitivní schopnosti zůstávají zachovány, dochází u nich k poklesu myelinizace v bílé hmotě mozku (Webb et al. 2012).

1.4.2. Vybrané ADS a katarakty spojené s očními i systémovými anomáliemi

Různé specifické fenotypové kombinace mohou být rozpoznávány jako samostatné diagnostické jednotky a syndromy.

Axenfeldův-Riegerův syndrom

Axenfeldův-Riegerův syndrom (ARS) je autozomálně dominantní onemocnění charakterizované očními defekty, postihujícími především přední segment oka, často doplněné o systémové nálezy (Seifi a Walter 2018). Mezi typické oční znaky patří přítomnost zadního embryotoxonu, hypoplazie duhovky, iridokorneální adheze, korektopie

a/nebo polykorie. Až u poloviny pacientů s ARS dojde k rozvoji glaukomu (Ma et al. 2019, Alward 2000).

Kromě předního segmentu oka, se tento syndrom manifestuje také specifickými obličejovými rysy (dysmorfie), zubními i neurologickými abnormalitami, nebo vzácně i srdečními vadami (Seifi a Walter 2018). Přesná prevalence ARS není známa, ale odhaduje se, že celosvětově postihuje 1 z 200 000 jedinců (Agarwal et al. 2020). ARS je nejčastěji způsoben mutacemi v genech *PITX2* nebo *FOXC1* a typická je úplná penetrance s variabilní expresivitou (Meyer-Marcotty et al. 2008, Titheradge et al. 2014).

ARS bývá často rozdělen na tři podtypy s ohledem na fenotypové projevy; ARS typu 1 (MIM #180500), ARS typu 2 (MIM #601499), ARS typu 3 (MIM #602482).

ARS typu 1 vzniká na podkladě patogenních variant v genu *PITX2* a kromě ASD se vyznačuje také zubními abnormalitami (hypodontie/oligodontie a mikroodontie) a pupečními anomáliemi (nadbytečná pupeční kůže/kýla a omfalokéla) (Alward 2000).

ARS typu 2 byl identifikován na základě publikací o Riegerově anomálii u jedinců s rozsáhlými 13q14.7 delecemi. V tomto lokusu doposud nebyl identifikován kauzální gen (Semina et al. 1996, Nishimura et al. 1998).

ARS typu 3 má velmi variabilní fenotypové projevy s izolovanou ASD nebo s přidruženými vrozenými srdečními vadami, zubními anomáliemi a ztrátou sluchu a je způsoben mutacemi v genu *FOXC1* (Alward 2000).

Petersova anomálie a Petersův plus syndrom

Petersova anomálie je označení klinické jednotky kombinující zákal rohovky, defekty v zadních vrstvách rohovky a lentikulokorneálních a/nebo iridokorneálních adhezi (Alkatan et al. 2019). Tento stav vede ke snížení zrakové ostrosti a může vést až k amblyopii (tupožrakost) nebo strabismu (šilhání). Jedná se o geneticky heterogenní skupinu onemocnění, s převahou autozomálně dominantního typu dědičnosti, přičemž jako příčinné byly popsány patogenní varianty v genech *PAX6*, *PITX2*, *CYP11B1* a *FOXE3* (Hanson et al. 1994, Doward et al. 1999, Vincent et al. 2001, Doucette et al. 2011).

Petersův plus syndrom je spojen se systémovými anomáliemi, dle definice je přítomen nízký vzrůst, výrazné obličejové rysy, rozštěp patra a mentální opoždění (Cohen 2000, Maillette de Buy Wenniger-Prick a Hennekam 2002). Petersův plus syndrom je autozomálně recesivní onemocnění a vzniká na podkladě mutací v genu *B3GALTL* (MIM *610308) (Lesnik Oberstein et al. 2006).

Syndrom hereditární hyperferitinémie-katarakty

HHCS je vzácné autozomálně dominantní onemocnění manifestující vysokými hladinami sérového feritinu a vznikem katarakty s časnou manifestací. Na genetické úrovni je HHCS způsoben variantami v 5' nepřekládané oblasti genu *FTL* (MIM *134790) kódující lehký řetězec feritinu, tzv. L-feritin, což je globulární protein, který má funkci vnitrobuněčného úložiště železa, jelikož železo je pro buňky samo o sobě toxické (Girelli et al. 1995). Hladina feritinu v plazmě se využívá jako nepřímý marker pro stanovení hladiny železa v těle. Na 5' nepřekládané oblasti genu *FTL* se na molekule mRNA nachází tzv. iron response element (IRE), který má strukturu vlásenky a vytváří vazebné místo pro IRE vazebné proteiny, které jsou při nedostatku železa v buňce pevně navázány na tuto vlásenku, čímž zabráňují molekule mRNA vazbě na ribozom, a tím také translaci proteinu (Beaumont et al. 1995). Při přítomnosti železa v buňce tyto proteiny z vlásenky disociují a je zahájena translace feritinu. Varianty v této oblasti narušují tvorbu vlásenky a tím se stává syntéza feritinu na železe nezávislá. L-feritin pro většinu tkání není toxický, ale na úrovni oční čočky formuje nerozpustné agregáty a čočka se postupně stává neprůhlednou. Systémová léčba těchto pacientů není nutná, neboť nedochází k ukládání železa v jiných tkáních a po operaci katarakty a implantaci umělé nitrooční čočky jsou pacienti zcela bezpříznakoví (Camaschella a Poggiali 2009).

Situace se stává nebezpečnou ve chvíli, kdy je na základě krevních testů toto onemocnění zaměněno s hereditární hemochromatózou (HH, MIM #235200) (Feder et al. 1996, Bacon et al. 1999). Jedná se o onemocnění poměrně časté, jde dokonce o jedno z nejčastějších monogenně přenášených onemocnění vůbec (European Association For The Study Of The 2010, Phatak et al. 2008). Vzniká na podkladě mutací v genu *HFE* (MIM *613609) jehož proteinový produkt se váže na transferinový receptor a redukuje jeho afinitu pro železo-nesoucí transferin (Bacon et al. 1999). Transferin v těle zabezpečuje transport železa do tkání a správná afinita na jeho receptor je kritická pro regulaci akumulace železa v tkáních.

1.4.3. Molekulárně genetické přístupy při diagnostice monogenních onemocnění

Molekulárně genetická diagnostika pacientů s ASD pomáhá při poskytování přesnější prognózy vývoje onemocnění z hlediska rizika přenosu onemocnění na další generace. Předpokladem pro úspěšný výsledek genetického screeningu je v první řadě přesná klinická diagnostika a pečlivá genealogická analýza včetně sestavení rodokmenu,

kteřá slouží k odhadu typu dědičnosti konkrétního onemocnění a později k segregáčním analýzám (Bennett et al. 1995). Vyšetření v rámci jedné rodiny může často zkomplikovat neúplná penetrance a variabilní expresivita (Meyer-Marcotty et al. 2008, Titheradge et al. 2014). Penetrance značí míru shody mezi genotypem a očekávaným fenotypem, přičemž daný genotyp nemusí vždy jednoznačně determinovat fenotyp v plném rozsahu. Expresivita vyjadřuje různou povahu (míru postižení) daného genotypu ve fenotypu. U nositelů stejného genotypu můžeme nacházet celé spektrum morfologických odchylek.

Samotné genetické testování může v praxi znamenat přímé Sangerovo sekvenování kódujících úseků konkrétního genu, v případě že daný fenotyp přesně koreluje s konkrétní diagnostickou jednotkou (např. při výskytu izolované aniridie, sekvenování kódujících úseků genu *PAX6*, nebo genů *PITX2*, *FOXC1* v případě Axenfeldova-Riegerova syndromu) (Moosajee et al. 1993, Seifi a Walter 2018). Pokud se jedná o komplexnější, nebo nejasný fenotypový nález, může se přistoupit k cíleným genovým panelům, k exomovému sekvenování nebo k sekvenování celého genomu (Reis a Semina 2011). V některých případech je potřeba provést vyšetření variant počtu kopií (CNV, copy number variation), pro odhalení rozlehlejších delecí, nebo duplikací, anebo k vyšetření karyotypu, pro odhalení nejruznějších chromozomálních přestaveb (Royer-Bertrand et al. 2021). V případě rozsáhlejších rodin s jasným hereditárním výskytem onemocnění v každé generaci s doposud neobjasněnou příčinou, se dá přistoupit ke genomovému sekvenování většího počtu rodinných příslušníků a následně k vazebným analýzám (Ott et al. 2015).

Ověření patogenního vlivu jednotlivých variant je velmi komplexní proces a může zahrnovat techniky klonování, použití *in silico* predikčních programů, nebo nejruznější funkční studie (Pejaver et al. 2022, Richards et al. 2015).

2. Hypotéza a cíle práce

Cílem mé disertační práce bylo zkoumat molekulárně genetickou příčinu u 51 pacientů s klinickým obrazem ASD, kongenitálními kataraktami anebo časně manifestujícími kataraktami a s nimi spojenými syndromy.

Dílčí cíle práce:

1. Identifikace příčinných variant v genu *PAX6* a ověření vlivu dvou variant na sestřích pre-mRNA
2. Objasnění molekulárně genetické příčiny syndromu hereditární hyperferitinémie-katarakty ve třech rodinách českého původu
3. Molekulárně genetická analýza v rodině s chorioretinální dystrofií, variabilně asociovanou s kolobomem duhovky, presenilní kataraktou, vrozeným glaukomem a albinismem
4. Komplexní fenotypová a funkční analýza autozomálně dominantních i recesivních variant v genu *FOXE3*
5. Molekulárně genetická analýza a popis fenotypu X-vázané megalokornei
6. Genetická a fenotypová charakterizace kohorty pacientů s výskytem Axenfeldova-Riegerova syndromu
7. Molekulárně genetická analýza pacientky s dysgenezí předního segmentu oka a výskytem slimáčích stop na rohovce

3. Seznam publikací, které jsou podkladem pro vznik disertační práce

Prvoautorské

1. **Moravikova J, Kozmik Z, Hlavata L, Putzova M, Skalicka P, Michaelides M, Malinka F, Dudakova L, Liskova P. Phenotype Variability in Czech Patients Carrying PAX6 Disease-Causing Variants. *Folia Biol.* (2020);66(4):123-132. IF = 1,167, Q3, Příloha 1**
2. **Moravikova J, Honzik T, Jadvidzakova E, Zdrahalova K, Kremlikova Pourova R, Korbassova M, Liskova P, Dudakova L. Hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome in three Czech families: molecular genetic testing and clinical implications. *J AAPOS.* (2020) Dec;24(6):352.e1-352.e5. IF = 1,6, Q2, Příloha 2**
3. **Jedlickova J., Vajter M., Barta T., Black G., Perveen R., Mares J., Fichtl M., Kousal B., Dudakova L. and Liskova P. *MIR204* n.37C>T variant as a cause of chorioretinal dystrophy variably associated with iris coloboma, early-onset cataracts and congenital glaucoma. *Clinical Genetics.* (2023);1-9. IF = 4,296, Q1, Příloha 3**

Spoluautorské

1. Reis LM, Sorokina EA, Dudakova L, **Moravikova J**, Skalicka P, Malinka F, Seese SE, Thompson S, Bardakjian T, Capasso J, Allen W, Glaser T, Levin AV, Schneider A, Khan A, Liskova P, Semina EV. **Comprehensive phenotypic and functional analysis of dominant and recessive FOXE3 alleles in ocular developmental disorders. *Hum Mol Genet.* (2021) Aug 12;30(17):1591-1606. IF = 3,5, Q1, Příloha 4**
2. Dudakova L, Tuft S, Cheong SS, Skalicka P, **Jedlickova J**, Fichtl M, Hlozaneck M, Filous A, Vaneckova M, Vincent AL, Hardcastle AJ, Davidson AE, Liskova P. **Novel disease-causing variants and phenotypic features of X-linked megalocornea. *Acta Ophthalmol.* (2022) Jun;100(4):431-439. IF = 3,4, Q1, Příloha 5**
3. Reis LM, Maheshwari M, Capasso J, Atilla H, Dudakova L, Thompson S, Zitano L, Lay-Son G, Lowry RB, Black J, Lee J, Shue A, Kremlikova Pourova R, Vaneckova M, Skalicka P, **Jedlickova J**, Trkova M, Williams B, Richard G, Bachman K, Seeley AH, Costakos D, Glaser TM, Levin AV, Liskova P, Murray JC, Semina EV. **Axenfeld-Rieger syndrome: more than meets the eye. *J Med Genet.* (2022) Jul 26;jmedgenet-2022-108646. IF = 4, Q1, Příloha 6**
4. Skalicka P, **Jedlickova J**, Horinek A, Trkova M, Davidson AE, Tuft SJ, Dudakova L, Liskova P. **Snail Track Lesion with Flat Keratometry in Anterior Segment Dysgenesis Caused by a Novel FOXCI Variant. *J Clin Med.* (2022) Aug 31;11(17):5166. IF = 3,9, Q1, Příloha 7**

4. Metodika

Během experimentální části disertační práce bylo použito široké spektrum metod. Detailní popis a další informace o jednotlivých metodách jsou uvedeny v souvisejících publikacích. Na níže uvedeném obrázku je stručně uveden postup při molekulárně genetické diagnostice probandů s ASD (Obrázek 8).

- Důkladné oftalmologické vyšetření zahrnující vyšetření nejlépe korigované zrakové ostrosti (NKZO), měření výše nitroočního tlaku, fotografie předního segmentu oka a vyšetření fundu
- V případě potřeby bylo doplněno celkové vyšetření pediatrem, vyšetření sluchu, neurologické vyšetření, biochemické vyšetření (měření sérových hladin feritinu, železa, aj.) nebo MRI mozku
- Genealogické vyšetření (zpracováno v programu HaploPainter)
- Izolace DNA ze vzorků venózní krve pomocí kitu Gentra Puregene Blood Kit Plus (QIAGEN) nebo ze vzorků slin pomocí kitu PrepIT-L2P (DNA Genotek)
- Spektrofotometrické měření koncentrace a čistoty DNA na přístroji Nanodrop One (ThermoFisher Scientific)
- Fluorometrické měření koncentrace DNA na přístroji Qubit (ThermoFisher Scientific)
- Příprava primerů pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) pomocí programu Primer3 a následná analýza oligonukleotidů programem OligoAnalyzer Tool
- PCR reakce byla prováděna pomocí Platinum SuperFi II Green PCR Master Mix (Invitrogen) v termocykleru Biometra TOne 96 G (Analytik Jena)
- Pročištění PCR produktů pomocí ExoSAP-IT (ThermoFisher Scientific)
- Analýza PCR produktu pomocí čtyřkapilárního analyzátoru 3130 Genetic Analyzer, šestnáctikapilárního 3130xl Genetic Analyzer a čtyřadvacetikapilárního 3500 Genetic Analyzer (všechny značky Applied Biosystems, USA)
- Analýza sekvenčních dat ve formátu Chromatogram file (.seq) ve volně dostupném softwaru Chromas 2.6.6 (Technelysium)
- Exomové a genomové sekvenování na platformě Illumina, analyzátozem NovaSeq 6000s (Illumina)

- Sekvence ve formátu FASTAQ (.fq) byly bioanalyticky zpracovány v programu Novoalign společnosti NovoCraft, mapovány na sekvenci lidského referenčního genomu (UCSC Genome Browser hg19) a následně zkonvertovány do souborů formátu BAM (.bam) a BAI (.bai)
- Data dále analyzována pomocí softwaru Integrative Genomics Viewer (IGV)
- Vyšetření CNV pro odhalení rozlehlejších delecí nebo duplikací pomocí Infinium Global Screening Array-24 (Illumina)
- Vyšetření paternity/maternity pomocí kitu AmpFLSTR Identifiler Plus PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific) a AMLX/Y testem

Popis nalezených, potenciálně patogenních variant

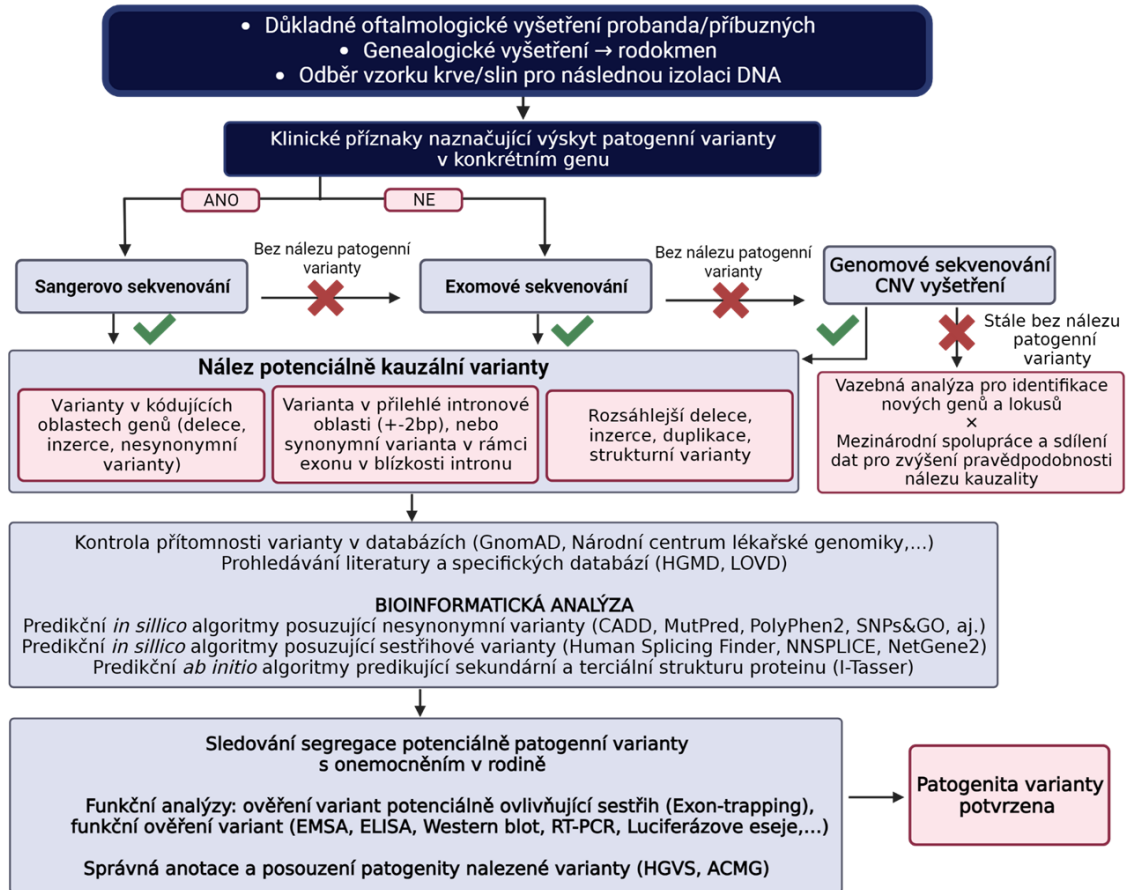
- Anotace nalezených variant probíhala dle doporučení Human Genome Variation Society (HGVS)
- Frekvence nalezených variant byly kontrolovány v databázi gnomAD v2.1.1 zobrazující data z 125 748 exomů a 15 708 genomů a také ve verzi 3.1.2 zobrazující data ze 76 156 genomů od nepříbuzných jedinců (přístup 6/2023)
- Hodnocení patogenity detekovaných variant dle doporučení American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (Richards et al. 2015)

Predikční analýzy a funkční studie

- Zhodnocení patogenity variant pomocí kombinace predikčních algoritmů: Revel, SIFT, Polyphen2, MutationTaster, FATHMM, NetGene2, MaxEntScan, NNsplice, nástroj miRDB. aj.
- *Ab initio* semi-empirické predikce sekundární a terciální struktury proteinů (program I-Tasser)
- Klonování a transfekce
- Ověření vlivu variant na sestřih pre-mRNA metodou Exon-trappingu – metoda byla optimalizována v diplomové práci
- Western blot analýzy
- RNA izolace a Real-Time qPCR
- Gelová retardační analýza (EMSA, Electrophoretic mobility shift assay)
- Kvantifikační proteinová analýza (ELISA)
- Imunobarvení pomocí N-koncového epitopu FLAG

- Analýza transkripční aktivity proteinů byla testována pomocí luciferázových kotransfekčních testů za použití (FHB)6-TK-luc reportéru

Schématický postup návaznosti jednotlivých kroků analýzy je znázorněn na Obrázku 8.



Obrázek 8: Schéma postupu vyšetření a molekulárně genetické diagnostiky u pacientů s ASD.

5. Výsledky a komentáře k publikovaným pracím

V průběhu vypracovávání disertačního projektu se povedlo zpracovat a ve formě publikačních výstupů zpracovat popis fenotypu a molekulárně genetické příčiny u 51 pacientů z 23 rodin vyšetřených na Oční klinice 1. LF UK a VFN v Praze s různými typy ASD a kataraktami.

5.1. Identifikace příčinných variant v genu *PAX6* a ověření vlivu dvou variant na sestřih pre-mRNA

Příloha 1: Phenotype Variability in Czech Patients Carrying *PAX6* Disease-Causing Variants

Molekulárně genetická analýza v šesti rodinách s nálezem aniridie pomohla odhalit kauzální varianty v genu *PAX6* (referenční sekvence NM_000280.4; NG_008679.1) pomocí přímého sekvenování u tří probandů (rodiny 2, 5 a 6) a u zbylých tří pomocí exomového sekvenování (rodiny 1, 3 a 4).

U probandky z rodiny 1 (Obrázek 9) byla v heterozygotním stavu identifikována doposud nepopsaná delece 11 nukleotidů c.111_120del, která způsobuje posun čtecího rámce; p.(Arg38Thrfs*13). V důsledku takto zásadního posunu a s tím spojeným výskytem předčasného stop kodonu předpokládáme, že molekula mRNA vzniklá z této alely je buňkou likvidována pomocí NMD mechanismu.

U probandky z rodiny 2 byla v heterozygotním stavu nalezena varianta c.183C>G, která vede ke tvorbě stop kodonu; p.(Tyr61*). Tato varianta byla již dříve popsána ve spojitosti s výskytem aniridie (Perez-Solorzano et al. 2017). Jelikož nebyla varianta přítomna ani u jednoho z rodičů, bylo provedeno testování paternity a maternity a předpokládáme, že varianta vznikla *de novo* mechanismem, nebo se může jednat o případ germinálního mozaicismu. I v tomto případě bude pravděpodobně mRNA likvidována mechanismem NMD.

