

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Genetika, molekulární biologie a virologie

Studijní obor: N-GEMOEU



Bc. Natálie Rysková

Molekulárně genetická analýza vzácných onemocnění oka
v romské populaci na území České republiky

Molecular genetic analysis of rare ocular disorders
in Roma population from the Czech Republic

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. MUDr. Petra Lišková, M.D., Ph.D.

Konzultant práce: Mgr. Viktor Stránecký, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení:

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

V Praze, 10. 08. 2023

.....

Bc. Natálie Rysková

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. MUDr. Petře Liškové, M.D., Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, za cenné rady a informace k tématu a trpělivost při jejím vypracování. Velice si vážím času, který moje školitelka věnovala mé práci včetně důkladných korekcí. Poděkování patří také konzultantovi diplomové práce Mgr. Viktoru Stráneckému, Ph.D. za cenné rady v problematice biostatistické analýzy.

Velké poděkování patří také kolektivu Oční kliniky 1. LF UK a VFN v Praze, kolektivu Laboratoře pro studium vzácných nemocí Kliniky pediatrie a dědičných poruch metabolismu (KPDPM) 1. LF UK a VFN, a to především mým kolegyním a Ph.D. studentkám Mgr. Janě Jedličkové a Ing. Monice Pankievič, Mgr. Kristýně Barvíkové z Laboratoře cílené metabolomiky KPDPM 1. LF UK a VFN v Praze za přátelský přístup, atmosféru v laboratoři a ochotu vždy poradit a pomoci. Za spolupráci při vypracování své diplomové práce děkuji dále Národnímu centru lékařské genomiky, Fakultní nemocnici v Motole, Davidu Comasovi a jeho vědecké skupině na Univerzitě Pompeu Fabra v Barceloně.

V neposlední řadě bych také velmi ráda poděkovala svému příteli Bc. Mgr. Oliveru Henrymu Bartuskovi za podporu, trpělivost a pevné nervy při vypracování mé diplomové práce.

Práce vznikla za finanční podpory GAUK 321522, SVV 260367/2017 a Islandu, Lichtenštejska a Norska prostřednictvím Fondů EHP, č. projektu: ZD-ZDOVA2-001.

Abstrakt

Romové jsou největší a nejrozšířenější nadnárodní etnickou komunitou. Česká republika odhaduje jejich 2% zastoupení ve své populaci. Vzhledem k vysoké míře endogamie jsou spektrum a frekvence dědičných onemocnění v romské populaci odlišné od populace většinové. Hereditární onemocnění oka jsou jednou z nejčastějších příčin nevidomosti u dětí a mladších dospělých a představují tak významnou socioekonomickou zátěž. Cílem práce byla molekulárně genetická analýza dědičných onemocnění postihující zrak včetně kombinovaných vad a syndromů u jedinců romského původu a stanovení frekvence detekovaných patogenních variant v této populaci.

Molekulárně genetická analýza 17 rodin byla provedena pomocí přímého a celoexomového sekvenování. V rámci mezinárodní spolupráce byla dále stanovena jejich vzájemná míra příbuznosti pomocí programu PLINK. Frekvence vybraných variant byla sledována na kontrolním souboru 156 romských exomů a genomů. Spektrum chorob v analyzovaném souboru zahrnovalo různé dystrofie sítnice, primární kongenitální glaukom, Usherův syndrom, neuronální ceroidní lipofuscinózu, Noonanův syndrom, nanofthalmus a syndrom kongenitální katarakty, faciálního dysmorfismu a demyelinizační neuropatie.

Výsledky diplomové práce naznačují, že romská populace žijící na území České republiky má vyšší riziko vzniku neuronální ceroidní lipofuscinózy, dystrofie sítnice s časnou manifestací, primárního kongenitálního glaukomu, nanofthalmu a Usherova syndromu.

Klíčová slova

Romská populace, efekt zakladatele, etnicky specifické mutace, molekulární diagnostika, oční onemocnění, hluchota, Sangerovo sekvenování, sekvenování nové generace

Abstract

The Roma are the largest and most widespread transnational ethnic community. The Czech Republic estimates their 2% representation in its population. Due to the high level of endogamy, the spectrum and frequency of hereditary diseases in the Roma population differ from the majority population. Hereditary eye diseases are one of the most common causes of blindness in younger adults and thus represent a real socio-economic burden. The aim of the thesis was to perform molecular genetic analysis in individuals of Roma origin suffering from hereditary diseases affecting vision, including dual impairments and syndromes, and to determinate the frequency of the detected pathogenic variants in this population.

Molecular genetic analysis of 17 families was performed using direct and whole exome sequencing. Within the framework of an international collaboration, the degree of their mutual kinship was calculated using the PLINK program. The frequency of selected variants was determined in a control dataset comprising 156 Roma exomes and genomes. The spectrum of analyzed diseases included various retinal dystrophies, primary congenital glaucoma, Usher syndrome, neuronal ceroid lipofuscinosis, Noonan syndrome, nanophthalmos and congenital cataract, facial dysmorphism and neuropathy.

The results of the thesis suggest that Roma population in the Czech Republic has a higher risk of developing neuronal ceroid lipofuscinosis, early-onset retinal dystrophy, primary congenital glaucoma, nanophthalmos and Usher syndrome.

Keywords

Roma population, founder effect, ethnic specific mutations, molecular diagnostics, ocular disorders, deafness, Sanger sequencing, next-generation sequencing

Obsah

ÚVOD	9
1 PŘEHLED LITERATURY	10
1.1 ROMSKÁ POPULACE	10
1.1.1 Putování předchůdců Romů z Jižní Asie	12
1.1.2 Romové na území České republiky	13
1.1.3 Současná situace Romů v Evropě	13
1.2 GENETICKÝ DRIFT A ZAKLADATELSKÁ MUTACE	14
1.3 ZRAK	15
1.3.1 Anatomie oka	15
1.4 SLUCH	18
1.4.1 Anatomie ucha	18
1.5 VZÁCNÁ ONEMOCNĚNÍ	20
1.5.1 Retinitis pigmentosa	20
1.5.2 Stargardtova choroba	21
1.5.3 Leberova kongenitální amauroza/dystrofie sítnice s časnou manifestací	23
1.5.4 Achromatopsie	24
1.5.5 Primární kongenitální glaukom	24
1.5.6 Nanofthalmus	25
1.5.7 Syndrom kongenitální katarakty, faciálního dysmorfismu a demyelinizační neuropatie	26
1.5.8 Neuronální ceroidní lipofuscinóza	26
1.5.9 Nesyndromová ztráta sluchu	27
1.5.10 Usherův syndrom	27
1.5.11 Cohenův syndrom	28
1.6 SEKVENOVÁNÍ	29
1.6.1 Sangerova metoda sekvenování	29
1.6.2 Masivní paralelní sekvenování	30
2 CÍLE PRÁCE	32
3 MATERIÁL A METODY	33
3.1 SOUBOR PACIENTŮ	33
3.2 SOUBOR DAT ANONYMIZOVANÝCH ROMSKÝCH JEDINCŮ	33
3.3 GENEALOGICKÁ ANALÝZA	34
3.4 METODY IZOLACE DNA	34
3.4.1 Izolace DNA z krve	34
3.4.2 Izolace DNA ze slin	36
3.5 STANOVENÍ KONCENTRACE, ČISTOTY A INTEGRITY DNA	38
3.6 CELOEXOMOVÉ A CELOGENOMOVÉ SEKVENOVÁNÍ	38
3.7 ANALÝZA A HODNOCENÍ VARIANT	39
3.8 NAVRŽENÍ PRIMERŮ	42
3.9 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	44
3.10 ELEKTROFORETICKÉ OVĚŘENÍ PCR PRODUKTŮ	45
3.11 PŘEČISTĚNÍ PRODUKTU	45
3.12 SANGEROVA METODA SEKVENOVÁNÍ	46
3.13 ANALÝZA SEKVENCÍ	46
3.14 ANALÝZA PŘÍBUZNOSTI	46

3.15	VÝBĚR JEDINCŮ PRO STANOVENÍ POPULAČNĚ SPECIFICKÝCH FREKVENCÍ.....	47
3.16	VÝPOČET FREKVENCE MINORITNÍ ALELY.....	47
4	VÝSLEDKY	49
4.1	MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ ANALÝZA	49
4.1.1	Rodina 1 – Usherův syndrom a nesyndromová ztráta sluchu.....	49
4.1.2	Rodina 2 – Syndrom kongenitální katarakty, faciálního dysmorfismu a demyelinizační neuropatie a nanofthalmus	51
4.1.3	Rodina 3 – Stargardtova choroba	53
4.1.4	Rodina 4 – Primární kongenitální glaukom a nesyndromová ztráta sluchu.....	54
4.1.5	Rodina 5 – Neuronální ceroidní lipofuscinóza	56
4.1.6	Rodina 6 – Usherův syndrom	58
4.1.7	Rodina 7 – Primární kongenitální glaukom.....	59
4.1.8	Rodina 8 – Leberova kongenitální amauroza.....	60
4.1.9	Rodina 9 – Stargardtova choroba	61
4.1.10	Rodina 10 – Retinitis pigmentosa.....	63
4.1.11	Rodina 11 – Leberova kongenitální amauroza	65
4.1.12	Rodina 12 – Noonanův syndrom	67
4.1.13	Rodina 13 – Achromatopsie	68
4.1.14	Rodina 14 – Leberova kongenitální amauroza	69
4.1.15	Rodina 15 – Primární kongenitální glaukom	70
4.1.16	Rodina 16 – Leberova kongenitální amauroza	71
4.1.17	Rodina 17 – Leberova kongenitální amauroza	72
4.2	ANALÝZA FREKVENCÍ PRO URČENÍ POPULAČNĚ SPECIFICKÝCH ROMSKÝCH VARIANT	73
4.2.1	Varianta NM_000350.3 (ABCA4):c.5917del.....	74
4.2.2	Varianta NM_032119.4 (ADGRV1):c.8220G>A	74
4.2.3	Varianta NM_022124.6 (CDH23):c.871G>A	74
4.2.4	Varianta NM_004715.4 (CTDP1):c.863+389C>T	75
4.2.5	Varianta NM_000104.2 (CYP1B1):c.1022G>A.....	75
4.2.6	Varianta NM_000104.2 (CYP1B1):c.1159G>A.....	76
4.2.7	Varianta NM_004004.6 (GJB2):c.35del	76
4.2.8	Varianta NM_004004.6 (GJB2):c.71G>A	76
4.2.9	Varianta NM_004004.6 (GJB2):c.109G>A	77
4.2.10	Varianta NM_004004.6 (GJB2):c.269T>C	77
4.2.11	Varianta NM_181714.4 (LCA5):c.633_639del.....	78
4.2.12	Varianta NM_000428.3 (LTBP2):c.895C>T	78
4.2.13	Varianta NM_002038603.2 (MARVELD2):c.1331+2T>C.....	79
4.2.14	Varianta NM_001371596.2 (MFSD8):c.881C>A.....	79
4.2.15	Varianta NM_001371596.2 (MFSD8):c.1349A>G.....	79
4.2.16	Varianta NM_006204.4 (PDE6C):c.2141T>A	80
4.2.17	Varianta NM_001195129.2 (PRSS56):c.1509G>C	80
4.2.18	Varianta NM_152443.3 (RDH12):c.316C>T	81
4.2.19	Varianta NM_000329.3 (RPE65):c.1451G>T.....	81
4.2.20	Varianta NM_152564.5 (VPS13B):c.4763G>T.....	82
5	DISKUZE	83
6	SOUHRN	91
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	92
8	WEBOVÉ ZDROJE	101
	PŘÍLOHY	102