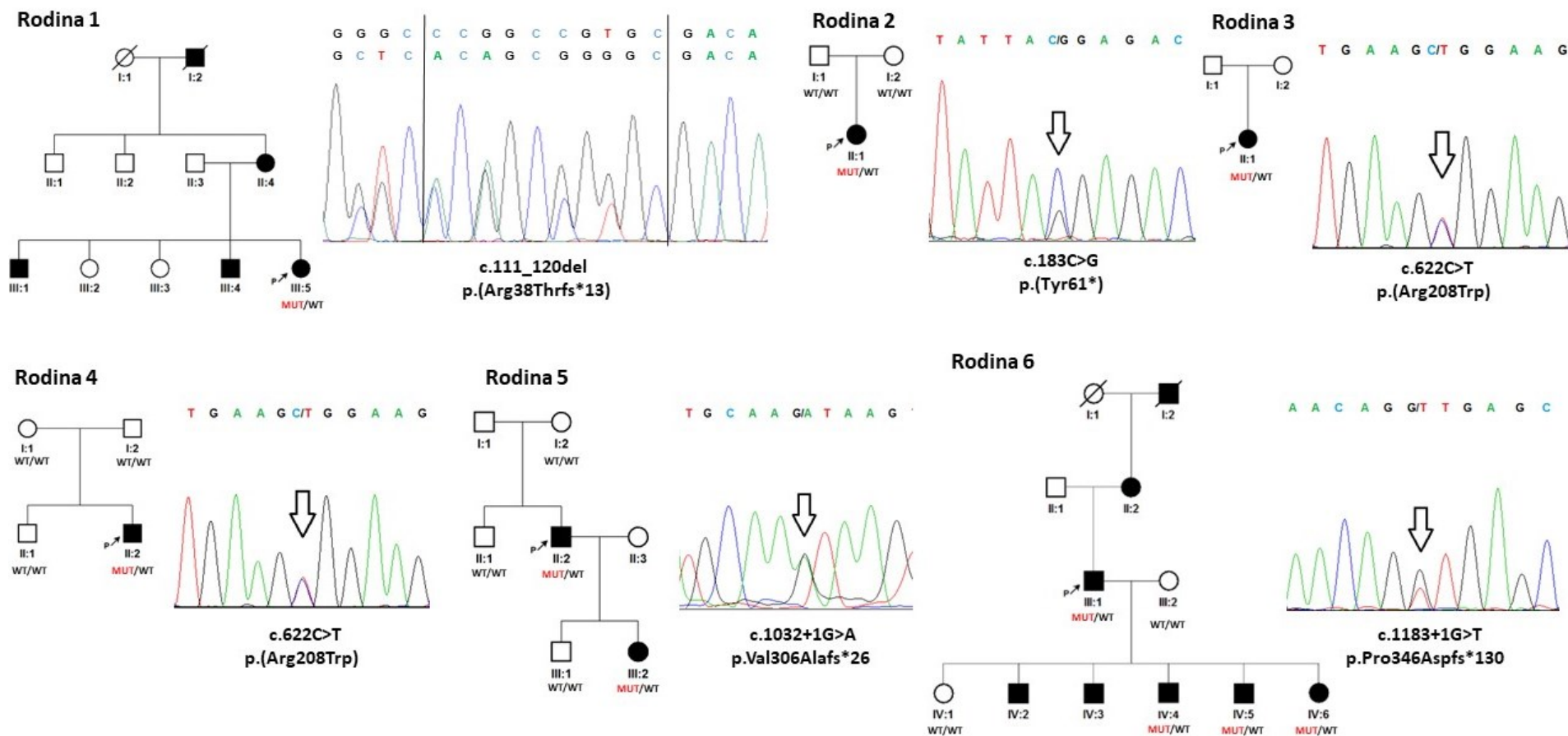
Varianta c.622C>T p.(Arg208Trp) byla identifikována hned ve dvou rodinách; v rodině 3 a 4. Aminokyselinová substituce se nachází ve vysoce konzervované doméně, nesoucí jaderný lokalizační signál, tzv. homeonukleární lokalizační signál, přičemž konzervovanost této sekvence byla ověřena programem T-coffee. Aminokyselinová záměna v této oblasti může vést ke zhoršenému transportu proteinu *PAX6* do jádra, kde vykonává funkci transkripčního faktoru (Ploski et al. 2004). Tato varianta byla již dříve popsána

a pozorována v několika dalších rodinách s výskytem aniridie (Hanson et al. 1993, Goolam et al. 2018). Chybějící rodinná anamnéza a negativní cílený screening varianty u rodičů probanda z rodiny 4, naznačoval původ varianty *de novo*, nebo výskyt germinálního mozaicismu. Rodinní příslušníci probanda z rodiny 3 nebyli bohužel k dispozici ke genetickému vyšetření.

V rodině 5 a 6 se povedlo odhalit variantu na rozhraní intron-exon; c.1032+1G>A (rodina 5) a c.1183+1G>T (rodina 6). Tyto varianty, byly vyhodnoceny dostupnými *in silico* predikčními nástroji jako narušující sestřih. Varianta c.1032+1G>A byla již v minulosti pozorována u 2 probandů s aniridií (Jordan et al. 1992, Malandrini et al. 2001), ale varianta c.1183+1G>T nebyla doposud v literatuře popsána. Segregační analýza těchto dvou variant v rámci jednotlivých rodin podpořila jejich patogenitu (Obrázek 9). Experimentální ověření a charakterizace vlivu obou variant na sestřih molekuly pre-mRNA bylo provedeno metodou Exon-trappingu.

Varianta c.1032+1G>A vede k vynechání celého exonu 11 ze sekvence mRNA, k posunu čtecího rámce s předpokládanou inzercí předčasného stop kodonu po začlenění 25 jiných aminokyselin (p.Val306Alafs*26). Varianta c.1183+1G>T vede k vynechání celého exonu 12 ze sekvence mRNA, přičemž pravděpodobně dochází k začlenění 129 jiných aminokyselinových zbytků a tím také k prodloužení proteinu o 51 aminokyselin oproti referenční proteinové sekvenci (p.Pro346Aspfs*130). V obou případech dochází ke ztrátě karboxylového konce proteinu PAX6 a k výraznému ovlivnění jeho funkce transkripční aktivace. Takto může v buňkách vznikat aberantní protein, anebo je molekula mRNA buňkou likvidována.

Klinické nálezy jednotlivých pacientů jsou popsány v Tabulce 1 a vybrané fenotypové projevy na Obrázku 7. NKZO byla snížena u všech postižených subjektů v rozmezí od 0,5 až po úplnou nevidomost. Úplná absence duhovky byla pozorována u 13 z 22 zkoumaných očí. Kongenitální nebo juvenilní katarakta byla pozorována u 9 pacientů a sekundární glaukom u 4 jedinců. Jedinec II:2 z rodiny 4 neměl žádné defekty duhovky a na molekulárně genetickou analýzu byl odeslán pro oboustrannou přední polární kataraktu.



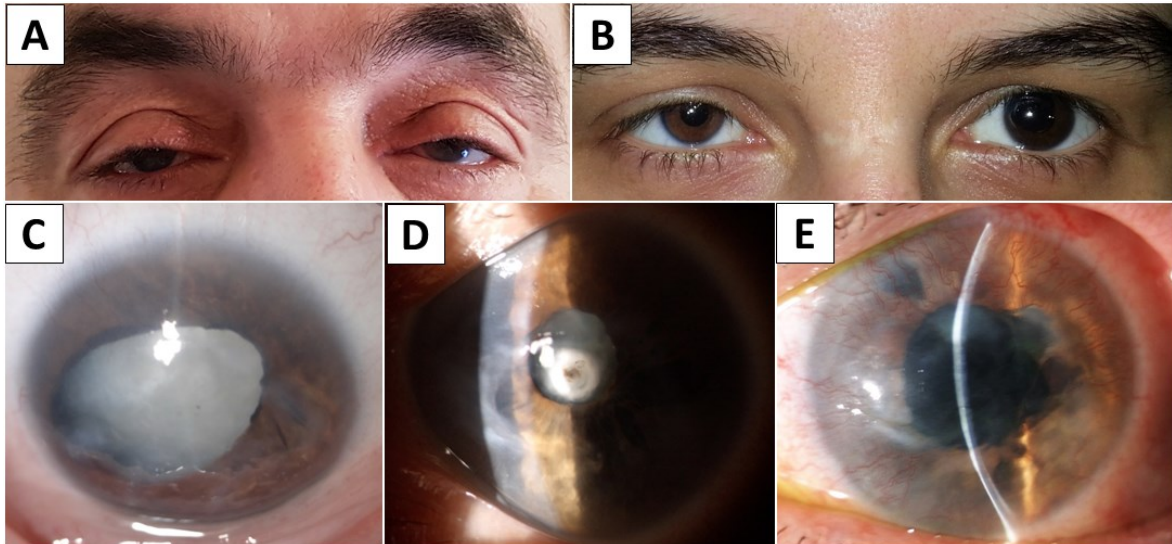
Obrázek 9: Výsledky genetického a genealogického testování pacientů s aniridií. Bylo detekováno 5 různých mutací v genu *PAX6*. MUT (mutant) mutantní alela; WT (wild type) divoká alela. Referenční sekvence genu *PAX6*: NM_000280.

Tabulka 1. Klinické nálezy 11 jedinců s variantami v genu *PAX6*.

ID/věk (let)	NKZO		Oční nálezy	
	OP	OL	OP	OL
R1-II:4/50	0,02	VS	Nystagmus, kompletní aniridie, makulární hypoplazie, glaukom od 18 let	Nystagmus, kompletní aniridie, glaukom od 18 let
R1-III:5/27	VS	VS	Nystagmus, parciální aniridie, makulární hypoplazie, glaukom od 9 let	Nystagmus, parciální aniridie, makulární hypoplazie, glaukom od 9 let
R2-II:1/31	0,5	0,5	Mírná ptóza, kompletní aniridie, zadní i přední subkapsulární katarakta, mírná hypoplazie makuly	Parciální aniridie, zadní subkapsulární katarakta, mírná hypoplazie makuly
R3-II:1/32	0,1	PR	Nystagmus, mikrokornea, parciální aniridie, chorioretinální kolobom	Nystagmus, mikrokornea, parciální aniridie, chorioretinální kolobom
R4-II:2/8	0,3	0,4	Vysoká myopie (- 14 D), nystagmus, přední polární katarakta, kolobom optického nervu, mírná hypoplazie makuly	Vysoká myopie (- 15 D), nystagmus, přední polární katarakta, kolobom optického nervu, mírná hypoplazie makuly
R5-II:2/46	0,01	0,01	Těžká ptóza, nystagmus, parciální aniridie, přední polární katarakta, hypoplazie makuly, glaukom od 42 let	Těžká ptóza, nystagmus, hypoplazie duhovky, přední polární katarakta, hypoplazie makuly, fibrovaskulární pannus
R5-III:2/11	0,2	0,2	Nystagmus, embryotoxon, keratopatie, kompletní aniridie hypoplazie makuly	Nystagmus, embryotoxon, keratopatie na periferii, kompletní aniridie, hypoplazie makuly
R6-III:1/46	0	0,2	Nystagmus, keratopatie, kompletní aniridie, posttraumatická ztráta zraku	Nystagmus, kompletní aniridie, nukleární katarakta, makulární hypoplazie, glaukom
R6-IV:4/20	0,02	0	Nystagmus, kompletní aniridie, chorioretinální kolobom, makulární hypoplazie, glaukom od 13 let	Nystagmus, kompletní aniridie, chorioretinální kolobom, posttraumatická ztráta zraku
R6-IV:5/16	0,15	0,15	Nystagmus, kompletní aniridie, keratopatie, glaukom od 16 let	Nystagmus, kompletní aniridie, keratopatie, glaukom od 16 let
R6-IV:6/15	0,1	0,1	Nystagmus, kompletní aniridie, přední polární katarakta, chorioretinální kolobom, makulární hypoplazie	Nystagmus, kompletní aniridie, přední polární katarakta, chorioretinální kolobom, makulární hypoplazie

Zkratky: NKZO nejlépe korigovaná zraková ostrost, D dioptrie, OL oko levé, OP oko pravé, PR pohyby (rukou), R rodina, VS vnímání světla (světlocit).

Kromě běžných fenotypových projevů, jako je částečná nebo úplná ztráta duhovky a hypoplazie makuly, jsme pozorovali u námi vyšetřených pacientů i vzácné fenotypové projevy, jako například kombinace vrozené ptózy, hypoplazie duhovky, přední polární katarakty a poruchu glukózové tolerance u probanda II:1 z rodiny 5 (Obrázek 12). Tento fenomén byl již v minulosti popsán v souvislosti s variantou v genu *PAX6* (Peter et al. 2013). Nicméně dcera probanda, nesoucí stejnou patogenní variantu měla typickou aniridii bez ostatních nálezů.



Obrázek 10: Vybrané klinické nálezy pacientů s variantami v genu *PAX6*. (A) Bilaterální vrozená ptóza u jedince II:2 z rodiny 5 ve věku 46 let. (B) Unilaterální ptóza u probandky II:1 z rodiny 2. (C-E) Detailnější nálezy pacienta II:2 z rodiny 5; Parciální aniridie a přední polární katarakta na OP (C). Hypoplazie duhovky a přední polární katarakta na OL ve věku 44 let (D), keratopatie fibrovaskulárního pannu a vaskularizace na OP (ve věku 46 let (E)). OL oko levé, OP oko pravé.

Celkově bylo identifikováno šest různých heterozygotních variant v genu *PAX6*, přičemž varianty c.111_120del a c.1183+1G>T byly popsány zcela poprvé. Bylo experimentálně prokázáno, že varianty c.1183+1G>T a c.1032+1G>A vedou k aberantnímu sestřihu s přeskočením celého jednoho exonu ze sekvence mRNA a s následným posunem čtecího rámce v obou případech. Fenotypové projevy onemocnění byly variabilní jak mezi jednotlivými rodinami, pak také i v rámci jednotlivých jedinců konkrétních rodin. Naše studie tedy rozšířila známé spektrum patogenních variant v genu *PAX6* a potvrdila, že související fenotypové projevy mohou být velmi variabilní.

5.2. Molekulárně genetická diagnostika syndromu hereditární hyperferritinemie-katarakty ve třech českých rodinách

Příloha 2: Hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome in three Czech families: molecular genetic testing and clinical implications

Studie stanovila molekulárně genetickou diagnózu u tří českých probandů s HHCS u kterých bylo provedeno komplexní oční i systémové vyšetření, včetně měření sérových hladin feritinu i železa. U všech probandů byla nalezena varianta v oblasti 5'UTR genu *FTL* (referenční sekvence NM_000146.3; NG_008152.1).

V případě probandky II:1 z rodiny 7 (Obrázek 11A) nebyl popsán familiární výskyt juvenilních katarakt nebo systémového onemocnění. Ve věku 7 let byla opakovaně vyšetřována pro chronickou tonzilitidu. Náhodně u ní byly detekovány vysoké hladiny sérového feritinu

(Tabulka 2) v rozsahu 750–1216 µg/l (referenční hladiny 7–140 µg/l). Klinická dokumentace, včetně snímků MRI mozku, jater a srdce, nenaznačovala výskyt nadměrných hladin železa. Bylo provedeno také genetické testování genu *HFE* (pro vyloučení HH) bez nálezu kauzální varianty a bylo doporučeno oftalmologické vyšetření, pro vyloučení HHCS. Byly zjištěny nevýznamné bilaterální opacity čočky, zraková ostrost byla zcela v normě a ani tento výsledek nevedl ke stanovení správné diagnózy.

V 8,5 letech dosáhly hladiny feritinu 1275,1 µg/l, což vedlo ošetřující lékaře k zahájení chelatační terapie Deferasiroxinem 500 mg (25 mg/kg), který byl podáván denně perorálně. Sedmý den léčby začala pacientka zvracet, ztratila vědomí a vznikly u ní křeče. Laboratorní vyšetření první den kómatu ukázalo hyperamonémii (710 µmol/l), metabolickou acidózu a akutní selhání ledvin s oligurií a azotemií (kreatinin 266 µmol/l, močovina 14 mmol/l). Testy jaterních funkcí, sérového albuminu, glykémie a protrombinu byly v normě. Deferasirox byl vysazen a byla zahájena hemodialýza, která rychle vyřešila hyperamonémii a došlo k postupnému zotavení. Během tří dnů došlo u pacientky k vymizení neurologické symptomatologie a celá událost byla vyhodnocena jako idiosynkratická (neobvyklá reakce na léčivo, nezávislá na dávce).

Po zotavení probandky byla rodina odeslána na vyšetření ke klinickému genetikovi, který indikoval screening oblasti IRE genu *FTL*. Identifikována byla varianta c.-167C>T v heterozygotním stavu, která potvrdila diagnózu HHCS. Ani jeden z rodičů neměl laboratorní nebo klinické příznaky HHCS a zároveň nebyli nositeli varianty c.-167C>T. Následné vyšetření paternity potvrdilo výskyt varianty *de novo* mechanismem nebo na základě germinálního mozaicismu. Opakované oftalmologické vyšetření, provedené ve věku 8,5 let zdokumentovalo bilaterální opacity v obou čočkách (Obrázek 11B). Vyšetření NKZO bylo v normě, 0,9 bilaterálně, s korekcí -1,0 D.

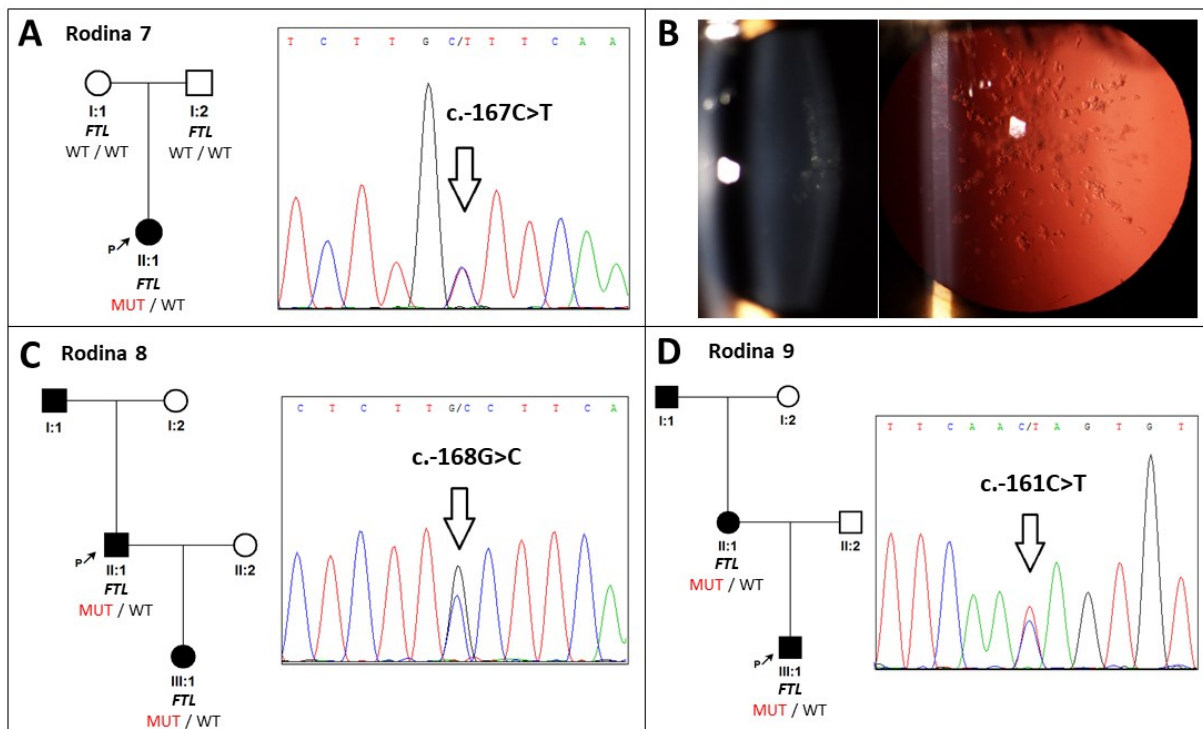
U probanda z rodiny 8 (II:1, Obrázek 11C) byla ve věku 43 let náhodně odhalena hyperferitinémie během léčby plicní embolie (následek klavikulární zlomeniny). Neměl žádné známky přetížení organismu železem a také hladiny železa v séru byly v normě (Tabulka 2). Opacity v čočce byly u něj poprvé detekovány ve věku 3 let a ve 20 letech byl šedý zákal operačně odstraněn. Otec probanda podstoupil operaci katarakty bilaterálně ve věku 40 let. Rodinná anamnéza dále naznačila, že babička probanda měla, stejně jako několik dalších příbuzných, také kataraktu s časnou manifestací. U probandovy dcery (III:1, Obrázek 11C) byl šedý zákal diagnostikován již ve 3 letech a ve věku 4,5 let u ní byla také nalezena hyperferitinémie (Tabulka 2). Oftalmologické vyšetření ve věku 5 let zdokumentovalo snížení NKZO na 0,2 bilaterálně a četné malé opacity v čočce.

V dokumentaci byly uvedeny také výsledky genetického testování variant v genu *HFE* (referenční sekvence NM_000410.3). Bylo zjištěno, že proband složeným heterozygotem pro varianty c.193A>T p.(Ser65Cys) a c.845G>A p.(Cys282Tyr), zatímco jeho dcera (III:1) a jeho otec (I:1) jsou pouze heterozygotními nositeli varianty c.193A>T. Interpretace potenciální patogenity variant v *HFE* byla chybná, což vedlo k zahájení léčby v podobě venepunkce (pouštění žilou), každé 3 týdny. Nicméně rodině byla dále doporučena i návštěva klinického genetika, který indikoval, na základě zjevného autozomálně dominantního způsobu dědičnosti, screening oblasti IRE genu *FTL*. Tato analýza potvrdila podezření na HHCS nálezem heterozygotní varianty c.-168G>C v genu *FTL*, která byla přítomna u všech dostupných, postižených rodinných příslušníků (Obrázek 11C).

U probanda z rodiny 9 (III:1, Obrázek 11D) byla hyperferitinémie s normálními hladinami železa v séru (Tabulka 2) nelezena náhodně, když byl ve věku 3 let vyšetřován pro bolesti kloubů a opakované horečnaté epizody. Byla stanovena diagnóza HH, ale dostupná klinická dokumentace uváděla negativní testování nejčastějších variant v genu *HFE*. Klinické podezření na HHCS vedlo k cílenému screeningu a identifikaci heterozygotní varianty c.-161C>T v genu *FTL* (Obrázek 11D). Stejná mutace byla nalezena u probandovy matky. Teprve po tomto pozitivním výsledku bylo na základě cíleného dotazu zjištěno, že u ní byla také diagnostikována bilaterální katarakta vedoucí pouze k mírnému snížení NKZO (0,7 na OP a 0.6 na OL). Dle informací rodiny měl i dědeček probanda (I:1, Obrázek 11D) zvýšené hladiny feritinu v séru a v dospělém věku podstoupil operaci katarakty.

U všech ze tří probandů byly detekovány patogenní varianty v 5'UTR oblasti genu *FTL*: c.-161C>T, c.-167C>T a c.-168G>C, přítomné v heterozygotním stavu. Všechny tyto mutace byly již dříve popsány ve spojitosti s HHCS (Millonig, Muckenthaler and Mueller 2010, Mumford et al. 1998, Balas et al. 1999, Campagnoli et al. 2002). Dvě segregovaly v rodině s fenotypem onemocnění a v jednom případě (c.-167C>T) se varianta vyskytla u probandky izolovaně. Před stanovením molekulární diagnózy byla u dvou probandů stanovena nesprávná diagnóza HH.

Ačkoli je HHCS je velmi vzácný s odhadovanou prevalencí 1 postižený na 200 000 jedinců, naše výsledky zdůrazňují potřebu dále zvyšovat povědomí o této nemoci (Craig et al. 2003). Ani nepřítomnost rodinné anamnézy nevylučuje diagnózu HHCS, jelikož patogenní varianta se vzácně může objevit de novo. Alarmující je, že nekódující oblasti mohou být vynechávány z diagnostických genových panelů, čímž unikají detekci.



Obrázek 11: Výsledky genetického, genealogického a klinického testování pacientů s HHCS. (A) sekvenční chromatogram a rodokmen rodiny 7, **(B)** fotografie katarakty probandky z rodiny 7; vlevo OP v přímém osvětlení štěrbinovou lampou a vpravo OP v retroiluminaci, bilaterální opacitě se vyskytují v kortexu i v jádru čočky, **(C)** sekvenční chromatogram a rodokmen rodiny 8, **(D)** sekvenční chromatogram a rodokmen rodiny 9. **MUT** (mutant) mutantní alela; **WT** (wild type) divoká alela. Referenční sekvence genu *FTL*: NM_000146.3.

Tabulka 2. Biochemické hodnoty u pěti jedinců se HHCS. U pacientů s vícenásobnými měřeními jsou také zobrazeny zdokumentované rozsahy hladin feritinu.

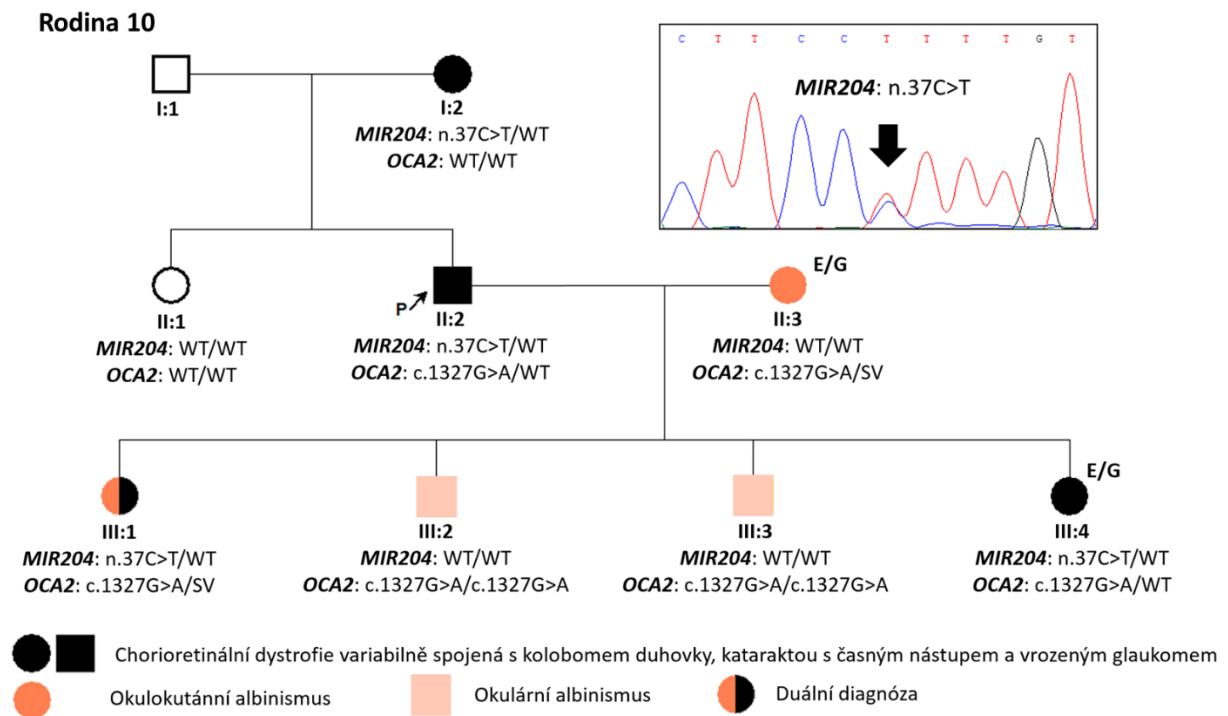
ID	Věk (let)	Železo (μmol/l)	Feritin (μg/l)	Rozsah naměřených hodnot (μg/l)	Transferin (g/l)	Saturace transferinu železem (%)
Rodina 7; II:1	7,5	8,7	750	750–1275	2,21	15,7
Rodina 8; II:1	43	24,3	2328	1937–2328	2,18	28
Rodina 9; III:1	4,5	14,6	1861	ND	2,84	20
Rodina 9; II:1	36	13,8	924	ND	ND	ND
Rodina 9; III:1	3,5	20,1	973	973–1000	2,58	31

Běžné hladiny parametrů měřených ze séra; železo: děti (ve věku 1–15) 4–24 μmol/l, ženy 6,6–28 μmol/l, muži 7,2–29 μmol/l; feritin: děti (starší než 6 měsíců) 7–140 μg/l, ženy 12–150 μg/l, muži 15–70 μg/l; transferin 2–3 g/l; saturace transferinu 20–50 %. **ND** není dostupné

5.3. Molekulárně genetická analýza v rodině s chorioretinální dystrofií variabilně asociovanou s kolobomem duhovky, presenilní kataraktou, vrozeným glaukomem a albinismem

Příloha 3: *MIR204* n.37C>T variant as a cause of chorioretinal dystrophy variably associated with iris coloboma, early-onset cataracts and congenital glaucoma

Tato práce popisuje molekulárně genetickou analýzu třígenerační rodiny (rodina 10) s výskytem dvou klinických jednotek; retinální dystrofie s časnou manifestací, variabilně asociovanou s kolobomem duhovky, presenilní kataraktou a vrozeným glaukomem spolu s albinismem.



Obrázek 12: Rodokmen rodiny a segregace identifikovaných patogenních variant v *MIR204* a *OCA2*. E exomové sekvenování; G genomové sekvenování; SV strukturální varianta (alela *OCA2* “143kb;184kb CxSV”); WT (wild type) divoká alela. Referenční sekvence *MIR204*: NR_029621.1 a genu *OCA2*: NM_000275.3.

Klinické vyšetření probanda (II:2, Obrázek 12), v kombinaci s jeho předchozí dostupnou klinickou dokumentací, odhalilo bilaterální retinální dystrofii, v minulosti chybně diagnostikovanou jako vrozenou toxoplazmózu (ve věku 13 let) spolu s kongenitální kataraktou. NKZO vykazovala dle dostupné dokumentace postupný pokles, až do stavu počítání prstů na pravém oku a světlocit na levém oku ve věku 25 let (Tabulka 3). Při posledním vyšetření ve věku 41 let byla zdokumentována pokročilá oboustranná chorioretinální atrofie (Obrázek 13G-H, Tabulka 3).

Proband měl čtyři děti; dvě dcery a dva syny, přičemž obě dcery postiženy podobným očním fenotypem ve variabilním rozsahu a stejně tak matka probanda (Obrázek 12, Tabulka 3).

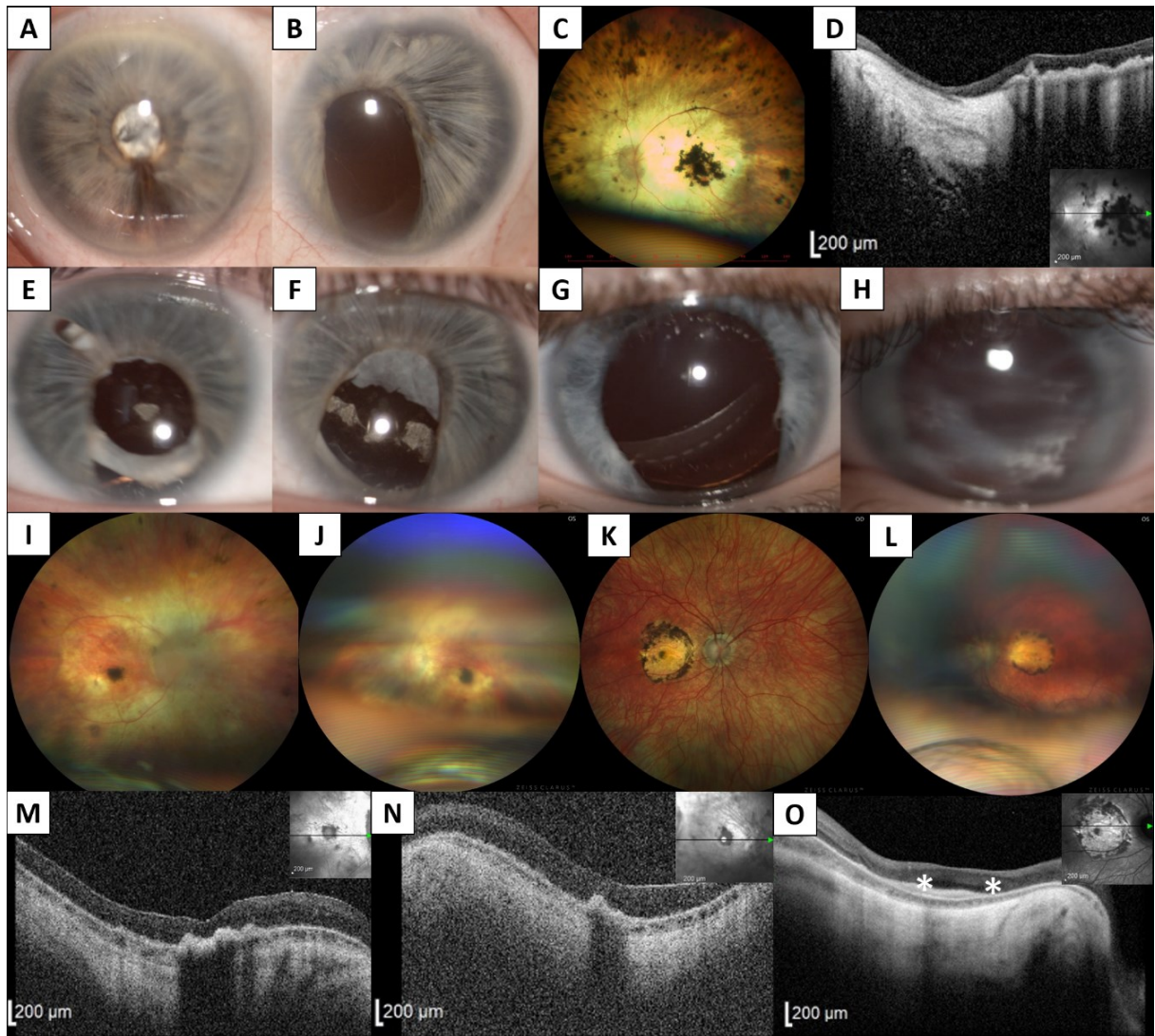
Nejmladší dcera (III:4, Obrázek 12) trpěla vrozeným glaukomem, v době vyšetření už zaléčeným. Další vyšetření u ní odhalilo také bilaterální retinální atrofické léze s pigmentovanými okraji (Obrázek 13K). Nejevila žádné známky katarakty.

Exomové sekvenování provedené u nejmladší dcery probanda (III:4, Obrázek 12) odhalilo heterozygotní variantu n.37C>T v *MIR204* (referenční sekvence NR_029621.1). Segregační analýza potvrdila přítomnost varianty n.37C>T u všech dalších členů rodiny s diagnózou progresivní dystrofie sítnice, tj. u probanda, jeho matky a nejstarší dcery (Obrázek 12).

Tabulka 3. Klinické nálezy 7 jedinců s variantami v *MIR204* a *OCA2*.

ID	Primární diagnóza	Věk (let)	NKZO OP	NKZO OL	Přední segment oka	Zadní segment oka	Další
I:2	CRCCG	34	VS	0,1	OL kolobom duhovky, OO časně manifestující katarakta	OO chorioretinální atrofie s centrálním a periferním shluhováním RPE	Šeroslepost, OO nystagmus
		74	NS	NS			
II:2	CRCCG	13	0,04	0,04	OO persistentní pupilární membrána, OO kolobom duhovky, OO časně manifestující katarakta	OO chorioretinální atrofie s centrálními shluky RPE	Šeroslepost, OO nystagmus
		17	0,04	0,03			
		25	PP	VS			
		41	VS	VS			
II:3	OCA2 (okulokutánní)	42	0,32	0,5	OO průsvitná duhovka	OO hypopigmentace fundu, OO makulární hypoplazie (těžká)	OO nystagmus, světlé vlasy a kůže
III:1	CRCCG OCA2 (okulokutánní)	15	0,04	0,063	OO průsvitná duhovka	OO hypopigmentace fundu, chorioretinální atrofie s nerovnoměrnou RPE distribucí, ale bez tvorby shluků, OO makulární hypoplazie (těžká)	OO nystagmus, OO zúžení zorného pole, světlé vlasy a kůže
III:2	OCA2 (okulární)	10	1,0	1,0	Normální	OO makulární hypoplazie (mírná)	
III:3	OCA2 (okulární)	13	1,0	1,0	Normální	OO makulární hypoplazie (mírná)	
III:4	CRCCG	6	0,06	VS	OO kolobom duhovky, OL pásová keratopatie	OO hypopigmentace fundu, OO atrofické léze na makule ohraničené pigmentovými shluky	OO kongenitální glaukom congenital glaucoma, OO nystagmus

Zkratky: **CRCCG** (chorioretinal dystrophy variably associated with iris coloboma, early-onset cataract) chorioretinální dystrofie variabilně doplněná o kolobom duhovky a časně manifestující kataraktu, **NS** nevnímá světlo, **OO** obě oči, **PP** počítá prsty, **VS** vnímání světla (světlocit), **NKZO OL** nejlépe korigovaná zraková ostrost oko levé, **NKZO OP** nejlépe korigovaná zraková ostrost oko pravé.

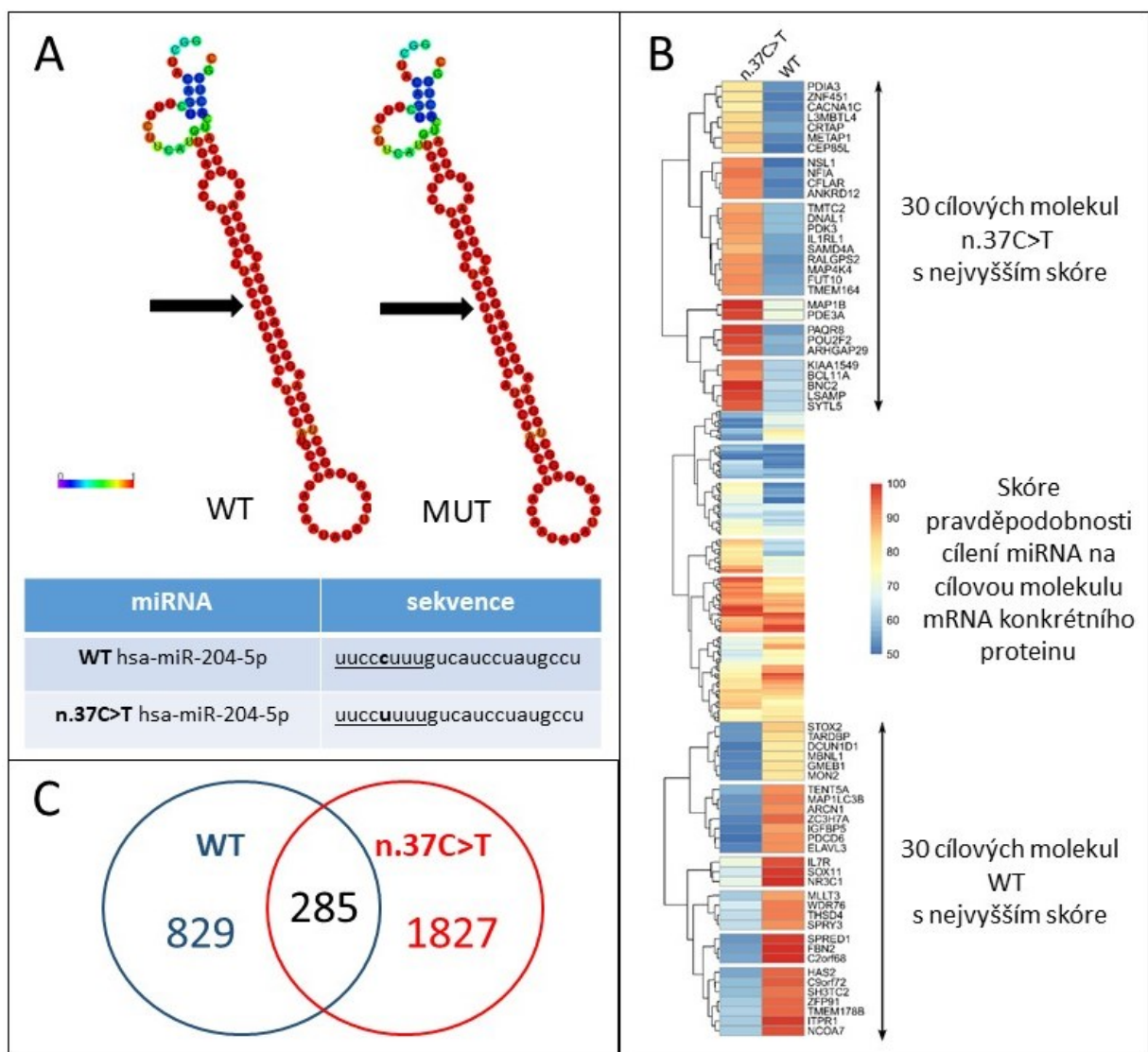


Obrázek 13: Klinické nálezy u tří členů rodiny s dominantně dědičnou chorioretinální dystrofií variabilně spojenou s kolobomem duhovky, kongenitální kataraktou a glaukomem. Fotografie předního segmentu oka jednotlivých členů rodiny; (A-D) matka probanda I:2 s nálezem hypoplazie duhovky a kataraktou na OP (A) hypoplazie duhovky, kolobom a afakie OL (B), fotografie fundu OL ukazující pokročilou chorioretinální atrofii se shluky pigmentu jak v makule, tak na periférii sítnice (C), horizontální SD-OCT sken dokumentující závažné atrofie a ztenčení sítnice a hyperplazie RPE (D). Fotografie předního segmentu oka probanda II:2 (E-F) vykazující hypoplazii duhovky a kolobom na OP (E) a OL (F). Fotografie nejstarší dcery III:4 (G-H) dokumentující hypoplazii duhovky a kolobom na OP (G) a OL (H). Fotografie fundu probanda II:2 (I-J); bledé terče zrakového nervu a pokročilá chorioretinální dystrofie projevující se jako bledý fundus s tenkými cévami, atrofická léze lemovaná pigmentem v oblasti makuly a shluky pigmentu na periférii OP (I) a OL (J). Dcera III:4 (K-L) s kulatou lézí chorioretinální atrofie s pigmentovanými okraji v celé makulární oblasti v OP (K) a OL (L). Odpovídající horizontální SD-OCT skeny OP (M) a OL (N) probanda dokumentují chorioretinální atrofii, zahrnující všechny retinální vrstvy a subfoveální hyperplazii RPE. SD-OCT u dcery také ukazuje chorioretinální atrofii a subfoveální hyperreflexní lézi na podkladě fibrózy (přítomné mezi hvězdičkami) na OP (O). **OL** oko levé, **OP** oko pravé.

Varianta n.37C>T byla již v minulosti popsána u 6 členů pětigenerační rodiny britského původu spolu s fenotypem „retinální dystrofie s kolobomem duhovky s nebo bez vrozené katarakty“ (MIM #616722) (Conte et al. 2015).

Varianta n.37C>T molekuly miR-204 se nachází v místě tzv. seed sekvence, což je v pořadí 2. - 8. nukleotid miRNA vlásenky na jejím 5' konci (Obrázek 14A). Seed sekvence je zodpovědná za rozpoznávání cílových molekul mRNA, jelikož s nimi vykazuje vysokou míru

komplementarity. Substituce n.37C>T se nachází přímo v 5. místě této seed sekvence a vede ke změně rozpoznávacího místa, tím pádem také k cílení na jiný repertoár mRNA molekul (Obrázek 14B-C). Pro ověření schopnosti mutované mRNA vázat se na své cílové molekuly mRNA (na základě komplementarity), byl využit nástroj miRDB (verze 6.0), přičemž seznam jednotlivých genů (resp. mRNA molekul) včetně cílového skóre pro každou z variant, byl použit k vytvoření tzv. teplotní mapy (Obrázek 14B) (Chen a Wang 2020, Liu a Wang 2019). Na základě této *in silico* predikční analýzy se povedlo určit, že miR-204 nesoucí variantu n.37C>T, bude pravděpodobně cílit na 998 molekul mRNA více, než její divoký typ. Jedná se tím pádem o „gain of function“ typ mutace (Obrázek 14C).



Obrázek 14: *In silico* analýza varianty *MIR204* n.37C>T odhaluje změny jejich cílových mRNA molekul a naznačuje mechanismus „gain-of-function“ mutované miR-204. (A) Vlášková struktura WT a n.37C>T varianty miR-204 byla určena pomocí nástroje RNAfold. Černá šipka ukazuje místo změny konkrétního zmutovaného nukleotidu. V tabulce níže je černě podtržena „seed“ sekvence miR-204. (B) Teplotní mapa (tzv. heat mapa) ukazuje srovnání domnělých funkčních důsledků varianty n.37C>T a WT na jednotlivé cílové geny (mRNA molekuly). (C) Počty predikovaných cílených mRNA pro variantu WT i n.37C>T, které byly stanoveny pomocí nástroje miRDB. **MUT** (mutant) mutantní alela, **WT** (wild type).

Zajímala nás dále otázka, zda naše rodina může být příbuzná s rodinou britského původu nesoucí stejnou variantu v *MIR204*, což je důležité z hlediska posuzování její patogenity. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli sestavit haplotyp variant ve vazebné nerovnováze („linkage disequilibrium“) s variantou n.37C>T a molekulárně genetickou analýzu nejmladší dcery jsme doplnili o genomové sekvenování. V kombinaci s genomovou analýzou její matky, která byla provedena v rámci charakterizace *OCA2* přestavby (viz níže) jsme našli 6 vzácných jedno-nukleotidových polymorfismů (SNP, single-nucleotide polymorphism) ve vzdálenosti až 630 kb od varianty v *MIR204* s nízkou populační frekvencí. Žádný z těchto polymorfismů nebyl přítomen v původní britské rodině (ověřeno Sangerovým sekvenováním) a byla tak vyloučena hypotéza společného zakladatele (Tabulka 4).

Tabulka 4. Vzácné SNP polymorfismy ve vazebné nerovnováze s *MIR204* variantou.