Seznam použitých zkratek

Zkratka	Termín v anglickém jazyce	Termín v českém jazyce
ACMG-AMP	American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology	-
angl.	-	anglicky
ANI	Ancestral North Indian	-
ASI	Ancestral South Indian	-
AWE	Ancestral West Eurasian	-
bp	base pare	pár bází
ČR	Czech republic	Česká republika
ddH₂O	double-distilled water	redestilovaná voda
EDTA	-	kyselina etylendiamintetraoctová
EOSRD	early onset retinal dystrophy	dystrofie sítnice s časnou manifestací
ERN	European Reference Network	Evropské referenční síť
F	forward	přímý
KPDPM	-	Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu
Lat.	-	latinsky
LF	-	Lékařská fakulta
LCA	Leber congenital amaurosis	Leberova kongenitální amauróza
MAF	minor allele frequency	frekvence minoritní alely
NCL	neuronal ceroid lipofuscinosis	neuronální ceroidní lipofuscinóza
NGS	next-generation sequencing	sekvenování nové generace
PCG	primary congenital glaucoma	primární kongenitální glaukom
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
R	reverse	opačný
RP	retinitis pigmentosa	retinitis pigmentosa
STGD	Stargardt disease	Stargardtova choroba
UK	-	Univerzita Karlova
VFN	-	Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

Úvod

Romové jsou největší a zároveň nejrozšířenější nadnárodní etnickou komunitou v Evropě, pocházející ze severní oblasti Jižní Asie, z okolí provincie Panjab. Přestože jsou Romové dnes právoplatní občané Evropské Unie, většinou se potýkají s určitou mírou nerovnosti s ohledem na majoritní populaci, a to jak ve směru vzdělání a zaměstnanosti, tak bydlení či přístupu ke zdravotní péči. Segregace, kulturní a společenské rozdíly jsou příčinou toho, že Romové jsou vysoce endogamní populací s nízkou genetickou diverzitou, pro kterou je typický výskyt autozomálně recesivně dědičných onemocnění na základě etnicky specifických patogenních variant v homozygotním stavu.

Tato diplomová práce je věnována problematice vzácných onemocnění zraku, v některých případech kombinovaných s postižením sluchu u Romske populace žijící na území České republiky. Zrak a sluch jsou nejdůležitější ze smyslů lidského těla, pomocí nichž je získávána většina informací o našem okolí. Při postižení některého z těchto dvou smyslů dochází k výraznému snížení kvality života jedince.

Rozmanitost monogenně podmíněných onemocnění zraku je obrovská. Mezi nejčastější patří retinitis pigmentosa, Stargardtova choroba, Leberova kongenitální amauroza/dystrofie sítnice s časnou manifestací a kongenitální glaukom, ze syndromových onemocnění pak Usherův syndrom.

Znalost etnicky specifických patogenních variant a jejich frekvencí, důsledná edukace o riziku vzniku autozomálně recesivně dědičných onemocněních a zlepšení dostupnosti specializované zdravotní péče jsou důležité pro cílenou prevenci výskytu vzácných chorob.

1 Přehled literatury

1.1 Romská populace

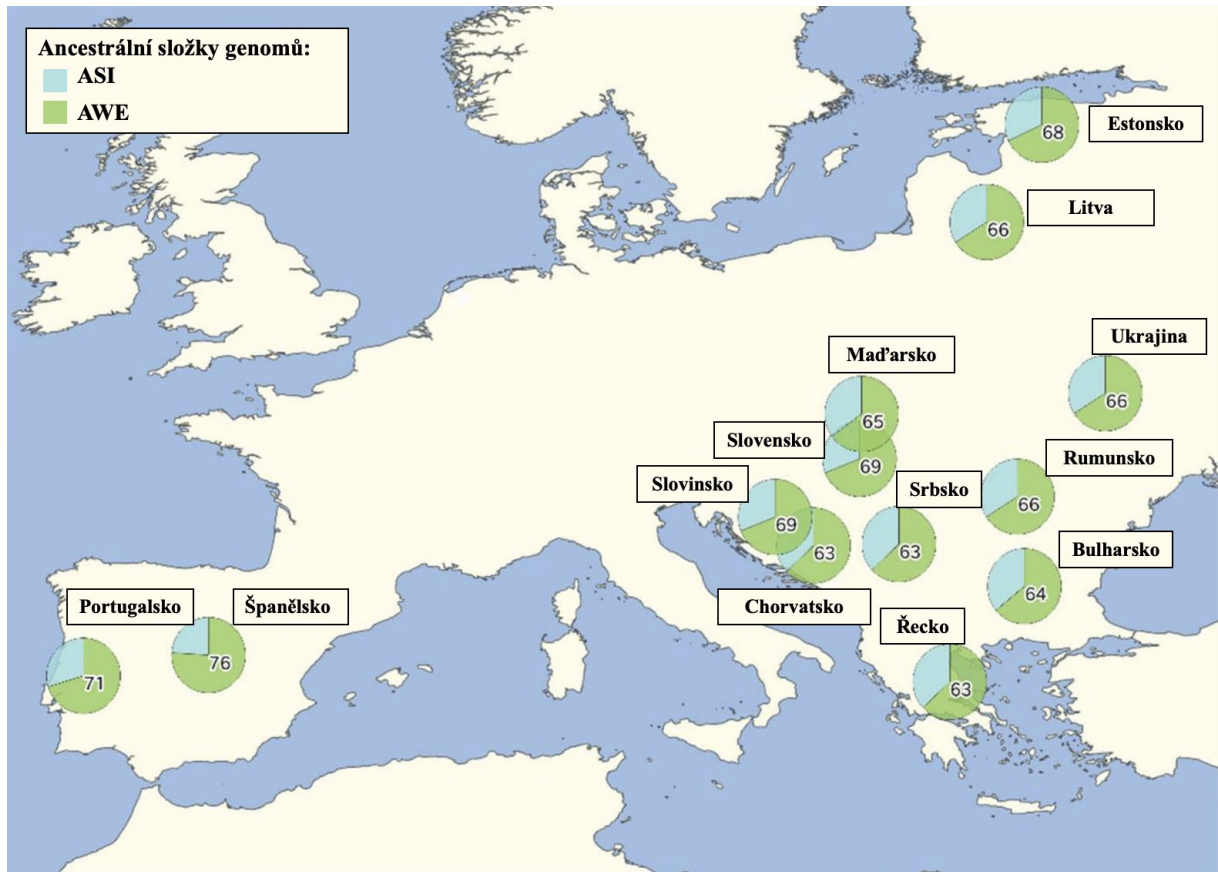
Romové jsou největší a zároveň nejrozšířenější nadnárodní etnickou komunitou v Evropě. Počet jedinců romského původu je odhadován mezi 10–12 miliony, přičemž okolo 6 milionů obývá země Evropské unie (Martínez-Cruz *et al*, 2016; Font-Porterías *et al*, 2019). Z odhadů provedených v roce 2012 Evropským parlamentem vyplývá, že nejvíce osídlenými státy jsou Bulharsko s přibližným zastoupením 10,3 % obyvatel, Slovensko (9,1 %), Rumunsko (8,3 %), Maďarsko (7 %), Řecko (2,5 %) a Španělsko (1,6 %). Česká republika (ČR) odhaduje ve své populaci 2% zastoupení Romů. V ostatních evropských státech pak Romové tvoří méně než 1 % obyvatel. Vzhledem k nedostatku spolehlivých dat se však jedná pouze o odhady a reálné počty obyvatel romského etnika se mohou lišit (Font-Porterías *et al*, 2019; *European Parliament*, 2023).

Přestože se jednotlivé romské subpopulace v průběhu let adaptovaly na podmínky a zvyky oblastí, ve kterých se usídlily, a jsou tak v různých regionech od sebe více či méně odlišné, mají Romové jednotný původ, společnou identitu a kulturní tradice (Fraser, 1992; Hancock, 2006).

Po několik staletí vycházela většina informací o historii Romů z lingvistických studií, srovnání sociálních antropologů a historických záznamů neromských populací. Na základě těchto výzkumů bylo zjištěno, že předchůdci Romů pochází ze severních oblastí Jižní Asie, přesněji z okolí provincie Panjab (Fraser, 1992; Rochow a Matschke, 1998 cit. v Gresham *et al*, 2001). Recentní studie založené na studiu autozomálních (Mendizabal *et al*, 2012; Font-Porterías *et al*, 2019) a uniparentálních genetických markerů tento původ potvrdily (Mendizabal *et al*, 2011; Pamjav *et al*, 2011; Regueiro *et al*, 2012). Ve studii Font-Porterías *et al*, 2019 bylo zjištěno, že genomy Romů mají přibližně z 65 % západoeurasijskou složku (AWE – angl. Ancestral West Eurasian) a z 35 % jihoasijskou složku, která je z větší části tvořena severoindickou (ANI – angl. Ancestral North Indian) a z malé části jihoindickou podsložkou (ASI – angl. Ancestral South Indian).

Genetická heterogenita současné romské populace je výsledkem komplexních historických událostí při migraci předchůdců z Jižní Asie (Font-Porterías *et al*, 2019; Ena *et al*, 2022). Poměr složek zděděných po předcích u jednotlivých romských subpopulací se liší v závislosti na původní velikosti subpopulace po jejím oddělení, míře endogamie a rozdílném genovém toku vedoucím k silnému genetickému driftu v případě mísení se s majoritní

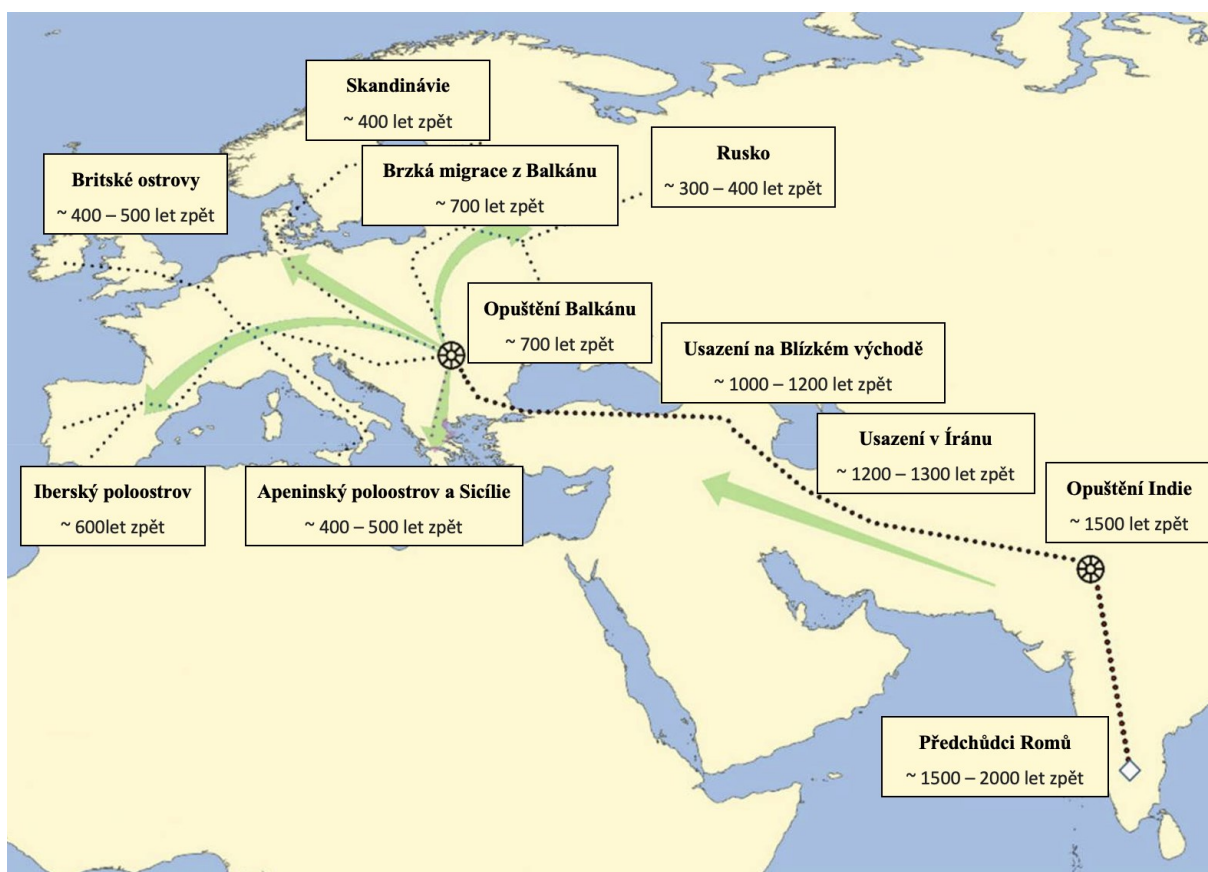
populací. Všeobecně lze říct, že všechny evropské subpopulace Romů vykazují ve své AWE složce v různém procentuálním zastoupení balkánský element (angl. Balkan genetic footprint) jako výsledek poměrně nedávné události. Evropské subpopulace Romů žijící v západních oblastech Evropy mají zastoupení AWE složky procentuálně vyšší (Obr. 1) (Ena *et al*, 2022).