Gen	Pozice (hg19)	Vzdálenost od <i>MIR204</i> n.37C>T (bp)	Frekvence v databázi gnomAD v2.1.1
<i>TRPM3</i>	chr9:73185641 G>A	-239323	0.0002230
<i>TRPM3</i>	chr9:73206702 A>G	-218262	0.00009554
<i>TRPM3</i>	chr9:73506456 C>T	+81492	0.005001
<i>TRPM3</i>	chr9:73667559 C>G	+242595	0.00003188
<i>TRPM3</i>	chr9:73974115 A>G	+549151	0.003791
<i>TRPM3</i>	chr9:74055832 T>G	+630868	0.0001593

Identifikace druhé nezávislé rodiny na světě potvrdila patogenitu varianty to n.37C>T v *MIR204* (ACMG kritéria: PS3, PM1, PM2, PP1, PP4) a zároveň naznačila, že fenotyp s touto variantou spojený může zahrnovat také vrozený glaukom.

Albinismus se v rodině vyskytl s variabilními projevy hned ve dvou generacích (manželka probanda: II:3, nejstarší dcera: III:1 a oba synové: III:2 a III:3). Mírnější forma se u synů III:2 a III:3 manifestovala pouze ve formě makulární hypoplazie, která byla odhalena až po přístrojovém oftalmologickém vyšetření, indikovaném pouze v rámci charakterizace nálezů v celé rodině. Synové probanda jsou jinak zcela bez očních obtíží a mají normální NKZO. U nejstarší dcery probanda se vyskytla duální diagnóza albinismu a také CRCCG.

Albinismus se běžně manifestuje autosomálně recesivní dědičností, onemocnění však bylo v rodině přítomno ve dvou generacích a domnívali jsme se proto, že by se mohlo jednat o tzv. pseudodominaci.

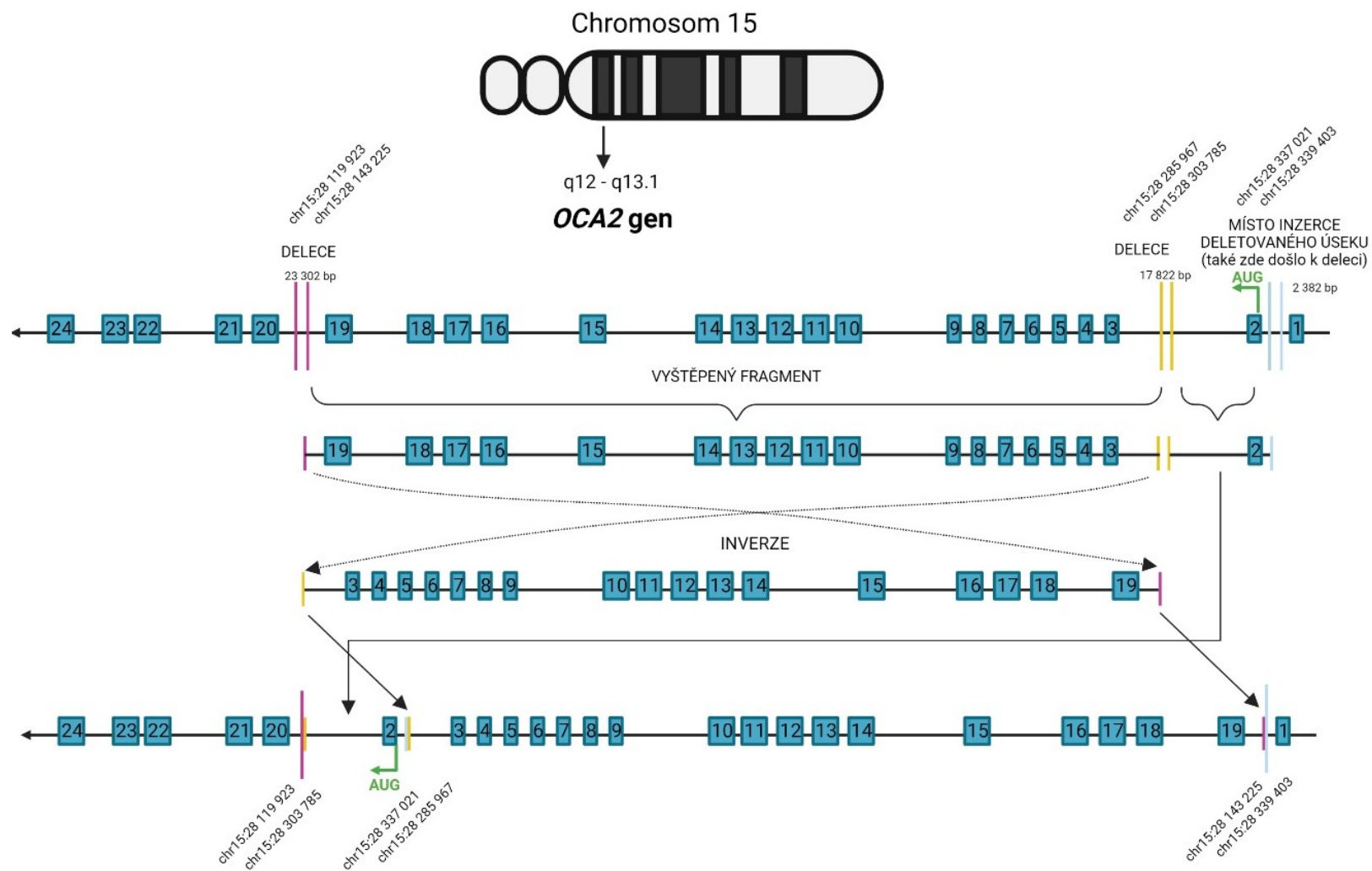
U partnerky probanda se nám povedlo odhalit rozsáhlou přestavbu genu *OCA2* (MIM *611409, referenční sekvence NM_000275.3) na jedné alele a missense variantu

c.1327G>A p.(Val443Ile) v pozici trans (Obrázek 12). Přestože tato missense varianta má poměrně vysokou frekvenci v populačních databázích, např. v gnomAD 0.005096 (tj. 653 alel, včetně 4 homozygotů evropského nefinského původu), je považována za patogenní na základě ACMG kritérií (PM2, PM3, PM1, PS4, PS3, PP4). Konkrétně výskyt varianty c.1327G>A byl již v minulosti popsán v pozici trans s jinou patogenní variantou u více než 40 pacientů s okulárním i okulokutánním albinismem, dále se ukázala se jako příčinná v homozygotním stavu u více než 10 jedinců (Yang et al. 2019, Lasseaux et al. 2018, Hutton a Spritz 2008, Marti et al. 2018). V homozygotním stavu varianta způsobuje pravděpodobně jen okulární formu albinismu manifestující se jako makulární hypoplazie (jak je tomu právě u jedinců III:2 a III:3) (Rocca et al. 2022). Jelikož byl proband náhodným přenašečem této missense patogenní varianty, způsobilo to v této rodině pseudodominanci albinismu, tedy náhodný výskyt autozomálně recesivního onemocnění ve dvou následných generacích.

Složitá genová přestavba byla již dříve několikrát popsána (Rooryck et al. 2011, Loftus et al. 2021). Jedná se o vystřížení téměř 184 kb dlouhého, úseku genu (zahrnující exony 3-19), který je invertován a inzertován do oblasti intronu 2 (Obrázek 15).

Tato varianta je dle nomenklatury HGVS definována jako NC_000015.9:g.[28337021_28339403delins[CCTGGTTGTAGGTCTAACCTGGTTAGAATCA;28143225_28285967inv; C];[28119923_28303785del]. Loftus a kol. navrhli označovat tuto strukturální variantu (SV) jako alelu „143 kb; 184 kb CxSV“ (Loftus et al. 2021). *In silico* programy predikovaly vznik aberantního transkriptu mRNA s novým sestřihovým místem mezi exony 2 a 20, což by mohlo vést k předčasnému zkrácení transkriptu a k tvorbě nefunkčního produktu p.(Ser77Hisfs*7), pravděpodobně likvidovaném NMD mechanismem.

Ukázalo se, že nejstarší dcera probanda (III:1, Obrázek 12) je složený heterozygot pro variantu c.1327G>A a „143 kb; 184 kb CxSV“ alelu (stejně jako její matka) a oba synové nesou *OCA2* c.1327G>A v homozygotním stavu.



Obrázek 15: Grafické znázornění složité strukturální varianty nalezené v sekvenci genu OCA2. Jedná se o vystřížení téměř 184 kb dlouhého, úseku genu (zahrnující exony 3-19), který je invertován a inzertován do oblasti intronu za exonem 1. V místě vystěpení a také po obou stranách inserce tohoto úseku vznikly kratší delece. Alela genu OCA2 se složitou přestavbou se nazývá také “143kb;184kb CxSV”.

5.4. Komplexní fenotypová a funkční analýza autozomálně dominantních i recesivních variant v genu *FOXE3*

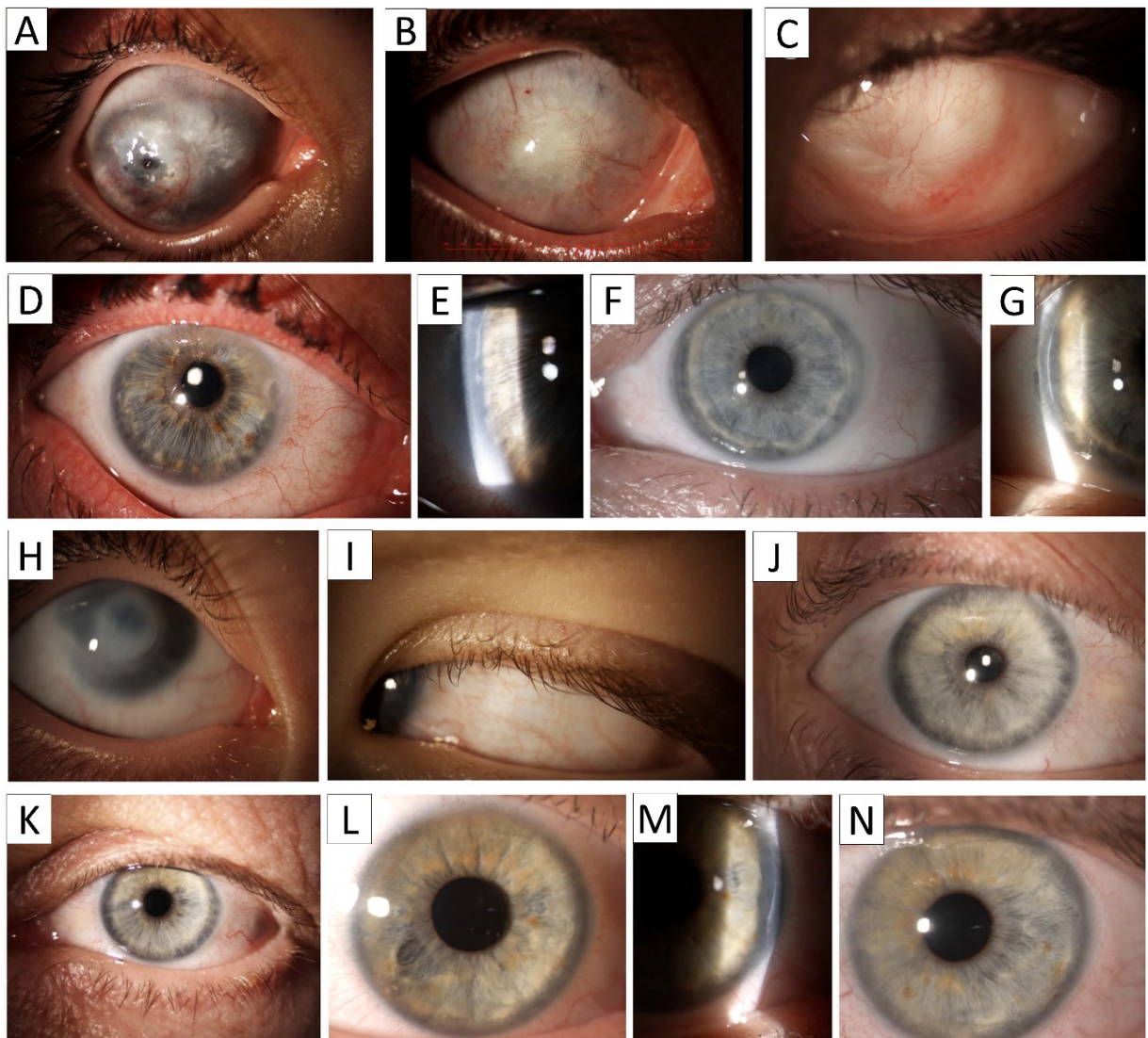
Příloha 4: Comprehensive phenotypic and functional analysis of dominant and recessive *FOXE3* alleles in ocular developmental disorders

Do rozsáhlé studie, která zahrnovala molekulárně genetickou diagnostiku 16 rodin z celého světa s nálezem patogenní varianty v genu *FOXE3* (referenční sekvenční NM_012186.3), bylo zařazeno také 12 pacientů z tří rodin českého původu (v původní publikaci rodiny 7, 15 a 16, Příloha 4). V případě rodiny 11, se jednalo o autozomálně recesivní typ dědičnosti a ve zbývajících dvou případech šlo o autozomálně dominantní typ dědičnosti (rodina 12 a 13). Ve všech případech byla identifikována genetická příčina onemocnění a některé varianty byly ověřeny funkčními *in vitro* experimenty (také dvě ze čtyř variant nalezených u českých probandů).

U probandky z rodiny 11 (II:1, Obrázek 17) s jednostrannou mikroftalmií, oboustrannou sklerokorneou, glaukomem a nystagmem (Obrázek 16A) byly nalezeny, na základě exomového sekvenování, dvě příčinné varianty v genu *FOXE3* c.244A>G p.(Met82Val) a c.543delG p.(Pro182Argfs*42). Pomocí Sangerova sekvenování byla ověřena jejich přítomnost a provedena segreganční analýza (Obrázek 17). Obě varianty také nesla sestra probandky (II:2, Obrázek 17), jejíž fenotyp byl podobný (Obrázek 16B-C). Varianta c.244A>G byla již několikrát v literatuře popsána jako kauzální a v naší kohortě 16 rodin byla také nejčastější (Iseri et al. 2009) (Příloha 4). Varianta byla vyhodnocena jako patogenní na základě ACMG kritérií (PS1, PM1, PM2, PM3, PP2, PP3). Místo, ve kterém se tato mutace nachází, je součástí FHD domény a je evolučně konzervované pro celou rodinu *FOX* genů, napříč mnoha taxony (Clark et al. 1993). Naopak varianta c.543delG nebyla doposud v literatuře popsána a jedná se o variantu, která způsobuje posun čtecího rámce, v jehož důsledku dochází k začlenění 41 chybných aminokyselin do vznikajícího peptidu a tím také k začlenění předčasného stop kodonu. Dle hodnocení ACMG se také jeví jako patogenní (PVS1, PM2, PM3, PP1, PP4).

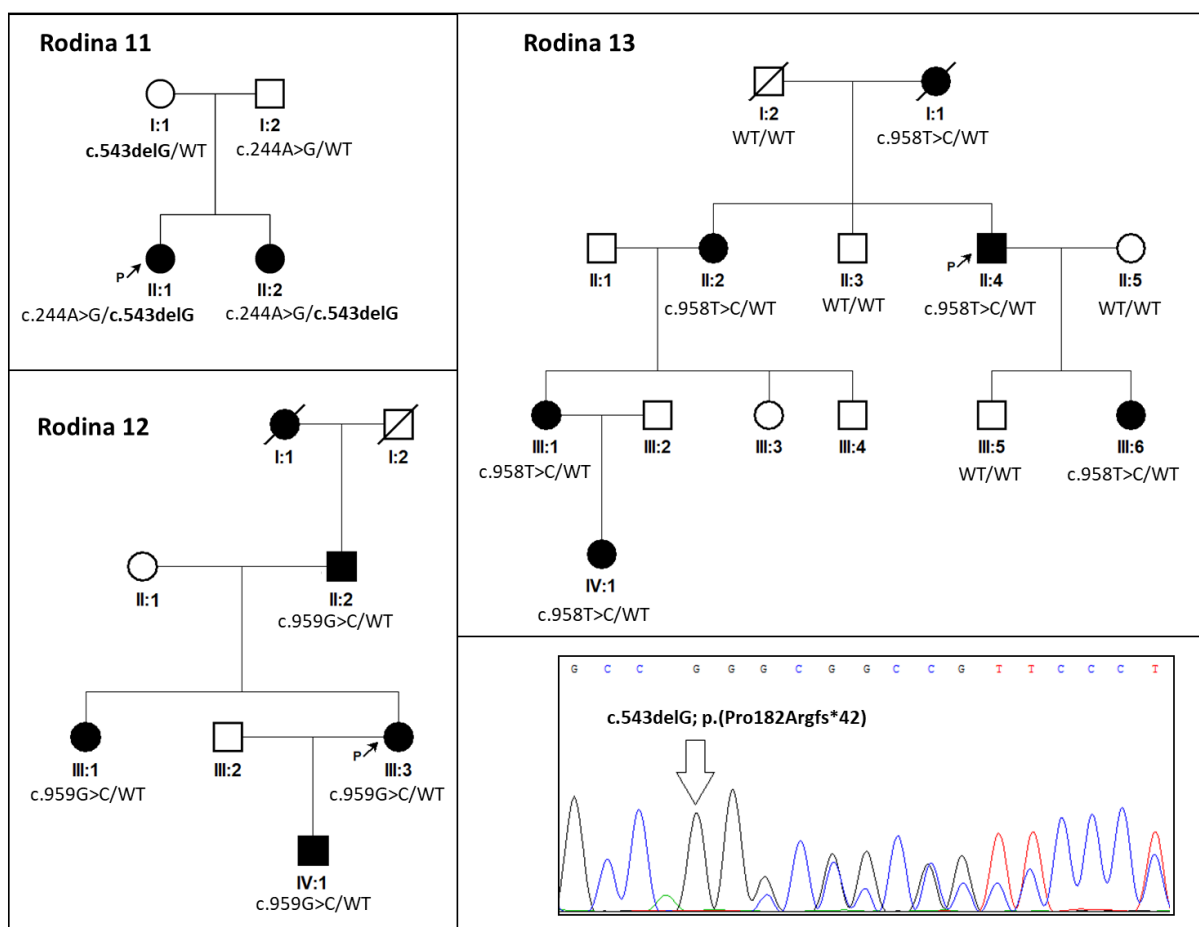
Fenotyp probandky z rodiny 12 (III:3, Obrázek 17) zahrnoval oboustranný zadní embryotoxon, korektopii, mírnou hypoplazii duhovky, iridokorneální adheze a kataraktu (Obrázek 16D-E). Podobný fenotyp vykazoval také otec probandky a její syn. Sestra byla ve věku 58 let oboustranně nevidomá. Dle dokumentace byly abnormality očí viditelné již při narození, v dětství pak prodělala transplantace rohovek. Při vyšetření byla zjištěna oboustranně

sklerokornea. Na základě exomových dat se byla u probandky identifikována jedna varianta v genu *FOXE3* c.959G>C p.(*320Serext*72), Pomocí Sangerova sekvenování byla její přítomnost v heterozygotním stavu ověřena u všech postižených rodinných příslušníků (Obrázek 17) a dle hodnocení ACMG se jeví jako patogenní (PS1, PM1, PM2, PM4, PP1). Tato varianta se nachází přímo v sekvenci stop-kodonu (TGA>TCA), zachovává sice čtecí rámec, ale přidává na C-konec peptidu 72 aminokyselin. Takto může dojít ke změně celé *FOXE3* sekundární a terciální struktury a tím i jeho funkce jako transkripčního faktoru a schopnosti vytvářet dimery (Bremond-Gignac et al. 2010).



Obrázek 16: Klinické nálezy ve třech rodinách s patogenními variantami v genu *FOXE3*. Fotografie předního segmentu oka jednotlivých pacientů; rodina 11 (A-C); probandka II:1 (OP; A) a její sestra II:2 (OP; B, OL; C) obě s nálezem opacit rohovky (OP pacientky II:2 podstoupilo keratoplastiku). Probandka z rodiny 12; II:4 (D-E) s nálezem korektopie a mírnou hypoplazií duhovky (D) a zadním embryotoxonem (E). Pacienti z rodiny 13 (F-N); proband II:4 vykazuje mírnou hypoplazií duhovky a zadním embryotoxonem (OL; F, G); jeho dcera III:4 vykazuje sklerokorneu s centrálním projasněním (OP; H, OL; I); probandova sestra II:2 (OP; J; OL; K) a jeho neteř III:1 (OP; L a M; OL; N) vykazují obě zadní embryotoxon a mírnou hypoplazii duhovky. OL oko levé; OP oko pravé.

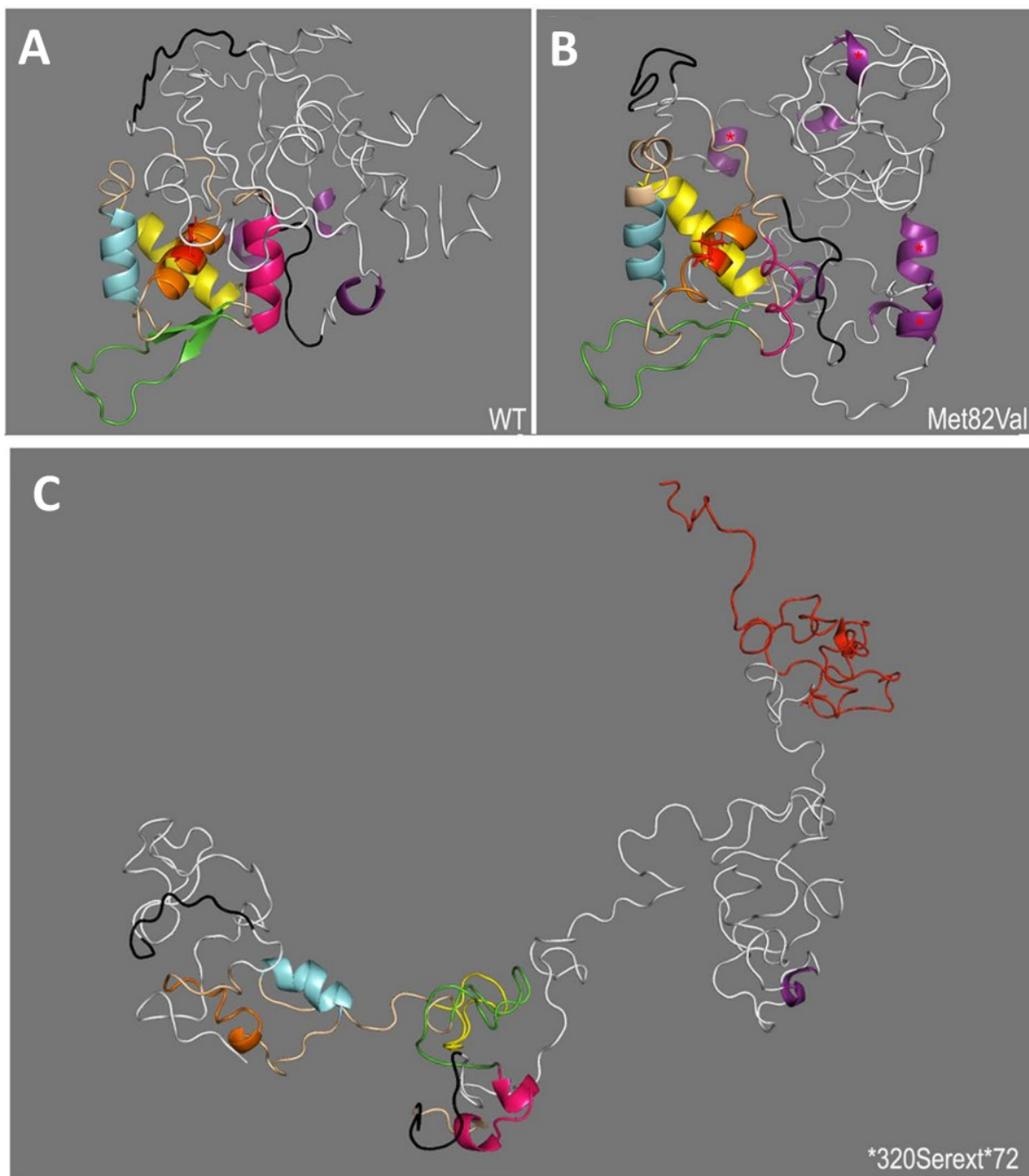
Proband z rodiny 13 (II:4, Obrázek 17) trpěl mírnou hypoplazií duhovky a kongenitální kataraktou, zatímco fenotyp jeho dcery byl mnohem závažnější, manifestující se jako oboustranná sklerokornea s centrálním projasněním a nystagmus (Obrázek 16F-I). Na základě exomových dat byla u probanda nalezena heterozygotně varianta v genu *FOXE3* c.958T>C p.(*320Argext*72). Její přítomnost byla následně prokázána také u dcery, sestry, neteře i jeho matky (tyto však měly pouze kongenitální nebo juvenilní oboustranné katarakty) a jeví se jako patogenní dle ACMG (PS1, PM1, PM2, PM4, PP1). Tato varianta také modifikuje stop-kodon (TGA>CGA), podobným způsobem jako v případě rodiny 12, zachovává čtecí rámec a také přidává na C-konec proteinu *FOXE3* 72 aminokyselin.