Obrázek 1: Poměr ancestrálních složek genomů Romů na území Evropy. Převzato a upraveno z Ena *et al*, 2022.

1.1.1 Putování předchůdců Romů z Jižní Asie

Z historických a genetických poznatků vyplývá, že předchůdci Romů opustili území Indie přibližně před 1500 lety a poté migrovali skrze Íránskou vysočinu a Blízký východ. Přestože neexistují přesné informace o genetickém toku při mísení se s jinými populacemi v rámci jejich migrace do doby jejich vstupu na území Evropy, na základě přítomnosti některých uniparentálních znaků se předpokládá jejich usídlení na území dnešního Íránu přibližně po jedno století a na území dnešního Blízkého východu přibližně po dobu dvou století. Jejich migrace na území Evropy pokračovala skrze dnešní poloostrov Malá Asie, okolo jižního pobřeží Černého moře, což potvrzuje také přítomnost několika gruzínských slov v romštině. Historicky se předpokládá, že na území Balkánského poloostrova dorazili Romové přibližně ve 13. století, což bylo potvrzeno také genetickými studiemi (Mendizabal *et al*, 2011; Moorjani *et al*, 2013; Font-Porterías *et al*, 2019; Bianco *et al*, 2020). Následná migrace a rozptýlení se romské populace po celé Evropě (Obr. 2) trvala přibližně do 15. století (Ena *et al*, 2022).



Obrázek 2: Putování předchůdců Romů z Jižní Asie na území Evropy. Převzato a upraveno z Ena *et al*, 2022.

1.1.2 Romové na území České republiky

První zmínky o Romech na území ČR pocházejí z 15. století. V průběhu následujících století až do současnosti se postoj vůči Romům měnil, obecně lze říct, že byl vždy spíše negativní. Romové byli diskriminováni a utlačováni. V průběhu 2. světové války byli koncentrováni v pracovních táborech a systematicky vyhlazováni, populace českých a moravských Romů byla jako celek zlikvidována (Horváthová, 2002).

Romové se dělí do řady skupin, podskupin a rodů. V ČR jsou nejvíce zastoupeni Romové slovenští, označováni také jako Rumungro, neboli Romové uherští. Tato skupina představuje přibližně 75–85 % Romů na našem území. Druhou nejvýrazněji zastoupenou skupinou jsou Romové olašští (10 %). Zbýlých 10–15 % připadá na Romy maďarské, původní Romy české a německé Sinty (Horváthová, 2002).

Dle informací z webu Vlády ČR je postavení Romů i přes mnohé asimilační pokusy o integraci horší oproti majoritní populaci a často žijí v sociálně vyloučených lokalitách (Vláda České republiky, 2022).

1.1.3 Současná situace Romů v Evropě

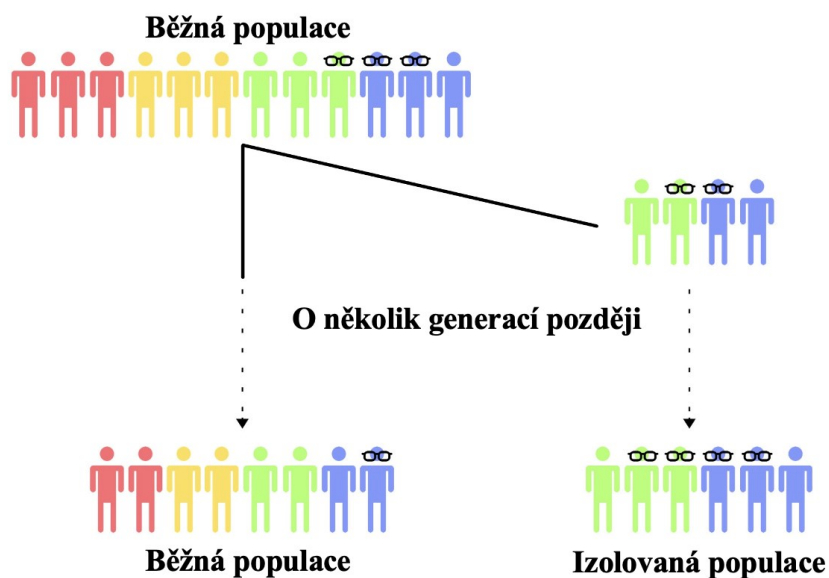
Přestože jsou Romové dnes pravoplatní občané Evropské Unie, většinově se stále potýkají s určitou mírou nerovnosti s ohledem na majoritní populaci, a to jak ve směru vzdělání a zaměstnanosti, tak bydlení či přístupu ke zdravotní péči. V důsledku marginalizace a persekuce mnoho Romů nepříznává své etnikum při sčítání lidu (*European Union Agency for Fundamental Rights, 2018; Council of Europe, 2020*).

Segregace, kulturní a společenské rozdíly jsou příčinou toho, že Romové jsou vysoce endogamní populací, pro kterou je typický výskyt autozomálně recesivně dědičných onemocnění na základě etnicky specifických patogenních variant v homozygotním stavu (Gresham *et al*, 2001).

1.2 Genetický drift a zakladatelská mutace

Genetický posun (drift) je změna v četnosti alel v populaci. Velikost populace má nepřímo úměrný vliv na náchylnost ke genetickému driftu. Ve velkých populacích je genetický posun minimální a frekvence alel téměř konstantní, zatímco v malé populaci se alelové četnosti náhodně mění a v důsledku tohoto jevu dochází ke snížení heterogenity, čímž je výrazně redukována genetická variabilita a diverzita populace (Simmons & Snustad, 2017).

Efekt zakladatele (angl. founder effect), běžně nazývaný také jako „efekt hrdla lahve“, je jev vysvětlující snížení genetické diverzity. Vzniká při prudkém poklesu počtu jedinců v populaci, typicky při migraci malé skupiny obyvatel nesoucí pouze omezené množství genetických variací (Obr. 3). V důsledku toho může dojít ke zvýšení frekvence patogenních alel pro určitá vzácná onemocnění (Kivisild, 2013). Typickým příkladem udávaným v literatuře je populace Finska, která prodělala sérii genetických posunů, v jejichž důsledku jsou nadměrně zastoupené onemocnění skupiny FDH (angl. Finnish disease heritage). Jedná se přibližně o 40 monogenně podmíněných onemocnění pro vrozené vývojové vady, onemocnění kostí, hluchotu, metabolická a multisystémová onemocnění (Norio, 2003; Polvi *et al*, 2013).



Obrázek 3: Princip izolované populace a efektu zakladatele.

1.3 Zrak

Zrak je považován za nejdůležitější smysl lidského těla, pomocí něhož získáváme až 80 % veškerých informací a vjemů o našem okolí (Ripley & Politzer, 2010). Díky stavbě oka a jeho správné funkci je člověk schopen registrovat elektromagnetické vlnění v rozsahu přibližně 400–760 nm a po převodu na bioelektrické podněty nervových buněk skrze fotochemický proces v sítnici tak vnímat obrovské spektrum barev, kontrast a kontury předmětů, a především se orientovat v prostoru (Naňka & Elišková, 2020).

1.3.1 Anatomie oka

Oko neboli oční koule (lat. *bulbus oculi*) je velice složitý smyslový receptor kulovitého tvaru a průměru přibližně 25 mm, uložený v oční dutině lebky (lat. *orbita*). Skládá se ze tří základních vrstev: vnější vrstvy oční koule (lat. *tunica fibrosa*), střední vrstvy oční koule (lat. *tunica vasculosa*) a vnitřní vrstvy oční koule (lat. *tunica intima*) (Heissigerová *et al*, 2018; Naňka & Elišková, 2020). Schéma anatomické stavby lidského oka zobrazuje Obr. 4.

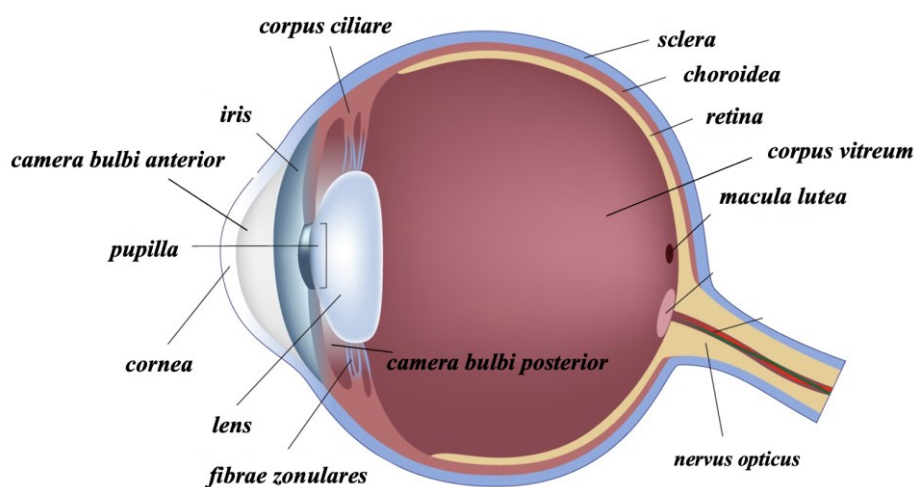
Tunica fibrosa je tvořena bělimou (lat. *sclera*) a rohovkou (lat. *cornea*). Bělma je mléčně bílá bezcévná fibrózní tkáň, tvořená kolagenním vazivem a fibroblasty, zaujímající přibližně 5/6 povrchu oční koule. Utváří její pevný obal o tloušťce 0,3–2,0 mm, který je zodpovědný za udržování tvaru a mechanickou ochranu proti poškození. V oblasti zadního pólu oční koule (lat. *polus posterior*) prochází skrze bělimu zrakový nerv (lat. *nervus opticus*), cévy (lat. *arteriae ciliares breves et longae, venae vorticosae*) a další nervy (lat. *nervi ciliares breves et longi*). Zbylou 1/6 povrchu v přední části oční koule zaujímá rohovka, což je z bělimy přecházející transparentní mírně eliptická struktura tvořená z pěti vrstev. Nejsvrchnější část povrchu rohovky představuje vícevrstevný dlaždicový nerohovějící rohovkový epitel a jeho bazální membrána, pod ním je kolagenní Bowmanova vrstva. Stroma rohovky je tvořeno lamelárními kolagenními vlákny a keratocyty. Nejvnitřnější vrstvou rohovky je endotel a jeho bazální membrána, zvaná Descemetova membrána (Heissigerová *et al*, 2018; Naňka & Elišková, 2020).

Tunica vasculosa neboli živnatka (lat. *uvea*), je tenká střední vrstva přiléhající z vnitřní strany na bělimu, jejíž funkcí je nejen výživa sítnice, ale také regulace množství světla dopadajícího na sítnici. Živnatka je v zadní části oční koule tvořena cévnatkou (lat. *choroidea*), v přední části oční koule pak cévnatka přechází v řasnaté tělísko (lat. *corpus ciliare*) tvořené vazivovým stromatem a hladkou svalovinou. Klíčovými funkcemi řasnatého tělíška je

především tvorba nitrooční tekutiny, vyplňující oční komory a vyživující čočku a rohovku, ale také upevnění čočky a ovlivňování jejího vyklenutí. Řasnaté tělísko pak přechází v nejpřednější části oční koule v duhovku (lat. *iris*), v jejíž centrální části se nachází kruhový otvor zvaný zornice (lat. *pupilla*), která plní funkci clony regulující množství pronikajícího světla změnou své velikosti. Duhovka je tvořena hladkou svalovinou, vazivem a množstvím protkaných cév a nervů (Heissigerová *et al*, 2018; Naňka & Elišková, 2020).