Obrázek 17: Výsledky genetického a genealogického testování pacientů s variantami v genu *FOXE3*. Byly detekovány 4 různé mutace v genu *FOXE3* a jedna z nich byla popsána zcela poprvé (značená tučně, včetně sekvenogramu). **WT** (wild type) divoká alela. Referenční sekvence genu *FOXE3*: NM_012186.3

V rámci přípravy publikace, proběhlo na pracovišti zahraničního spolupracovníka prof. E. Seminy (Medical College of Wisconsin, USA) také funkční ověření několika variant, včetně dvou variant českých probandů; p.Met82Val a p.*320Serext*72. *Ab initio* semi-empirické analýzy sekundární a terciální struktury proteinů vznikajících z mutovaných alel ukázaly, že varianta p.Met82Val vede ke zkrácení beta-vlášeny a alfa-helixů vytvářejících FHD doménu

(Obrázek 18B). Varianta způsobující prodloužení C konce proteinu p.*320Serext*72 narušuje sekundární a terciální formaci FOXE3 zcela zásadním způsobem, což má za následek tvorbu nerozeznatelné struktury ve srovnání s divokým typem proteinu (Obrázek 18C).



Obrázek 18: *Ab initio* modely divokého typu a mutantních proteinů FOXE3 získané pomocí programu I-Tasser. V divokém typu se nachází FHD na pozici 71-165 aa a je značená barevně. Předpokládá se, že obsahuje jednu β -vlásečku (129-147 aa) značenou zeleně a čtyři α -helixy (α 1 76-86 aa; značená oranžově, α 2 94-102 aa; značená modře, α 3 112-125 aa; značená žlutě a α 4 149-157 aa značená růžově). Motivy jaderného lokalizačního signálu (57-66 aa a 162-170 aa) jsou zaznačeny černě. Další α -šroubovice mimo FHD jsou značeny fialově. (B) Struktura znázorňující proteinovou sekvenci nesoucí p.Met82Val, kde jsou arteficiální α -helixy vyskytující se mimo FHD označeny červenými hvězdičkami přes fialovou šroubovici. (C) Proteinová sekvence nesoucí p.*320Serext*72, kde C prodloužený koncem je označen červeně.

Proteiny divokého typu a mutantní FOXE3 byly následně také detekovány pomocí Western blot analýzy s použitím N-terminální značky FLAG. Varianta p.Met82Val byla exprimována s podobnou intenzitou jako divoký typ, ale p.*320Serext*72 měla sníženou hladinu exprese cca o 32 %. Následná analýza RT-PCR naopak prokázala, že hladiny exprese byly v případě všech variant srovnatelné s referenčním FOXE3, což naznačuje, že varianta p.*320Serext*72 vede k tvorbě vysoce nestabilního proteinu, který je brzo po translaci postupně degradován.

Imunobarvení pomocí N-koncového epitopu FLAG (8 aminokyselinový epitop navázaný na N-konec proteinu FOXE3) proběhlo v transfekovaných buňkách s jednotlivými proteinovými variantami pro průkaz schopnosti proteinu putovat do jádra, kde běžně působí jako transkripční faktor. V případě všech mutovaných verzí FOXE3 byl výrazně zvýšen cytoplasmatický signál a významně snížen signál jaderný ve srovnání s divokým typem proteinu. EMSA esej byla použita pro ověření DNA-vazebné kapacity mutantních FOXE3 proteinů, přičemž varianta p.Met82Val prokázala značně sníženou schopnost vázat se na cílovou molekulu DNA, oproti tomu varianta p.*320Serext*72 si schopnost navázat se na DNA alespoň částečně zachovala.

Transkripční aktivita divokého typu a mutantních variant FOXE3 byla testována pomocí luciferázových kotransfekčních testů za použití (FHB)6-TK-luc reportéru hned ve dvou typech buněk; v lidských čočkově specifických epitelových buňkách (HLE-B3) a v lidské embryonální ledvinové linii (HEK293). Transfekce byla provedena jak se samotnými mutantními konstrukty, tak v kombinaci s konstrukty divokého typu, aby se mohl prokázat dominantně negativní efekt některých variant. Divoký typ FOXE3 aktivoval expresi luciferázy 1,8 krát více v buňkách HLE-B3 a 3,6 krát více v HEK293 ve srovnání s variantou p.Met82Val. Varianta p.*320Serext*72 selhávala v expresi luciferázy podstatně více, přičemž koexprese mutantního a standardního proteinu v případě p.Met82Val opět zvýšila transkripční aktivitu FOXE3, ale v případě přidání divokého typu k p.*320Serext*72 byla transkripční aktivita stále nižší než v případě negativní kontroly (prázdného vektoru), což potvrzuje negativně dominantní efekt této varianty.

Celkově bylo do publikace zahrnuto 16 nových rodin s patogenními variantami v *FOXE3*; 14 vykazovalo autozomálně recesivní typ dědičnosti a pouze ve dvou rodinách (obě českého původu) byla dědičnost autozomálně dominantní. Tento poměr přibližně odpovídá již dříve publikovaným datům v meta-studii z roku 2018 od Plaisancié a kol. (cca 84 % recesivní dědičnost vs. 16 % dominantní) (Plaisancie et al. 2018). Veškeré *in vitro* a *ab initio* analýzy prokázaly, že varianty, které vedou k tvorbě prodlouženého C terminálního konce FOXE3,

závažně ovlivňují funkci proteinu, výrazně snižují jeho stabilitu a mají autozomálně dominantní efekt na jeho aktivitu jako transkripčního faktoru. Během funkčních studií se také prokázal negativní efekt missense varianty p.Met82Val, která má sníženou schopnost vázat DNA a transkripční aktivitu.

Meta-analýzy pacientů (včetně naší studie) s variantami v genu *FOXE3* ukazují, že recesivní typ dědičnosti je častější než dominantní (84 % vs. 16 %) se závažnějším fenotypem (Plaisancie et al. 2018). Zatím co u autozomálně recesivního typu se onemocnění manifestuje afakii, sklerokorneou a mikroftalmií, u autozomálně dominantního typu se vyskytuje především sklerokornea, mírná mikrokornea a izolované katarakty (většinou izolovaná ASD s mírnějšími projevy) (Plaisancie et al. 2018). Autozomálně recesivní typ zahrnuje nejčastěji missense varianty v oblasti FHD, posunové (frameshift), nebo nesmyslné (nonsense) varianty, které vedou k tvorbě zkráceného proteinu. Heterozygotní přenašeči těchto variant jsou bez známek patologického fenotypu.

5.5. Molekulárně genetická analýza a popis fenotypu X-vázané megalokornei

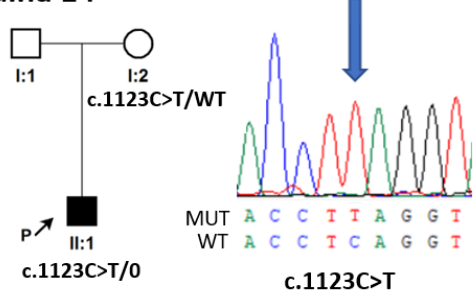
Příloha 5: Novel disease-causing variants and phenotypic features of X-linked megalocornea

Do studie bylo celkově zařazeno 10 probandů, přičemž 4 z nich byli českého původu. V původní publikaci se jedná o rodiny 2, 3, 4 a 5 (Příloha 5). Na základě Sangerova sekvenování kódujících úseků genu *CHRDLI* (referenční sekvence NM_001143981.2) se nám ve všech případech povedlo nalézt pravděpodobně kauzální variantu a všechny byly popsány zcela poprvé; c.1123C>T, c.976A>T, c.94+1G>A a c.207G>C (Obrázek 19). Varianty byly následně podrobeny klasifikaci dle ACMG, a až na variantu c.207G>C, byly všechny hodnoceny jako patogenní a ze svého principu (nesmyslné, nebo ovlivňující sestřih) vedou ke ztrátě funkce (loss-of-function) genu *CHRDLI*. Dle kritérií ACMG byly následující varianty hodnoceny jako patogenní: c.1123C>T (PVS1, PM2, PP4), c.976A>T (PVS1, PM2, PP4) a c.94+1G>A (PVS1, PP1, PM2, PP4). Varianta c.207G>C p.(Glu69Asp) byla dle ACMG klasifikace hodnocena jako varianta nejasného významu (PM2, PP3, PP4). Tato varianta se nachází přímo na hranici exonu a intronu. Ke genetickému vyšetření byl dostupný pouze proband a nemohli jsme proto sledovat její segregaci s fenotypem v rodině. Některé *in silico* predikční programy variantu označovaly jako potenciálně ovlivňující sestřih, což také vyplývá z její polohy na rozhraní exon/intron. Pro

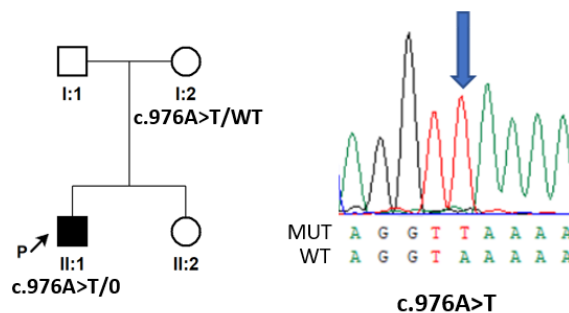
definitivní ustanovení patogenity této varianty by bylo potřeba provést funkční ověření sestřihu pre-mRNA na mRNA.

Všichni probandi s hemizygotními patogenními variantami v *CHRD1* vykazovali charakteristický fenotyp MGC1 se zvýšeným horizontálním průměrem rohovky (rozsah 13,5–16,0 mm), sníženou centrální tloušťkou rohovky (rozsah 354–456 μ m) a abnormálně hlubokou přední komorou (rozsah 4,66–6,31 mm) (Obrázek 20A). Atrofie duhovky byla dokumentována u 4 z 5 pacientů. Další doprovodné fenotypové projevy jako hypoplazie duhovky, presenilní katarakta, nebo gerontoxon (šedobílý prstenec lipidových depozit rohovky při limbu oka) vznikaly s věkem. Za zmínku stojí především klinický nález probanda IV:1 z rodiny 17 (Obrázek 19), který si ve věku 39 let všimnul defektů zorného pole z důvodu bilaterálního glaukomu, který ve spojitosti s MGC1 nebývá běžně popisován.

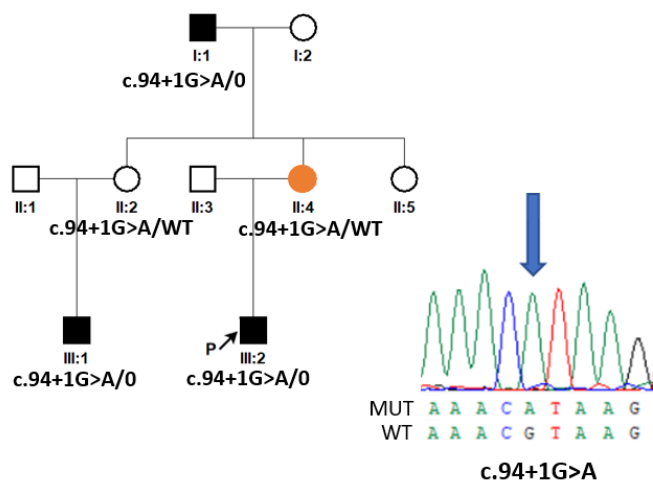
Rodina 14



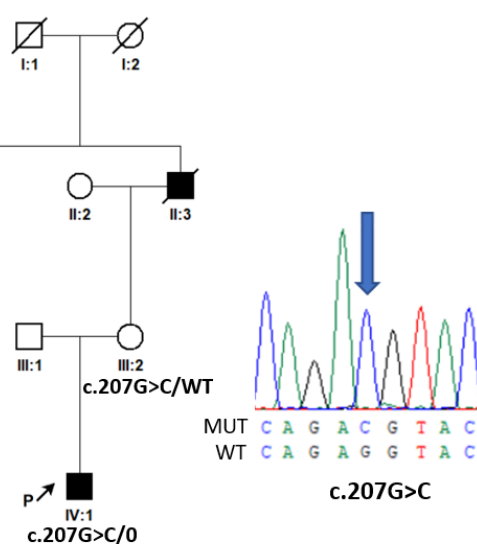
Rodina 15



Rodina 16



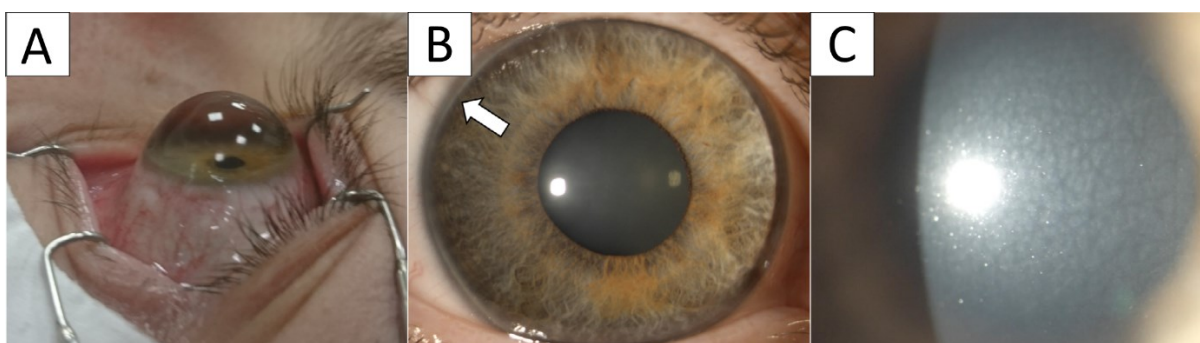
Rodina 17



- megalokornea
- keratokonus

Obrázek 19: Výsledky genetického a genealogického testování pacientů s variantami v genu *CHRD1*. Všechny výše zmíněné patogenní varianty byly detekovány zcela poprvé. WT (wild type) divoká alela; MUT (mutant) mutantní alela, 0 chybějící druhá alela hemizygota. Referenční sekvence genu *CHRD1*: NM_001143981.2.

V rámci studie se povedlo také oftalmologicky vyšetřit 3 přenašečky patogenních variant. U přenašečky II:4 z rodiny 16 byl ve věku 26 let zaznamenán keratokonus na pravém oku, tedy stav, při němž se rohovka stává tenčí, což způsobuje její deformaci do kuželovitého tvaru. Její sestra II:2, měla také ztenčené rohovky, bez dalších známek patologie (466 μm pravé oko a 465 μm levé oko). Přenašečka I:2 z rodiny 15, byla bez známek patologie a obě její rohovky měly fyziologickou tloušťku. Z těchto vyšetření vyplývá, že přestože heterozygotní přenašečky nesoucí patogenní varianty v genu *CHRDL1* netrpí MGC1, mohou mít v některých případech lehce ztenčené rohovky a v některých případech se může objevit také keratokonus.



Obrázek 20: Klinický nálezn u probanda IV:1 z rodiny 17 ve věku 40 let. (A) Fotografie dokumentující zvětšený průměr a hloubku rohovky a abnormálně hlubokou přední komoru (OL); (B) Fotografie pomocí štěrbinové lampy zobrazující hypoplazii duhovky a gerontoxon (šipka; OP); (C) Mozaiková stromální degeneraci rohovky (OP). OL oko levé, OP oko pravé.

Na základě publikace z roku 2012 od Webb a kol., ve které bylo uvedeno, že pacienti s MGC1 mají vynikající kognitivní schopnosti navzdory nápadné fokální ztrátě myelinizace bílé hmoty mozkové, jsme se u dvou probandů rozhodli přistoupit také k vyšetření MRI mozku, které prokázalo strukturální abnormality a také fokální poklesy myelinizace u obou vyšetřovaných probandů (rodina 2 a 4, Příloha 5) (Webb et al. 2012).

Zcela poprvé bylo fenotypové spektrum jedinců s MGC1 rozšířeno také o pravděpodobně sekundární glaukom s pozdní manifestací (třetí, nebo čtvrtá dekáda života) a unilaterální keratokonus v případě jedné přenašečky.

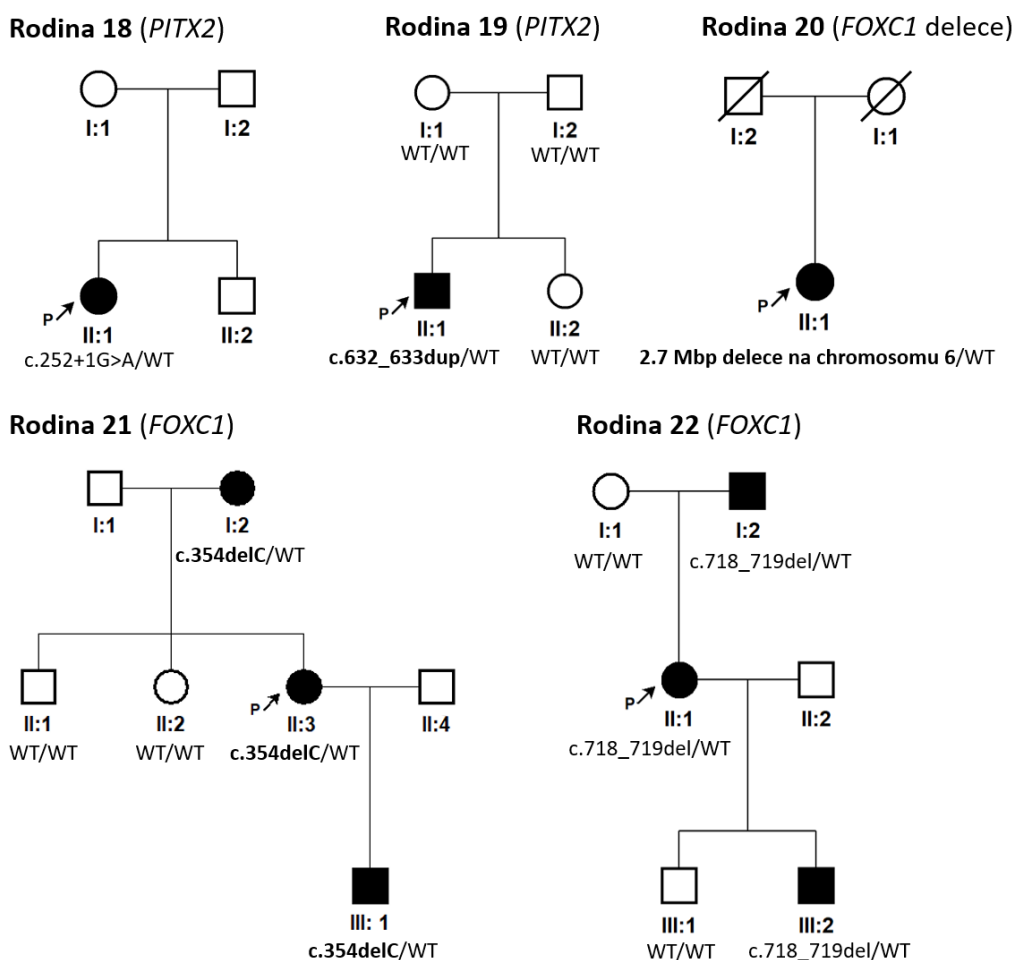
5.6. Genetická a fenotypová charakterizace kohorty pacientů s výskytem Axenfeldova-Riegerova syndromu

Příloha 6: Axenfeld-Rieger syndrome: more than meets the eye

Do doposud nejrozsáhlejší studie pacientů s ARS bylo začleněno 128 jedinců s kauzálními variantami v genech *PITX2* (referenční sekvence NM_153427.2) a *FOXC1* (referenční sekvence NM_001453.2), z toho 81 nových jedinců, včetně 8 pacientů z 5 rodin

českého původu (v originálním článku se jedná o jedince 7, 14, 32, 42, 43, 47, 48, 49, Příloha 6). Takto velký soubor pacientů nám pomohl upřesnit fenotypové projevy jednotlivých typů ARS.

Ve skupině probandů českého původu se vyskytovaly dvě rodiny s nálezem mutace v genu *PITX2* (rodina 18 a 19, Obrázek 21), dvě s nálezem varianty v genu *FOXC1* (rodina 21 a 22, Obrázek 21) a jedna probandka nesla rozsáhlou (2,7 Mbp) delecí na konci krátkého raménka chromozomu 6, na kterém se nachází hned několik genů, mezi nimi také *FOXC1* (rodina 20, Obrázek 21).



Obrázek 21: Rodokmeny a výsledky genetického testování pacientů s ARS. Poprvé byly detekovány dvě bodové patogenní varianty a jedna rozsáhlá delecce (probandka II:1 z rodiny 20) na chromozomu 6 NC_000006.11:g.366602_3090996del, která zahrnuje celý gen *FOXC1* (označeno tučně). **WT** (wild type) divoká alela. Referenční sekvence genů *PITX2*: NM_153427.2 a *FOXC1*: NM_001453.2.