Duhovka spolu s čočkou rozdělují prostor oční koule na přední a zadní oční komoru (lat. *camera bulbi anterior et posterior*), které jsou vyplněny komorovou tekutinou. Čočka (lat. *lens*) je transparentní bikonvexní bezcévný útvar uložený za zornicí v zadní komoře. Uložena je v nebuněčném pouzdře (lat. *capsula lentis*) a zavěšena na tenkých vlákních závěsného aparátu řasnatého tělíska (lat. *fibrae zonulares*). Jejich tahem a uvolňováním dochází k oplošťování a vyklenutí čočky, čímž dochází k akomodaci na určitou vzdálenost (Heissigerová *et al*, 2018; Naňka & Elišková, 2020).

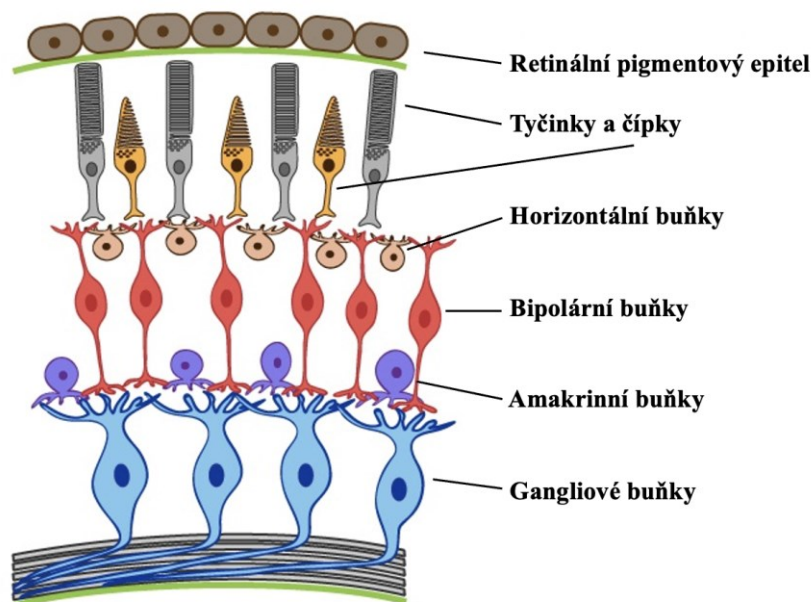
Vnitřní vrstvu oční koule, *tunica intima*, představuje sítnice (lat. *retina*) a zrakový nerv (lat. *nervus opticus*). Sítnice je těsně na živnatku naléhající tenká vrstva o šířce přibližně 0,1–0,4 mm, která sehrává klíčovou roli v samotném vidění. Sítnici je možné rozdělit na dvě stavebně a funkčně odlišné části, a to na optickou část sítnice (lat. *pars opticae retinae*), a *pars caeca retinae*, která přiléhá na zadní plochu duhovky a k řasnatému tělísku a nemá percepční schopnost. Optická část sítnice je uspořádána do několika vrstev – retinální pigmentový epitel, tyčinky a čípky, horizontální buňky, bipolární buňky, amakrinní buňky, gangliové buňky a axony gangliových buněk (Obr. 5) (Naňka & Elišková, 2020).



Obrázek 4: Schéma anatomické stavby lidského oka. Převzato a upraveno z *Symptomty – databáze příznaků a indikací častých nemocí*, ©2009–2023.

Retinální pigmentový epitel je melanosomy obsahující vrstva v těsném kontaktu s cévnatkou zajišťující výživu a transport kyslíku pro tyčinky a čípky. Tyčinky a čípky jsou světločivné buňky (fotoreceptory) zachycující světelnou energii ve formě fotonů. Lidské oko obsahuje přibližně 120 milionů tyčinek, zodpovědných za percepci intenzity světla a kontrastů, a okolo 6–7 milionů čípků. Čípky, díky kterým je člověk schopen vnímat barevné spektrum, se v sítnici vyskytují v několika typech, z nichž každý vnímá pouze jednu barvu. Místo s největší koncentrací čípků se nazývá žlutá skvrna (lat. *macula lutea*), která je zároveň místem nejostřejšího vidění (Naňka & Elišková, 2020).

Fotoreceptory představují první neurony zrakové dráhy. Registrují světelné podněty a mění je na elektrické potenciály pomocí speciálních pigmentů – rhodopsinu v tyčinkách a iodopsinu v čípcích. Vzniklý akční potenciál se přenáší na druhý neuron zrakové dráhy, kterým je vrstva bipolárních buněk. Třetí neuron zrakové dráhy představují gangliové buňky. Jejich axony se pak v oblasti *papilla nervi optici* sbíhají ve zrakový nerv. Tato oblast neobsahuje žádné světločivné buňky, proto se nazývá také tzv. slepou skvrnou. Prostor mezi zadní plochou čočky a sítnicí je vyplněn rosolovitou polotekutou dokonale transparentní hmotou, která se nazývá sklivec (lat. *corpus vitreum*). Sklivec je tvořen z vody, kolagenu, kyseliny hyaluronové a řady proteinů (Heissigerová *et al*, 2018; Naňka & Elišková, 2020).



Obrázek 5: Schéma vrstev sítnice. Převzato a upraveno z Chludilová, 2017.