U pacientky z rodiny 18 (II:1, Obrázek 21) byla na základě přímého sekvenování objevena již dříve popsaná varianta v *PITX2* *c.252+1G>A* vedoucí pravděpodobně k aberantnímu sestřihu a k tvorbě předčasného stop kodonu (Obrázek 21, rodina 18) (Zhang et al. 2021a). Tato varianta je klasifikována jako patogenní na základě ACMG kritérii (PVS1, PM6, PM2). Kromě typické ASD (zadní embryotoxon a hypoplazie duhovky, Obrázek 22A),

se sekundárním glaukomem, měla také zubní, pupeční a gastrointestinální systémové anomálie. MRI vyšetření probandky také odhalilo malý počet tečkovaných hyperintenzivních lézí ve frontální a parietální subkortikální bílé hmotě mozkové.

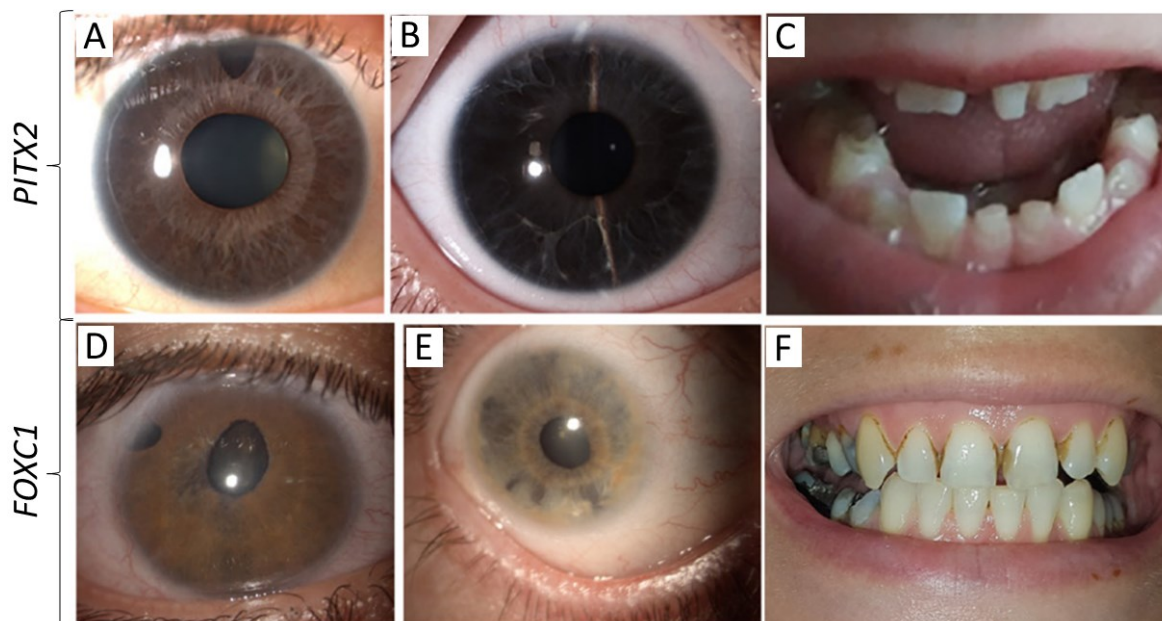
U probanda z rodiny 19 (II:2, Obrázek 21) byla pomocí přímého sekvenování kódujících úseků genu *PITX2* nalezena duplikace dvou nukleotidů vedoucí k tvorbě předčasného stop kodonu: c.632_633dup p.(Pro212Cysfs*28). Tato varianta nebyla nalezena ani u matky, ani u otce probanda a vznikla tak pravděpodobně mechanismem *de novo*, nebo jako následek germinálního mozaicismu. Varianta byla popsána zcela poprvé a dle hodnocení ACMG se jeví jako patogenní (PVS1, PM2, PM6, PP4). Proband trpěl klasickou ASD (hypoplazie duhovky, zadní embryotoxon, Obrázek 22B), a ve věku 10 let u něj nebyl zaznamenán glaukom. Mezi systémovými nálezy byly zjištěny poruchy gastrointestinálního traktu, pupečnickové, dentální anomálie (chybějící zuby a mikrodoncie, Obrázek 22C).

U probandky z rodiny 20 (II:1, Obrázek 21) jsme přistoupili k exomovému sekvenování, které ale nevedlo k nálezu kauzální varianty. Následné CNV vyšetření pomohlo odhalit rozsáhlou delecí na chromozomu 6, kterou v plném rozsahu upřesnilo až genomové sekvenování (Obrázek 23). Jedná se o delecí dlouhou 2,7 Mbp nacházející se na krátkém raménku chromozomu 6 v jeho distální části (v blízkosti telomery; 6p25.3-25.2) NC_000006.11:g.366602_3090996del. Na tomto místě se nachází 14 genů, včetně *FOXC1* (Obrázek 23). Oftalmologický nález u této pacientky zahrnoval hypoplazii duhovky, zadní embryotoxon a iridokorneální adheze (Obrázek 22E). MRI vyšetření odhalilo četné obtížně definované hyperintenzivní léze hlavně v subkortikálním bílé hmotě mozkové a mírnou kolpocefalii (mírné rozšíření okcipitálních rohů).

Probandka z rodiny 21 (II:3, Obrázek 21) vykazovala ASD typickou pro ARS (korektopie, polykorie a hypoplazie duhovky, Obrázek 22D) přičemž ani u ní, ani u jejího syna (III:1), který má také známky ASD, ale pro nízký věk nebyl dosud detailně vyšetřen, se nevyskytla žádná systémová porucha. Exomové sekvenování odhalilo u probandky doposud nepopsanou delecí jednoho nukleotidu c.354delC p.(Asn118Lysfs*63) v genu *FOXC1*, která se dle hodnocení ACMG jevila jako patogenní a segregovala v rodině spolu s onemocněním (PVS1, PM2, PP1).

Probandka z rodiny 22 (II:1, Obrázek 21) nevykazovala téměř žádné známky ASD, byla bez systémových poruch a okolo 30 roku života začala postupně ztrácet sluch. Dentice byla bez početních změn ale ve velmi špatném stavu (Obrázek 22F). Situace byla obdobná u otce (I:2) i syna probandky (III:2, ve věku 13 let zatím bez ztráty sluchu). MRI vyšetření u probandky odhalilo malý počet tečkovaných hyperintenzivních lézí ve frontální a parietální

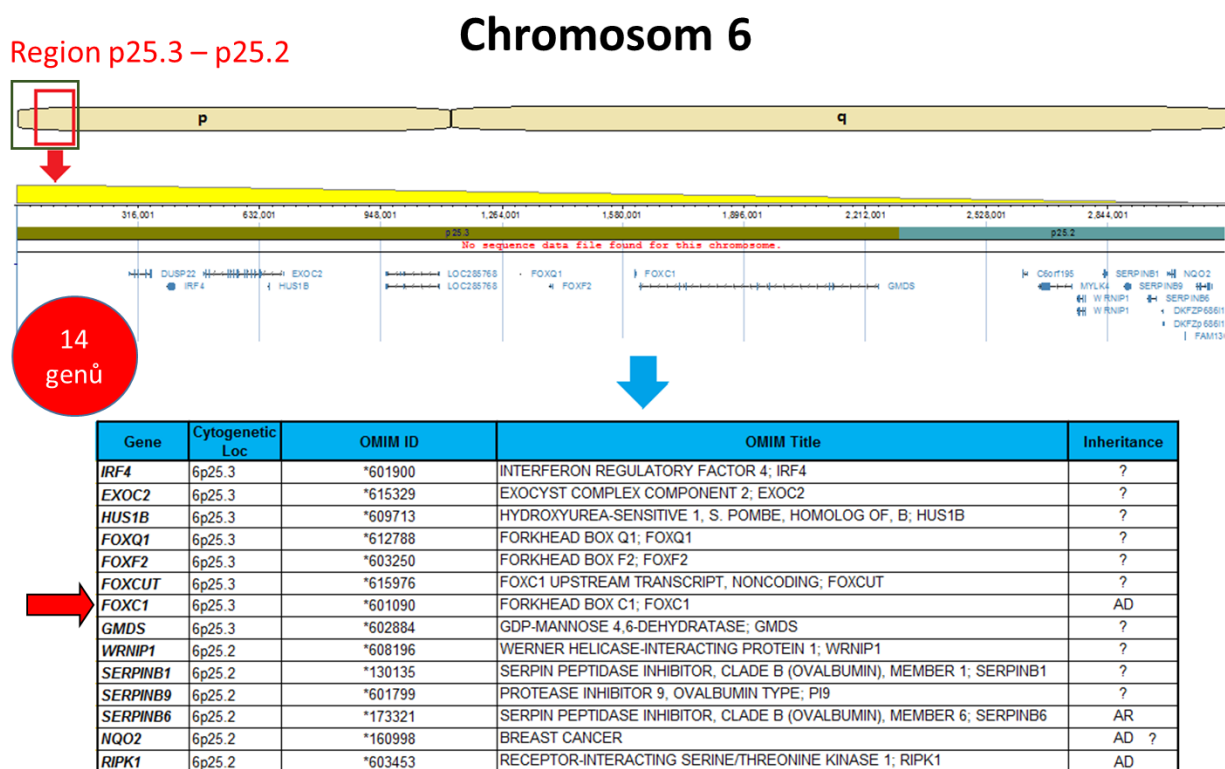
subkortikální bílé hmotě mozkové a také zvětšení laterálních komor. Na základě přímého sekvenování kódujících úseků genu *FOXC1* byla nalezena heterozygotní varianta c.718_719del p.(Leu240Valfs*65). Tato varianta byla v literatuře už v minulosti popsána jako patogenní a v rodině segregovala spolu s onemocněním (Obrázek 21) (Zhang et al. 2021b, Cella et al. 2006). Varianta byla hodnocena jako patogenní na základě ACMG kritérií (PVS1, PP5 PM2, PP1).



Obrázek 22: Vybrané klinické nálezy pacientů s ARS související s variantami v *PITX2* (A–C) a ve *FOXC1* (D–F). (A) Probandka II:1 z rodiny 18 vykazující zadní embryotoxon a hypoplazii duhovky. (B) Proband II:1 z rodiny 19 s hypoplazií duhovky a zadním embryotoxonem. (C) Zubní snímky probanda II:1 z rodiny 19 zobrazující chybějící zuby a mikrodoncii. (D) Probandka II:3 z rodiny 21 vykazující korektopii, polykorii a hypoplazii duhovky. (E) Probandka II:1 z rodiny 20 vykazující hypoplazii duhovky, zadní embryotoxon a iridokorneální adheze. (F) Zubní snímek probandky II:1 z rodiny 22 zobrazuje normální velikost a tvar, ale velmi špatný stav dentice s četnými kazy.

Souhrnné výsledky velkého počtu vyšetřených jedinců naznačují, že k rozvoji sekundárního glaukomu nedošlo pouze u přibližně 50 % jedinců, jak bylo doposud v literatuře uváděno, ale až u 66 – 72 % (Alward 2000). U pacientů s variantami v *FOXC1* docházelo k časnějšímu vzniku glaukomu (již v dětském věku) a oftalmologické i systémové projevy pacientů byly výrazně variabilnější v porovnání se skupinou s mutacemi v *PITX2*. *PITX2* podmíněné ARS zahrnovalo typické spektrum ASD, dále zubní anomálie (mikrodoncii, hypodoncii nebo oligodoncii) a pupeční anomálie. Na druhé straně, fenotypické spektrum ARS podmíněné mutacemi ve *FOXC1* zahrnovalo výrazně více očních (rohovkové opacity, aniridie) a systémových projevů (vrozené srdeční vady, poruchy sluchu, anomálie skeletu, hypermobilita, bolesti kloubů, hypoplazie skloviny, vysoká zubní kazivost a poruchy příjmu potravy se strukturálními anomáliemi jícnu). Dodatečné MRI mozku vyšetřovaných jedinců

odhalilo vysoce penetrantní hyperintenzitu bílé hmoty mozkové, kolpocefalii/ventrikulomegalii a časté arachnoidální cysty.



Obrázek 23: Rozsah delece nalezené u probandky z rodiny 20. Rozsáhlá delece NC_000006.11:g.366602_3090996del zahrnuje 14 genů včetně celého genu *FOXC1*.

Jednotné pojmenování ARS pro všechny jedince nesoucí patogenní varianty ve *FOXC1* nebo *PITX2* genu může být pro probandy a jejich rodinné příslušníky velmi matoucí a nedává jim velmi přesné informace o prognóze jejich stavu. Výsledky z této rozsáhlé studie byly použity k vytvoření dvou specifických léčebných a preventivních plánů specifických pro tyto dva typy ARS, v závislosti na genotypu.

5.7. Molekulárně genetická analýza pacientky s dysgenézí předního segmentu oka a výskytem tzv. slimáčích stop na rohovce

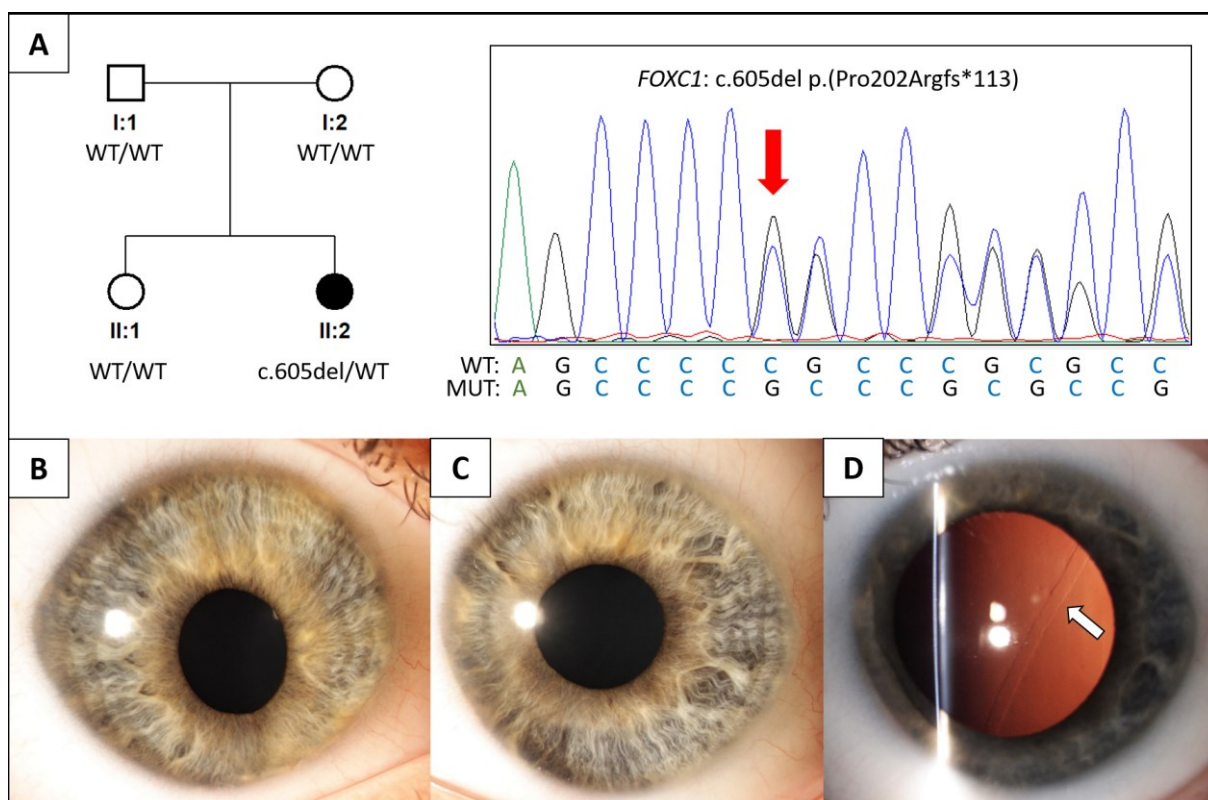
Příloha 7: Snail Track Lesion with Flat Keratometry in Anterior Segment Dysgenesis Caused by a Novel *FOXC1* Variant

„Snail-tracks“ jsou lineární rohovkové léze, překládané jako slimáčcí stopy, jevící se při vyšetření štěrbinovou lampou jako šedo-bílé pruhy a skvrny nacházející se na vnitřním povrchu rohovky. Jedná se o změny v uskupení endotelových buněk a Descemetovy membrány.

Klinické vyšetření pacientky s ASD a jednostranným nálezem slimáčích stop na levém oku (Obrázek 24D) prokázalo také mírnou hypoplazii duhovky a korektopii na obou očích a iridokorneální adheze na pravém oku (Obrázek 24B-D). Kromě typických rysů ASD byly rohovky ploché, se středními hodnotami keratometrie 38,8 D na pravém a 39,5 D na levém oku. Hustota endotelových buněk byla u pacientky oboustranně snížena na hodnoty 1964 buněk/mm² na oku pravém a 1373 buněk/mm² na oku levém (referenční hodnota v rané dospělosti přibližně 2940 (±345) buněk/mm², v pozdějším věku 2394 (±416) buněk/mm²) (Vaiciulienė et al. 2022) (Galgauskas et al. 2012). U pacientky byl zaznamenán také mírný kraniofaciální dysmorfismus (hypertelorismus a široký plochý hřbet nosu) bez nálezů dalších systémových poruch.

V exomových datech probandky nebyly nalezeny žádné vzácné varianty v genech spojovaných s endotelovými dystrofiemi rohovky; *COL8A2* (MIM *120252), *ZEB1* (MIM *189909), *SLC4A11* (MIM *610206), *TCF4* (MIM *602272).

Další analýza exomových dat odhalila doposud nepopsanou variantu v genu *FOXC1*: NM_001453.3: c.605delC p.(Pro202Argfs*113) v heterozygotním stavu (Obrázek 24A).



Obrázek 24: Molekulárně genetická analýza a klinické nálezy probandky s patogenní variantou v genu *FOXC1*. Rodokmen rodiny a sekvenční chromatogram se zvýrazněnou variantou (A). Fotografie rohovky s hypoplazií duhovky a korektopií (B) pravé oko a (C) levé oko. (D) Levá rohovka v retroiluminaci, šipka označuje lézi slimáčích stopy. **WT** (wild type) divoká alela; **MUT** (mutant) mutantní alela. Referenční sekvence genu *FOXC1*: NM_001453.3.

Přítomnost varianty byla následně ověřena pomocí Sangerova sekvenování. Tato varianta nebyla přítomna u rodičů ani u nepostižené sestry. Testování maternity a paternity podpořilo její vznik *de novo* mechanismem, nebo jako následek germinálního mozaicismu. Dle doporučení ACMG byla klasifikována jako patogenní (PVS1, PS2, PP4). Vyšetření bylo doplněno také o CNV analýzu, v rámci které nebyly zjištěny žádné další varianty/delece/duplikace/inzerce asociované s endotelovými dystrofiemi rohovky nebo vznikem ASD.

Tato práce rozšiřuje známé spektrum popsaných mutací v genu *FOXC1* a navíc byla zcela poprvé varianta v tomto genu nalezena u pacientky s výskytem slimáčích stop na rohovce. Vzhledem k tomu, že *FOXC1* je transkripční faktor nezbytný pro diferenciaci mezenchymálních buněk, které jsou zodpovědné za vývoj rohovky, nelze vyloučit, že slimáččí stopy jsou vzácným projevem ASD asociované s *FOXC1*. K potvrzení této souvislosti jsou však nutné další studie.

6. Diskuze

Tato práce byla zaměřena na hledání genetických příčin vývojových anomálií postihujících přední část oka, velice heterogenní skupiny onemocnění vykazující všechny typy Mendelovské dědičnosti. V průběhu vypracovávání dílčích cílů práce jsme se pokusili navrhnout nový diagnostický algoritmus, který by mohl pomoci zvýšit procento ustanovení molekulární diagnózy pacientů s izolovanými i systémovými ASD a kataraktami a zároveň také zkrátit čas k jejímu určení.

Celkem bylo vyšetřeno a analyzováno 94 pacientů s kongenitálními kataraktami a ASD ze 60 rodin, a dále více než 80 rodinných příslušníků prvního stupně. U přibližně poloviny probandů byla katarakta a ASD asociovaná s postižením dalších orgánů anebo s přidruženou oční vadou. Do výše zmíněných publikací bylo zahrnuto 51 pacientů z 23 rodin a 33 rodinných příslušníků prvního stupně. Z 24 probandů z 23 publikovaných rodin (v jednom případě šlo o souběh dvou klinických jednotek) se nám na základě přímého sekvenování podařilo odhalit 13 případů, 9 případů pomohlo odhalit exomové sekvenování, v jednom případě genomové sekvenování a v posledním případě kombinace CNV vyšetření a genomového sekvenování (Obrázek 25).

V případě, že fenotyp zcela jistě nekoreluje s výskytem varianty v jednom konkrétním genu, se jeví jako nejprínosnější dle poměru cena/výkon v tomto procesu exomové sekvenování.



Obrázek 25: Rozložení typu analýz vedoucích k odhalení příčinné varianty.

Analýza sestřihu pre-mRNA pomocí Exon-trappingu, která se běžně využívá pro odhalení kódujících částí (exonů) v sekvencích neznámé DNA, nám pomohla potvrdit patogenní vliv dvou nekódujících variant genu *PAX6* (Duyk et al. 1990, Booth et al. 2018). Tímto způsobem se dá rovněž zkontrolovat potenciál variant v genech (respektive v proteinech), které nejsou běžně v dobře dostupných vzorcích dostupné (krev, sliny). Bez nutnosti generace iPSCs buněk lze zkontrolovat kterýkoliv úsek DNA, přestože RNA daného genu se v buňce v daný moment nemusí vyskytovat. Touto metodou se dají také zkoumat intragenové motivy potenciálně ovlivňující alternativní sestřih, přestože jediné její omezení spočívá v délce/rozsahu zkoumané oblasti, jelikož se jedná o vektor plasmidového typu (Booth et al. 2018). Naše publikace, zaměřující se na pacienty s variantami v genu *PAX6*, kromě zavedení metodiky sestřihového vektoru také vyhodnocuje spektrum mutací a široký rozsah genotypových nálezů u českých pacientů s mutacemi v genu *PAX6* včetně přední polární katarakty a myopie bez defektů duhovky.

Díky molekulárně genetické analýze se nám podařilo u tří rodin s kongenitální kataraktou odhalit vzácné systémové onemocnění HHCS a poukázat na nízkou povědomost o tomto systémovém onemocnění mezi lékaři vedoucí potenciálně ke zbytečné až škodlivé léčbě ve chvíli, kdy je toto onemocnění zaměněno s HH (Feder et al. 1996, Bacon et al. 1999). I u tohoto onemocnění se totiž během krevního vyšetření objevují vysoké hladiny sérového feritinu. U pacientů trpících HH dochází časem k akumulacím železa v hepatocytech a je potřeba zahájit léčbu, která většinou spočívá ve venepunkcích, nebo v podávání chelatačních činidel, aby u nich nedocházelo k přetížení organismu železem (Bacon et al. 1999, Mobarra et al. 2016). V případě, kdy je HHCS špatně diagnostikován a zaměněn za HH, může u pacientů v důsledku neadekvátní léčby dojít k rozvoji silných anémií (Mobarra et al. 2016). Na základě našeho doporučení, došlo k zařazení 5' nepřekládané oblasti genu *FTL* do diagnostického panelu laboratoře Agel.

Patogenní varianty v regulačních RNA molekulách se ve spojitosti s dědičnými onemocněními vyskytují velmi vzácně. Dle dostupné literatury byly identifikovány pouze čtyři varianty v různých miRNA jako příčina dědičného onemocnění u člověka (Kawahara 2014, Grigelioniene et al. 2019). V rámci této práce jsme jako druzí na světě potvrdili, že varianta n.37C>T v *MIR204* způsobuje chorioretinální dystrofii variabilně asociovanou s kolobomem duhovky, časně manifestující kataraktou a vrozeným glaukomem.

V rodině, kde byla odhalena patogenní varianta n.37C>T v *MIR204* se také vyskytoval okulokutánní albinismus na podkladě variant v genu *OCA2* u partnerky probanda a nejstarší

dcery (s duální diagnózou). Další dva synové vykazovaly pouze známky okulárního albinismu. Jednou z nalezených variant byla také c.1327G>A, přičemž již dříve bylo diskutováno, zda se jedná o hypomorfní alelu, která vede pouze k částečné ztrátě funkce proteinu, což by vysvětlovalo přítomnost 4 homozygotních jedinců v databázi gnomAD (Karczewski et al. 2020). Naše studie tuto hypotézu podporuje.

Publikace shrnující výsledky molekulárně genetické analýzy pacientů s kauzálními variantami v genu *FOXE3* poukazuje na to, že recesivní typ dědičnosti je častější než dominantní (84 % vs. 16 %) a mívá závažnější fenotyp. Zatímco u autozomálně recesivního typu se onemocnění manifestuje afakií, sklerokorneou a mikroftalmií, u autozomálně dominantního typu se vyskytuje především mikroftalmie a anoftalmie. Patogenita několika variant v genu *FOXE3* byla v rámci studie podpořena funkčními studiemi (RT-PCR, Western blot analýzy, imunobarvení, EMSA esej a luciferázové kotransfekční testy).

Genetické testování kongenitálních katarakt a pacientů s ASD má velký význam, neboť příčinné mutace často vznikají *de novo* a bývají variabilně asociovány se systémovými postiženími (srdeční vady, urogenitální postižení, poruchy intelektu, rozštěpy patra, syndaktylie).

Závěrem, tato disertační práce umožnila v kontextu personalizované medicíny zavedení multidisciplinárního přístupu k pacientům s ASD a kongenitálními kataraktami jak na úrovni klinické, tak i výzkumné. Byl vytvořen efektivní algoritmus postupu hledání molekulárně genetických příčin u této kohorty pacientů a byla ověřena výtěžnost exomového a genomového sekvenování. V budoucnu by tyto nálezy mohli být využity k tvorbě lepších diagnostických algoritmů a významně tak snížit čas k určení diagnózy.

Správné určení molekulárně genetické příčiny onemocnění umožňuje optimalizovat péči o pacienty, např. přizpůsobit frekvenci kontrol, včasný záchyt a intervenci u systémových příznaků a plánování rodičovství nejčastěji pomocí preimplantační nebo prenatální diagnostiky. Konkrétním příkladem přesné genetické diagnostiky je případ dvou rodin českého původu s HHCS, u kterých byla chybně diagnostikována HH a byly nasazeny nesprávné léčebné postupy.

7. Závěr

Hlavním cílem disertační práce byl výzkum molekulárně genetických příčin ASD a kongenitálních katarakt na souboru pacientů z České republiky a optimalizace diagnostického procesu u těchto klinických jednotek v rámci specifik národního zdravotního systému. Naplánované cíle byly v tomto ohledu splněny v plném rozsahu.

Výsledky práce shrnují informace o výskytu, fenotypu a příčinných patogenních variant a mechanismů vzniku různých typů ASD a kongenitálních katarakt. V průběhu vypracování dílčích cílů, byla potvrzena nezastupitelná úloha exomového a také genomového sekvenování v laboratorní diagnostice těchto chorob. Význam exomového sekvenování jako součást diagnostického procesu byl potvrzen, jelikož pomohlo identifikovat kauzální varianty u 38 % pacientů z naší kohorty. Genomové sekvenování se osvědčilo jako spolehlivá metoda ke stanovení přesného rozsahu a uspořádání složité přestavby v jednom případě (4 % kauzalit). Vzhledem k tomu, že funkční anotace genomových dat je stále na prahu našeho poznání, výtěžek při stanovení příčinných variant neměl větší přidanou hodnotu. Nicméně získaná data budou reanotována i v budoucnosti a lze očekávat, že při posunu obecných znalostí, se postupem času záchyt patogenních variant a složitých přestaveb zvýší.

Tato práce mimo jiné také upozorňuje na fakt, že jak kongenitální katarakty, pak také ADS mohou být způsobené i nekódujícími variantami a na základě i těchto výsledků bylo doporučeno akreditované laboratoři Agel v České republice zařadit do diagnostických panelů vybranou nekódující oblast genu *FTL* (do budoucna také regulační oblast *MIR204*).

Molekulárně genetická diagnostika pacientů s ASD a kataraktami hraje nezastupitelnou roli při identifikaci genů, které se zapojují během různých fází vývoje oka, a tím také zlepšuje naše chápání jednotlivých biologických mechanismů.

Výsledky, kterých jsme dosáhli, pomohly zlepšit poradenství pacientům a jejich příbuzným z hlediska prognózy ztráty zrakových funkcí, rizika vzniku sekundárního glaukomu (a tedy v rámci personalizované medicíny i optimalizovat frekvenci pravidelných kontrol u oftalmologa) a také jsme pomohli upřesnit údaje o rizicích dalšího přenosu onemocnění v jednotlivých rodinách. Pacient se znalostí vlastní molekulární diagnózy má výraznou výhodu: konec nekonečného diagnostického procesu, stanovení prognózy a upřesnění léčby, přístup ke správnému genetickému poradenství a potvrzení způsobilosti (nebo nezpůsobilosti) pro klinické studie a v budoucnu také případné genové terapie. Výsledky práce umožnily v kontextu personalizované medicíny zavedení multidisciplinárního přístupu k pacientům s kongenitálními kataraktami a ASD jak na úrovni klinické, tak i výzkumné.

Mimo publikační výsledky měl tak projekt velmi pozitivní dopad na péči o pacienty s ASD kongenitálními kataraktami a vedl ke značné osvětě jak mezi odborníky, tak i laiky, kteří se i na základě výsledků této práce obracejí na pracoviště Klinické oční genetiky při Oční klinice 1. LF UK a VFN v Praze. Rozšířila se i síť spolupracujících oftalmologů a pediatrů v rámci ČR.

Správně provedená a interpretovaná molekulárně genetická analýza v rodinách postižených jedinců, pomohla identifikovat jedince rizikové pro rozvoj onemocnění, pomohla v odhadu jejich prognózy a začlenila se tak do standardní klinické praxe. Závěrem je potřeba zdůraznit, že centralizace péče o pacienty s ASD a kongenitálními kataraktami a jejich molekulárně genetická analýza jsou zásadními faktory vedoucími ke zkrácení diagnostického procesu u těchto pacientů.

8. Seznam publikací, které nebyly podkladem pro vznik disertační práce

Hlavatá L., Dudakova L., **Moravikova J.**, Zobanova A., Kousal B., Liskova P. **Molekulárně genetická příčina achromatopsie u dvou pacientů českého původu.** *Cesk Slov Oftalmol.* (2019); 366–370. doi: 10.31348/2019/5/5.

Vergaro A, Rezková L, Fichtl M, **Jedličková J.** Ďud'áková Ľ, Růžičková E, Lišková P. **Primary open-angle glaucoma due to mutations in the *MYOC* gene.** *Cesk Slov Oftalmol.* (2022) Summer;78(5):242-248. English. doi: 10.31348/2022/25.

Liskova P, Hafford-Tear NJ, Skalicka P, Malinka F, **Jedlickova J.** Ďud'áková Ľ, Pontikos N, Davidson AE, Tuft S. **Posterior corneal vesicles are not associated with the genetic variants that cause posterior polymorphous corneal dystrophy.** *Acta Ophthalmol.* (2022) Nov;100(7):e1426-e1430. doi: 10.1111/aos.15114. **IF = 3,4, Q index = Q1**

Liu S, Sadan AN, Muthusamy K, Zarouchlioti C, **Jedlickova J.** Pontikos N, Thaug C, Hardcastle AJ, Netukova M, Skalicka P, Dudakova L, Bunce C, Tuft SJ, Davidson AE, Liskova P. **Phenotype and genotype of concurrent keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy.** *Acta Ophthalmol.* (2023) Mar 7. doi: 10.1111/aos.15654. **IF = 3,4, Q index = Q1**

9. Webové zdroje

Combined Annotation Dependent Depletion (CADD), <https://cadd.gs.washington.edu/>

ClinVar, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>

Ensembl Genome Browser, <http://www.ensembl.org/index.html>

FATHMM, <http://fathmm.biocompute.org.uk/>

Genome Aggregation Database (gnomAD) Browser, <http://gnomad.broadinstitute.org/>

HaploPainter, <http://haploPainter.sourceforge.net/>

The Human Gene Mutation Database (HGMD), <https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

Human Genome Variation Society (HGVS), <https://www.hgvs.org/>

Human Splicing Finder (HSF), <https://www.genomnis.com/access-hsf>

Iterative Threading ASSEmblY Refinement (I-TASSER), <https://zhanggroup.org/I-TASSER/>

Interactive Genomics Viewer (IGV), <http://www.broadinstitute.org/software/igv/>

Leiden Open Variation Database (LOVD), <https://www.lovd.nl/>

MaxEntScan, http://hollywood.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html

MiRDB, <http://www.mirdb.org/>

MutationTaster, <http://www.mutationtaster.org/>

MutPred2, <http://mutpred.mutdb.org/>

NCBI Genome, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

NetGene, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>

NNSplice, http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html

OligoAnalyzer Tool, <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.omim.org/>

PolyPhen2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

Primer3, <https://primer3.ut.ee/>

PROVEAN and SIFT, <http://provean.jcvi.org/index.php>

PubMed, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

Revel, <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTrackUi?db=hg19&g=revel>

SNP&GO, <http://snps.biofold.org/snps-and-go/snps-and-go.html>

UCSC Genome Browser, <https://genome.ucsc.edu/>

Varsome, <https://varsome.com/>

10. Seznam použité literatury

- Agarwal, P., K. Jain, S. Sandesh & S. Chopra (2020) Axenfeld-Rieger Syndrome: Rare Case Presentation and Overview. *J Maxillofac Oral Surg*, 19, 364-369.
- Alkatan, H. M., H. Al Dhaheri & M. Al Harby (2019) Terminology of Peters' anomaly variants: Summary of histopathological findings in 6 corneas and detailed clinicopathological correlation in 2 cases. *Saudi J Ophthalmol*, 33, 277-282.
- Alward, W. L. (2000) Axenfeld-Rieger syndrome in the age of molecular genetics. *Am J Ophthalmol*, 130, 107-15.
- Aponte, E. P., N. Diehl & B. G. Mohny (2010) Incidence and clinical characteristics of childhood glaucoma: a population-based study. *Arch Ophthalmol*, 128, 478-82.
- Bacon, B. R., L. W. Powell, P. C. Adams, T. F. Kresina & J. H. Hoofnagle (1999) Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. *Gastroenterology*, 116, 193-207.
- Badawi, A. H., A. A. Al-Muhaylib, A. M. Al Owaifeer, R. S. Al-Essa & S. A. Al-Shahwan (2019) Primary congenital glaucoma: An updated review. *Saudi J Ophthalmol*, 33, 382-388.
- Balas, A., M. J. Aviles, F. Garcia-Sanchez & J. L. Vicario (1999) Description of a new mutation in the L-ferrin iron-responsive element associated with hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome in a Spanish family. *Blood*, 93, 4020-1.
- Bax, B. E. (2021) Biomarkers in Rare Diseases. *Int J Mol Sci*, 22.
- Beaumont, C., P. Leneuve, I. Devaux, J. Y. Scoazec, M. Berthier, M. N. Loiseau, B. Grandchamp & D. Bonneau (1995) Mutation in the iron responsive element of the L ferritin mRNA in a family with dominant hyperferritinaemia and cataract. *Nat Genet*, 11, 444-6.
- Bennett, R. L., K. A. Steinhaus, S. B. Uhrich, C. K. O'Sullivan, R. G. Resta, D. Lochner-Doyle, D. S. Markel, V. Vincent & J. Hamanishi (1995) Recommendations for standardized human pedigree nomenclature. *J Genet Couns*, 4, 267-79.
- Blixt, A., M. Mahlapuu, M. Aitola, M. Peltto-Huikko, S. Enerback & P. Carlsson (2000) A forkhead gene, FoxE3, is essential for lens epithelial proliferation and closure of the lens vesicle. *Genes Dev*, 14, 245-54.
- Booth, K. T., H. Azaiez, K. Kahrizi, D. Wang, Y. Zhang, K. Frees, C. Nishimura, H. Najmabadi & R. J. Smith (2018) Exonic mutations and exon skipping: Lessons learned from DFNA5. *Hum Mutat*, 39, 433-440.
- Bremond-Gignac, D., P. Bitoun, L. M. Reis, H. Copin, J. C. Murray & E. V. Semina (2010) Identification of dominant FOXE3 and PAX6 mutations in patients with congenital cataract and aniridia. *Mol Vis*, 16, 1705-11.
- Brownell, I., M. Dirksen & M. Jamrich (2000) Forkhead Foxe3 maps to the dysgenetic lens locus and is critical in lens development and differentiation. *Genesis*, 27, 81-93.
- Camaschella, C. & E. Poggiali (2009) Towards explaining "unexplained hyperferritinemia". *Haematologica*, 94, 307-9.
- Campagnoli, M. F., R. Pimazzoni, S. Bosio, G. Zecchina, M. DeGobbi, P. Bosso, B. Oldani & U. Ramenghi (2002) Onset of cataract in early infancy associated with a 32G-->C transition in the iron responsive element of L-ferritin. *Eur J Pediatr*, 161, 499-502.
- Cella, W., J. P. de Vasconcellos, M. B. de Melo, B. Kneipp, F. F. Costa, C. A. Longui & V. P. Costa (2006) Structural assessment of PITX2, FOXC1, CYP1B1, and GJA1 genes in patients with Axenfeld-Rieger syndrome with developmental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 1803-9.
- Clark, K. L., E. D. Halay, E. Lai & S. K. Burley (1993) Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature*, 364, 412-20.

- Cohen, E. J. (2000) Cornea and external disease in the new millennium. *Arch Ophthalmol*, 118, 979-81.
- Conte, I., S. Carrella, R. Avellino, M. Karali, R. Marco-Ferrerres, P. Bovolenta & S. Banfi (2010) miR-204 is required for lens and retinal development via Meis2 targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 15491-6.
- Conte, I., K. D. Hadfield, S. Barbato, S. Carrella, M. Pizzo, R. S. Bhat, A. Carissimo, M. Karali, L. F. Porter, J. Urquhart, S. Hateley, J. O'Sullivan, F. D. Manson, S. C. Neuhauss, S. Banfi & G. C. Black (2015) MiR-204 is responsible for inherited retinal dystrophy associated with ocular coloboma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, E3236-45.
- Craig, J. E., J. B. Clark, J. L. McLeod, M. A. Kirkland, G. Grant, J. E. Elder, M. G. Toohey, L. Kowal, H. F. Savoia, C. Chen, S. Roberts, M. G. Wirth & D. A. Mackey (2003) Hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome: prevalence, lens morphology, spectrum of mutations, and clinical presentations. *Arch Ophthalmol*, 121, 1753-61.
- Doucette, L., J. Green, B. Fernandez, G. J. Johnson, P. Parfrey & T. L. Young (2011) A novel, non-stop mutation in FOXE3 causes an autosomal dominant form of variable anterior segment dysgenesis including Peters anomaly. *Eur J Hum Genet*, 19, 293-9.
- Doward, W., R. Perveen, I. C. Lloyd, A. E. Ridgway, L. Wilson & G. C. Black (1999) A mutation in the RIEG1 gene associated with Peters' anomaly. *J Med Genet*, 36, 152-5.
- Duyk, G. M., S. W. Kim, R. M. Myers & D. R. Cox (1990) Exon trapping: a genetic screen to identify candidate transcribed sequences in cloned mammalian genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 8995-9.
- European Association For The Study Of The, L. (2010) EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J Hepatol*, 53, 3-22.
- Feder, J. N., A. Gnirke, W. Thomas, Z. Tsuchihashi, D. A. Ruddy, A. Basava, F. Dormishian, R. Domingo, Jr., M. C. Ellis, A. Fullan, L. M. Hinton, N. L. Jones, B. E. Kimmel, G. S. Kronmal, P. Lauer, V. K. Lee, D. B. Loeb, F. A. Mapa, E. McClelland, N. C. Meyer, G. A. Mintier, N. Moeller, T. Moore, E. Morikang, C. E. Prass, L. Quintana, S. M. Starnes, R. C. Schatzman, K. J. Brunke, D. T. Drayna, N. J. Risch, B. R. Bacon & R. K. Wolff (1996) A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet*, 13, 399-408.
- Franco, D. & M. Campione (2003) The role of Pitx2 during cardiac development. Linking left-right signaling and congenital heart diseases. *Trends Cardiovasc Med*, 13, 157-63.
- Gage, P. J., C. Kuang & A. L. Zacharias (2014) The homeodomain transcription factor PITX2 is required for specifying correct cell fates and establishing angiogenic privilege in the developing cornea. *Dev Dyn*, 243, 1391-400.
- Gage, P. J., W. Rhoades, S. K. Prucka & T. Hjalt (2005) Fate maps of neural crest and mesoderm in the mammalian eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 4200-8.
- Gage, P. J., H. Suh & S. A. Camper (1999) Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs. *Development*, 126, 4643-51.
- Galgauskas, S., D. Krasauskaite, M. Pajaujis, G. Juodkaite & R. S. Asoklis (2012) Central corneal thickness and corneal endothelial characteristics in healthy, cataract, and glaucoma patients. *Clin Ophthalmol*, 6, 1195-9.
- Gehring, W. J. & K. Ikeo (1999) Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet*, 15, 371-7.
- Girelli, D., R. Corrocher, L. Bisceglia, O. Olivieri, L. De Franceschi, L. Zelante & P. Gasparini (1995) Molecular basis for the recently described hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome: a mutation in the iron-responsive element of ferritin L-subunit gene (the "Verona mutation"). *Blood*, 86, 4050-3.

- Glaser, T., L. Jepeal, J. G. Edwards, S. R. Young, J. Favor & R. L. Maas (1994) PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nat Genet*, 7, 463-71.
- Golson, M. L. & K. H. Kaestner (2016) Fox transcription factors: from development to disease. *Development*, 143, 4558-4570.
- Goolam, S., N. Carstens, M. Ross, D. Bentley, M. Lopes, J. Peden, Z. Kingsbury, E. Tsogka, R. Barlow, T. R. Carmichael, M. Ramsay & S. E. Williams (2018) Familial congenital cataract, coloboma, and nystagmus phenotype with variable expression caused by mutation in PAX6 in a South African family. *Mol Vis*, 24, 407-413.
- Graziano, C., A. V. D'Elia, L. Mazzanti, F. Moscano, S. Guidelli Guidi, E. Scarano, D. Turchetti, E. Franzoni, G. Romeo, G. Damante & M. Seri (2007) A de novo nonsense mutation of PAX6 gene in a patient with aniridia, ataxia, and mental retardation. *Am J Med Genet A*, 143A, 1802-5.
- Grigelioniene, G., H. I. Suzuki, F. Taylan, F. Mirzamohammadi, Z. U. Borochowitz, U. M. Ayturk, S. Tzur, E. Horemuzova, A. Lindstrand, M. A. Weis, G. Grigelionis, A. Hammarsjo, E. Marsk, A. Nordgren, M. Nordenskjold, D. R. Eyre, M. L. Warman, G. Nishimura, P. A. Sharp & T. Kobayashi (2019) Gain-of-function mutation of microRNA-140 in human skeletal dysplasia. *Nat Med*, 25, 583-590.
- Gronskov, K., J. H. Olsen, A. Sand, W. Pedersen, N. Carlsen, A. M. Bak Jylling, T. Lyngbye, K. Brondum-Nielsen & T. Rosenberg (2001) Population-based risk estimates of Wilms tumor in sporadic aniridia. A comprehensive mutation screening procedure of PAX6 identifies 80% of mutations in aniridia. *Hum Genet*, 109, 11-8.
- Gronskov, K., T. Rosenberg, A. Sand & K. Brondum-Nielsen (1999) Mutational analysis of PAX6: 16 novel mutations including 5 missense mutations with a mild aniridia phenotype. *Eur J Hum Genet*, 7, 274-86.
- Haargaard, B., J. Wohlfahrt, H. C. Fledelius, T. Rosenberg & M. Melbye (2004) A nationwide Danish study of 1027 cases of congenital/infantile cataracts: etiological and clinical classifications. *Ophthalmology*, 111, 2292-8.
- Haendel, M., N. Vasilevsky, D. Unni, C. Bologna, N. Harris, H. Rehm, A. Hamosh, G. Baynam, T. Groza, J. McMurry, H. Dawkins, A. Rath, C. Thaxon, G. Bocci, M. P. Joachimiak, S. Kohler, P. N. Robinson, C. Mungall & T. I. Oprea (2020) How many rare diseases are there? *Nat Rev Drug Discov*, 19, 77-78.
- Hanson, I. M., J. M. Fletcher, T. Jordan, A. Brown, D. Taylor, R. J. Adams, H. H. Punnett & V. van Heyningen (1994) Mutations at the PAX6 locus are found in heterogeneous anterior segment malformations including Peters' anomaly. *Nat Genet*, 6, 168-73.
- Hanson, I. M., A. Seawright, K. Hardman, S. Hodgson, D. Zaletayev, G. Fekete & V. van Heyningen (1993) PAX6 mutations in aniridia. *Hum Mol Genet*, 2, 915-20.
- Hingorani, M., K. A. Williamson, A. T. Moore & V. van Heyningen (2009) Detailed ophthalmologic evaluation of 43 individuals with PAX6 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50, 2581-90.
- Hjalt, T. A., B. A. Amendt & J. C. Murray (2001) PITX2 regulates procollagen lysyl hydroxylase (PLOD) gene expression: implications for the pathology of Rieger syndrome. *J Cell Biol*, 152, 545-52.
- Hoar, R. M. (1982) Embryology of the eye. *Environ Health Perspect*, 44, 31-4.
- Hutton, S. M. & R. A. Spritz (2008) Comprehensive analysis of oculocutaneous albinism among non-Hispanic caucasians shows that OCA1 is the most prevalent OCA type. *J Invest Dermatol*, 128, 2442-50.
- Chan, W. H., S. Biswas, J. L. Ashworth & I. C. Lloyd (2012) Congenital and infantile cataract: aetiology and management. *Eur J Pediatr*, 171, 625-30.

- Chen, Y. & X. Wang (2020) miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res*, 48, D127-D131.
- Chien, Y. H., H. P. Huang, W. L. Hwu, Y. H. Chien, T. C. Chang & N. C. Lee (2009) Eye anomalies and neurological manifestations in patients with PAX6 mutations. *Mol Vis*, 15, 2139-45.
- Chow, R. L. & R. A. Lang (2001) Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 255-96.
- Idrees, F., D. Vaideanu, S. G. Fraser, J. C. Sowden & P. T. Khaw (2006) A review of anterior segment dysgeneses. *Surv Ophthalmol*, 51, 213-31.
- Iseri, S. U., R. J. Osborne, M. Farrall, A. W. Wyatt, G. Mirza, G. Nurnberg, C. Kluck, H. Herbert, A. Martin, M. S. Hussain, J. R. Collin, M. Lathrop, P. Nurnberg, J. Ragoussis & N. K. Ragge (2009) Seeing clearly: the dominant and recessive nature of FOXE3 in eye developmental anomalies. *Hum Mutat*, 30, 1378-86.
- Johnson, K. G., D. Shewan & C. E. Holt. Visual System Development in Vertebrates. In *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Jordan, T., I. Hanson, D. Zaletayev, S. Hodgson, J. Prosser, A. Seawright, N. Hastie & V. van Heyningen (1992) The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia. *Nat Genet*, 1, 328-32.
- Kaplan, H. J. (2007) Anatomy and function of the eye. *Chem Immunol Allergy*, 92, 4-10.
- Karczewski, K. J., L. C. Francioli, G. Tiao, B. B. Cummings, J. Alfoldi, Q. Wang, R. L. Collins, K. M. Laricchia, A. Ganna, D. P. Birnbaum, L. D. Gauthier, H. Brand, M. Solomonson, N. A. Watts, D. Rhodes, M. Singer-Berk, E. M. England, E. G. Seaby, J. A. Kosmicki, R. K. Walters, K. Tashman, Y. Farjoun, E. Banks, T. Poterba, A. Wang, C. Seed, N. Whiffin, J. X. Chong, K. E. Samocha, E. Pierce-Hoffman, Z. Zappala, A. H. O'Donnell-Luria, E. V. Minikel, B. Weisburd, M. Lek, J. S. Ware, C. Vittal, I. M. Armean, L. Bergelson, K. Cibulskis, K. M. Connolly, M. Covarrubias, S. Donnelly, S. Ferriera, S. Gabriel, J. Gentry, N. Gupta, T. Jeandet, D. Kaplan, C. Llanwarne, R. Munshi, S. Novod, N. Petrillo, D. Roazen, V. Ruano-Rubio, A. Saltzman, M. Schleicher, J. Soto, K. Tibbetts, C. Tolonen, G. Wade, M. E. Talkowski, C. Genome Aggregation Database, B. M. Neale, M. J. Daly & D. G. MacArthur (2020) The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*, 581, 434-443.
- Kawahara, Y. (2014) Human diseases caused by germline and somatic abnormalities in microRNA and microRNA-related genes. *Congenit Anom (Kyoto)*, 54, 12-21.
- Kels, B. D., A. Grzybowski & J. M. Grant-Kels (2015) Human ocular anatomy. *Clin Dermatol*, 33, 140-6.
- Khan, A. O. (2011) Genetics of primary glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol*, 22, 347-55.
- Kidson, S. H., T. Kume, K. Deng, V. Winfrey & B. L. Hogan (1999) The forkhead/winged-helix gene, Mfl, is necessary for the normal development of the cornea and formation of the anterior chamber in the mouse eye. *Dev Biol*, 211, 306-22.
- Landsend, E. C. S., N. Lagali & T. P. Utheim (2021) Congenital aniridia - A comprehensive review of clinical features and therapeutic approaches. *Surv Ophthalmol*, 66, 1031-1050.
- Lasseaux, E., C. Plaisant, V. Michaud, P. Pennamen, A. Trimouille, L. Gaston, S. Monferme, D. Lacombe, C. Rooryck, F. Morice-Picard & B. Arveiler (2018) Molecular characterization of a series of 990 index patients with albinism. *Pigment Cell Melanoma Res*, 31, 466-474.
- Lesnik Oberstein, S. A., M. Kriek, S. J. White, M. E. Kalf, K. Szuhai, J. T. den Dunnen, M. H. Breuning & R. C. Hennekam (2006) Peters Plus syndrome is caused by mutations in B3GALTL, a putative glycosyltransferase. *Am J Hum Genet*, 79, 562-6.

- Lim, H. T., D. H. Kim & H. Kim (2017) PAX6 aniridia syndrome: clinics, genetics, and therapeutics. *Curr Opin Ophthalmol*, 28, 436-447.
- Liu, W. & X. Wang (2019) Prediction of functional microRNA targets by integrative modeling of microRNA binding and target expression data. *Genome Biol*, 20, 18.
- Loftus, S. K., L. Lundh, D. E. Watkins-Chow, L. L. Baxter, E. Pairo-Castineira, P. Nisc Comparative Sequencing, I. J. Jackson, W. S. Oetting, W. J. Pavan & D. R. Adams (2021) A custom capture sequence approach for oculocutaneous albinism identifies structural variant alleles at the OCA2 locus. *Hum Mutat*, 42, 1239-1253.
- Ma, A. S., J. R. Grigg & R. V. Jamieson (2019) Phenotype-genotype correlations and emerging pathways in ocular anterior segment dysgenesis. *Hum Genet*, 138, 899-915.
- Ma, Z., S. R. Hanson, K. J. Lampi, L. L. David, D. L. Smith & J. B. Smith (1998) Age-related changes in human lens crystallins identified by HPLC and mass spectrometry. *Exp Eye Res*, 67, 21-30.
- Mackey, D. A., R. G. Buttery, G. M. Wise & M. J. Denton (1991) Description of X-linked megalocornea with identification of the gene locus. *Arch Ophthalmol*, 109, 829-33.
- Maillette de Buy Wenniger-Prick, L. J. & R. C. Hennekam (2002) The Peters' plus syndrome: a review. *Ann Genet*, 45, 97-103.
- Malandrini, A., F. Mari, S. Palmeri, S. Gambelli, G. Berti, M. Bruttini, A. M. Bardelli, K. Williamson, V. van Heyningen & A. Renieri (2001) PAX6 mutation in a family with aniridia, congenital ptosis, and mental retardation. *Clin Genet*, 60, 151-4.
- Marti, A., E. Lasseaux, K. Ezzedine, C. Leaute-Labreze, F. Boralevi, C. Paya, V. Coste, V. Deroissart, B. Arveiler, A. Taieb & F. Morice-Picard (2018) Lessons of a day hospital: Comprehensive assessment of patients with albinism in a European setting. *Pigment Cell Melanoma Res*, 31, 318-329.
- Mayer, K. L., M. L. Nordlund, G. S. Schwartz & E. J. Holland (2003) Keratopathy in congenital aniridia. *Ocul Surf*, 1, 74-9.
- McCaa, C. S. (1982) The eye and visual nervous system: anatomy, physiology and toxicology. *Environ Health Perspect*, 44, 1-8.
- Meyer-Marcotty, P., N. Weisschuh, P. Dressler, J. Hartmann & A. Stellzig-Eisenhauer (2008) Morphology of the sella turcica in Axenfeld-Rieger syndrome with PITX2 mutation. *J Oral Pathol Med*, 37, 504-10.
- Millonig, G., M. U. Muckenthaler & S. Mueller (2010) Hyperferritinaemia-cataract syndrome: worldwide mutations and phenotype of an increasingly diagnosed genetic disorder. *Hum Genomics*, 4, 250-62.
- Mobarra, N., M. Shanaki, H. Ehteram, H. Nasiri, M. Sahmani, M. Saeidi, M. Goudarzi, H. Pourkarim & M. Azad (2016) A Review on Iron Chelators in Treatment of Iron Overload Syndromes. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*, 10, 239-247.
- Moosajee, M., M. Hingorani & A. T. Moore. 1993. PAX6-Related Aniridia. In *GeneReviews((R))*, eds. M. P. Adam, G. M. Mirzaa, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. W. Gripp & A. Amemiya. Seattle (WA).
- Moshirfar, M., J. Hastings & Y. Ronquillo. 2023. Megalocornea. In *StatPearls*. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Jordan Hastings declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Yasmyn Ronquillo declares no relevant financial relationships with ineligible companies.
- Mumford, A. D., T. Vulliamy, J. Lindsay & A. Watson (1998) Hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome: two novel mutations in the L-ferritin iron-responsive element. *Blood*, 91, 367-8.
- Nakayama, N., C. E. Han, S. Scully, R. Nishinakamura, C. He, L. Zeni, H. Yamane, D. Chang, D. Yu, T. Yokota & D. Wen (2001) A novel chordin-like protein inhibitor for bone

- morphogenetic proteins expressed preferentially in mesenchymal cell lineages. *Dev Biol*, 232, 372-87.
- Nelson, L. B., G. L. Spaeth, T. S. Nowinski, C. E. Margo & L. Jackson (1984) Aniridia. A review. *Surv Ophthalmol*, 28, 621-42.
- Netland, P. A., M. L. Scott, J. W. t. Boyle & J. D. Lauderdale (2011) Ocular and systemic findings in a survey of aniridia subjects. *J AAPOS*, 15, 562-6.
- Nishimura, D. Y., R. E. Swiderski, W. L. Alward, C. C. Searby, S. R. Patil, S. R. Bennet, A. B. Kanis, J. M. Gastier, E. M. Stone & V. C. Sheffield (1998) The forkhead transcription factor gene FKHL7 is responsible for glaucoma phenotypes which map to 6p25. *Nat Genet*, 19, 140-7.
- Ong, A. P. C., J. Zhang, A. L. Vincent & C. N. J. McGhee (2021) Megalocornea, anterior megalophthalmos, keratoglobus and associated anterior segment disorders: A review. *Clin Exp Ophthalmol*, 49, 477-497.
- Ormestad, M., A. Blixt, A. Churchill, T. Martinsson, S. Enerback & P. Carlsson (2002) Foxe3 haploinsufficiency in mice: a model for Peters' anomaly. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, 1350-7.
- Ott, J., J. Wang & S. M. Leal (2015) Genetic linkage analysis in the age of whole-genome sequencing. *Nat Rev Genet*, 16, 275-84.
- Pejaver, V., A. B. Byrne, B. J. Feng, K. A. Pagel, S. D. Mooney, R. Karchin, A. O'Donnell-Luria, S. M. Harrison, S. V. Tavtigian, M. S. Greenblatt, L. G. Biesecker, P. Radivojac, S. E. Brenner & G. ClinGen Sequence Variant Interpretation Working (2022) Calibration of computational tools for missense variant pathogenicity classification and ClinGen recommendations for PP3/BP4 criteria. *Am J Hum Genet*, 109, 2163-2177.
- Perez-Solorzano, S., O. F. Chacon-Camacho, M. C. Astiazaran, G. Ledesma-Gil & J. C. Zenteno (2017) PAX6 allelic heterogeneity in Mexican congenital aniridia patients: expanding the mutational spectrum with seven novel pathogenic variants. *Clin Exp Ophthalmol*, 45, 875-883.
- Peter, N. M., M. Leyland, H. S. Mudhar, J. Lowndes, K. R. Owen & H. Stewart (2013) PAX6 mutation in association with ptosis, cataract, iris hypoplasia, corneal opacification and diabetes: a new variant of familial aniridia? *Clin Exp Ophthalmol*, 41, 835-41.
- Pfirrmann, T., D. Emmerich, P. Ruukonen, D. Quandt, R. Buchen, B. Fischer-Zirnsak, J. Hecht, P. Krawitz, P. Meyer, E. Klopocki, S. Stricker, E. Lausch, B. Seliger, T. Hollemann, T. Reinhard, C. Auw-Haedrich, B. Zabel, K. Hoffmann & P. Villavicencio-Lorini (2015) Molecular mechanism of CHRDL1-mediated X-linked megalocornea in humans and in *Xenopus* model. *Hum Mol Genet*, 24, 3119-32.
- Phatak, P. D., H. L. Bonkovsky & K. V. Kowdley (2008) Hereditary hemochromatosis: time for targeted screening. *Ann Intern Med*, 149, 270-2.
- Plaisancie, J., N. K. Ragge, H. Dollfus, J. Kaplan, D. Lehalle, C. Francannet, G. Morin, H. Colineaux, P. Calvas & N. Chassaing (2018) FOXE3 mutations: genotype-phenotype correlations. *Clin Genet*, 93, 837-845.
- Ploski, J. E., M. K. Shamsheer & A. Radu (2004) Paired-type homeodomain transcription factors are imported into the nucleus by karyopherin 13. *Mol Cell Biol*, 24, 4824-34.
- Prokudin, I., C. Simons, J. R. Grigg, R. Storen, V. Kumar, Z. Y. Phua, J. Smith, M. Flaherty, S. Davila & R. V. Jamieson (2014) Exome sequencing in developmental eye disease leads to identification of causal variants in GJA8, CRYGC, PAX6 and CYP1B1. *Eur J Hum Genet*, 22, 907-15.
- Quentien, M. H., F. Pitoia, G. Gunz, M. P. Guillet, A. Enjalbert & I. Pellegrini (2002) Regulation of prolactin, GH, and Pit-1 gene expression in anterior pituitary by Pitx2: An approach using Pitx2 mutants. *Endocrinology*, 143, 2839-51.

- Quigley, H. A. & A. T. Broman (2006) The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol*, 90, 262-7.
- Raymond, V. (1997) Molecular genetics of the glaucomas: mapping of the first five "GLC" loci. *Am J Hum Genet*, 60, 272-7.
- Reis, L. M. & E. V. Semina (2011) Genetics of anterior segment dysgenesis disorders. *Curr Opin Ophthalmol*, 22, 314-24.
- 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 & A. L. Q. A. 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.
- Rocca, C., L. Tiberi, S. Bargiacchi, V. Palazzo, S. Landini, E. Marziali, R. Caputo, F. Tinelli, V. Marchi, A. Benedetto, A. Pagliazzi & G. M. Bacci (2022) Expanding the Spectrum of Oculocutaneous Albinism: Does Isolated Foveal Hypoplasia Really Exist? *Int J Mol Sci*, 23.
- Rooryck, C., F. Morice-Picard, E. Lasseaux, D. Cailley, H. Dollfus, S. Defoort-Dhellemme, B. Duban-Bedu, T. J. de Ravel, A. Taieb, D. Lacombe & B. Arveiler (2011) High resolution mapping of OCA2 intragenic rearrangements and identification of a founder effect associated with a deletion in Polish albino patients. *Hum Genet*, 129, 199-208.
- Royer-Bertrand, B., K. Cisarova, F. Niel-Butschi, L. Mittaz-Crettol, H. Fodstad & A. Superti-Furga (2021) CNV Detection from Exome Sequencing Data in Routine Diagnostics of Rare Genetic Disorders: Opportunities and Limitations. *Genes (Basel)*, 12.
- Rudnicka, A. R., S. Mt-Isa, C. G. Owen, D. G. Cook & D. Ashby (2006) Variations in primary open-angle glaucoma prevalence by age, gender, and race: a Bayesian meta-analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 4254-61.
- Samant, M., B. K. Chauhan, K. L. Lathrop & K. K. Nischal (2016) Congenital aniridia: etiology, manifestations and management. *Expert Rev Ophthalmol*, 11, 135-144.
- Seifi, M. & M. A. Walter (2018) Axenfeld-Rieger syndrome. *Clin Genet*, 93, 1123-1130.
- Semina, E. V., I. Brownell, H. A. Mintz-Hittner, J. C. Murray & M. Jamrich (2001) Mutations in the human forkhead transcription factor FOXE3 associated with anterior segment ocular dysgenesis and cataracts. *Hum Mol Genet*, 10, 231-6.
- Semina, E. V., R. Reiter, N. J. Leysens, W. L. Alward, K. W. Small, N. A. Datson, J. Siegel-Bartelt, D. Bierke-Nelson, P. Bitoun, B. U. Zabel, J. C. Carey & J. C. Murray (1996) Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nat Genet*, 14, 392-9.
- Sharan, S. & F. A. Billson (2005) Anterior megalophthalmos in a family with 3 female siblings. *J Cataract Refract Surg*, 31, 1433-6.
- Skuta, G. L., J. Sugar & E. S. Ericson (1983) Corneal endothelial cell measurements in megalocornea. *Arch Ophthalmol*, 101, 51-3.
- Sowden, J. C. (2007) Molecular and developmental mechanisms of anterior segment dysgenesis. *Eye (Lond)*, 21, 1310-8.
- Sridhar, M. S. (2018) Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol*, 66, 190-194.
- Titheradge, H., F. Togneri, D. McMullan, L. Brueton, D. Lim & D. Williams (2014) Axenfeld-Rieger syndrome: further clinical and array delineation of four unrelated patients with a 4q25 microdeletion. *Am J Med Genet A*, 164A, 1695-701.
- Vaiculiene, R., N. Rylskyte, G. Baguzyte & V. Jasinskas (2022) Risk factors for fluctuations in corneal endothelial cell density (Review). *Exp Ther Med*, 23, 129.
- Valenzuela, A. & R. A. Cline (2004) Ocular and nonocular findings in patients with aniridia. *Can J Ophthalmol*, 39, 632-8.

- Vincent, A., G. Billingsley, M. Priston, D. Williams-Lyn, J. Sutherland, T. Glaser, E. Oliver, M. A. Walter, G. Heathcote, A. Levin & E. Heon (2001) Phenotypic heterogeneity of CYP1B1: mutations in a patient with Peters' anomaly. *J Med Genet*, 38, 324-6.
- Webb, T. R., M. Matarin, J. C. Gardner, D. Kelberman, H. Hassan, W. Ang, M. Michaelides, J. B. Ruddle, C. E. Pennell, S. Yazar, C. C. Khor, T. Aung, M. Yogarajah, A. G. Robson, G. E. Holder, M. E. Cheetham, E. I. Traboulsi, A. T. Moore, J. C. Sowden, S. M. Sisodiya, D. A. Mackey, S. J. Tuft & A. J. Hardcastle (2012) X-linked megalocornea caused by mutations in CHRDL1 identifies an essential role for ventroptin in anterior segment development. *Am J Hum Genet*, 90, 247-59.
- Xie, Q., D. Ung, K. Khafizov, A. Fiser & A. Cvekl (2014) Gene regulation by PAX6: structural-functional correlations of missense mutants and transcriptional control of Trpm3/miR-204. *Mol Vis*, 20, 270-82.
- Xu, H. E., M. A. Rould, W. Xu, J. A. Epstein, R. L. Maas & C. O. Pabo (1999) Crystal structure of the human Pax6 paired domain-DNA complex reveals specific roles for the linker region and carboxy-terminal subdomain in DNA binding. *Genes Dev*, 13, 1263-75.
- Yang, Q., S. Yi, M. Li, B. Xie, J. Luo, J. Wang, X. Rong, Q. Zhang, Z. Qin, L. Hang, S. Feng & X. Fan (2019) Genetic analyses of oculocutaneous albinism types 1 and 2 with four novel mutations. *BMC Med Genet*, 20, 106.
- Yi, J., J. Yun, Z. K. Li, C. T. Xu & B. R. Pan (2011) Epidemiology and molecular genetics of congenital cataracts. *Int J Ophthalmol*, 4, 422-32.
- Zagozewski, J. L., Q. Zhang & D. D. Eisenstat (2014) Genetic regulation of vertebrate eye development. *Clin Genet*, 86, 453-60.
- Zhang, F., L. Zhang, L. He, M. Cao, Y. Yang, X. Duan, J. Shi & K. Liu (2021a) A PITX2 splice-site mutation in a family with Axenfeld-Rieger syndrome leads to decreased expression of nuclear PITX2 protein. *Int Ophthalmol*, 41, 1503-1511.
- Zhang, L., P. H. Mathers & M. Jamrich (2000) Function of Rx, but not Pax6, is essential for the formation of retinal progenitor cells in mice. *Genesis*, 28, 135-42.
- Zhang, Y., X. Chen, L. Wang, X. Sun & Y. Chen (2021b) Heterogeneity of Axenfeld-Rieger Syndrome: Molecular and Clinical Findings in Chinese Patients. *Front Genet*, 12, 732170.

11. Přílohy

Příloha 1. Moravikova J, Kozmik Z, Hlavata L, Putzova M, Skalicka P, Michaelides M, Malinka F, Dudakova L, Liskova P. Phenotype Variability in Czech Patients Carrying *PAX6* Disease-Causing Variants. *Folia Biol.* (2020)

Příloha 2. Moravikova J, Honzik T, Jadvidzakova E, Zdrahalova K, Kremlíkova Pourova R, Korbasova M, Liskova P, Dudakova L. Hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome in three Czech families: molecular genetic testing and clinical implications. *J AAPOS.* (2020)

Příloha 3. Jedlickova J, Vajter M, Barta T, Black G, Perveen R, Mares J, Fichtl M, Kousal B, Dudakova L and Liskova P. *MIR204* n.37C>T variant as a cause of chorioretinal dystrophy variably associated with iris coloboma, early-onset cataracts and congenital glaucoma. *Clinical Genetics.* (2023)

Příloha 4. Reis LM, Sorokina EA, Dudakova L, Moravikova J, Skalicka P, Malinka F, Seese SE, Thompson S, Bardakjian T, Capasso J, Allen W, Glaser T, Levin AV, Schneider A, Khan A, Liskova P, Semina EV. Comprehensive phenotypic and functional analysis of dominant and recessive *FOXE3* alleles in ocular developmental disorders. *Hum Mol Genet.* (2021)

Příloha 5. Dudakova L, Tuft S, Cheong SS, Skalicka P, Jedlickova J, Fichtl M, Hlozaneck M, Filous A, Vaneckova M, Vincent AL, Hardcastle AJ, Davidson AE, Liskova P. Novel disease-causing variants and phenotypic features of X-linked megalocornea. *Acta Ophthalmol.* (2022)

Příloha 6. Reis LM, Maheshwari M, Capasso J, Atilla H, Dudakova L, Thompson S, Zitano L, Lay-Son G, Lowry RB, Black J, Lee J, Shue A, Kremlíkova Pourova R, Vaneckova M, Skalicka P, Jedlickova J, Trkova M, Williams B, Richard G, Bachman K, Seeley AH, Costakos D, Glaser TM, Levin AV, Liskova P, Murray JC, Semina EV. Axenfeld-Rieger syndrome: more than meets the eye. *J Med Genet.* (2022)

Příloha 7. Skalicka P, Jedlickova J, Horinek A, Trkova M, Davidson AE, Tuft SJ, Dudakova L, Liskova P. Snail Track Lesion with Flat Keratometry in Anterior Segment Dysgenesis Caused by a Novel *FOXC1* Variant. *J Clin Med.* (2022)