K přídatným orgánům oka (lat. *organa oculi accesoria*) patří spojivka (lat. *tunica conjunctiva*), což je jemná slizniční vrstva, pokrývající vnitřní plochu očních víček a přední stranu oční koule. Do spojivkového vaku pak vyúsťují vývody slzných žláz (lat. *apparatus lacrimalis*) a společně zajišťují zvlhčování spojivky a rohovky. Dále k přídatným orgánům patří šest okohybných svalů (lat. *musculi bulbi*), zajišťující pohyb a postavení oční koule, vazivový aparát očnice (lat. *vagina bulbi*) a periost orbity (lat. *periorbita*), horní a dolní oční víčka (lat. *palpebra superior et inferior*), chránící oko před poraněním a nečistotami a zároveň také regulující množství světla dopadajícího na sítnici (Naňka & Elišková, 2020).

1.4 Sluch

Sluch je dalším z pěti základních smyslů, umožňující percepci zvuku, respektive akustických vln o frekvenci 16 až 20 000 Hz. Základní podstatou sluchu je transformace těchto vln na elektrické akční potenciály, které jsou vedeny do mozku pomocí osmého hlavového nervu (lat. *nervus vestibulocochlearis*) (Naňka & Elišková, 2020).

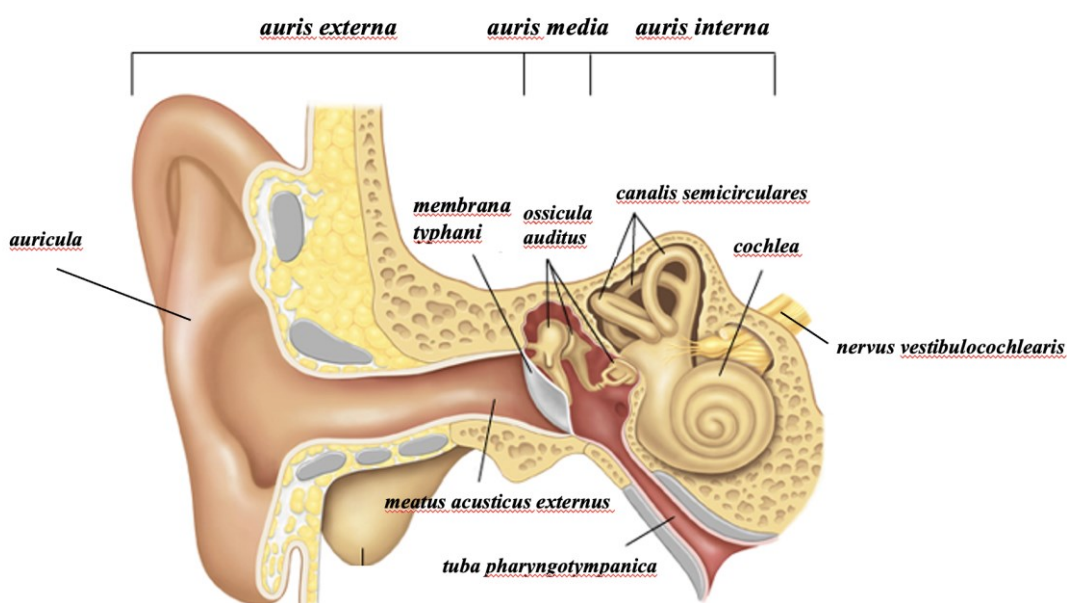
1.4.1 Anatomie ucha

Anatomicky i funkčně se sluchové ústrojí dělí na tři části: vnější ucho (lat. *auris externa*), střední ucho (lat. *auris media*) a vnitřní ucho (lat. *auris interna*) (Naňka & Elišková, 2020).

Ušní boltec (lat. *auricula*) je členitým elastickým chrupavčítým útvarem krytým tenkou vrstvou kůže. Vlnění zachycené boltcem je přenášeno skrze esovitý, přibližně 9 mm dlouhý, zevní zvukovod (lat. *meatus acusticus externus*), na jehož vnitřní části dojde k rozkmitání bubínku (lat. *membrana tympani*), což je tenká poloprůsvitná membrána. Bubínek představuje hranici mezi zevním a středním uchem. Zevní plocha bubínku je pokryta mnohvrstevným dlaždicovým epitelem a vnitřní, středoušní, plochým jednovrstevným epitelem. Mezi nimi se nachází síť kolagenních vláken (Naňka & Elišková, 2020).

Vnitřní stranou bubínku začíná bikonkávní štěrbina – středoušní dutina (lat. *cavitas tympani*), která plynule přechází v Eustachovu trubici (lat. *tuba pharyngotympanica*), vyrovnávající tlak mezi středoušní dutinou a nosohltanem. V prostoru středoušní dutiny se dále nachází tři drobnými klouby pohyblivě spojené sluchové kůstky (lat. *ossicula auditus*) přenášející chvění bubínku na perilymfu vnitřního ucha. Nazývají se: kladívko (lat. *malleus*), kovadlinka (lat. *incus*) a třmínek (lat. *stapes*) (Naňka & Elišková, 2020).

Vnitřní ucho tvoří blanitý labyrint (lat. *labyrinthus membranaceus*) vyplněný endolymfou, který je uložen uvnitř kostěného labyrintu (lat. *labyrinthus osseus*) vyplněného perilymfou ve skalní kosti lebky (lat. *os petrosum*). Skrze tyto tekutiny dochází k přenosu mechanického vlnění ze sluchových kůstek na sluchové receptory. Kostěný labyrint tvoří hlemýžď (lat. *cochlea*), *vestibulum* a tři polokruhové kanálky (lat. *canalis semicirculares anterior, posterior et lateralis*). Blanitý labyrint se pak dále dělí na dvě části – část statickou (lat. *pars statica*), představující centrum rovnováhy, a část sluchovou (lat. *pars auditiva*), zajišťující samotné slyšení. Vlastním sluchovým receptorem je Cortiho orgán, tvořený smyslovými buňkami, opatřenými stereociliemi, a podpůrnými buňkami. Při podráždění stereocilií chvěním endolymfy dochází k vyvolání zvukových podnětů, pokračující skrze sluchově rovnovážný nerv (lat. *nervus vestibulocochlearis*) sluchovou dráhou do mozku (Naňka & Elišková, 2020). Nákres ucha a středoušního labyrintu zobrazuje Obr. 6.



Obrázek 6: Schéma anatomické stavby lidského ucha. Převzato a upraveno z Tampa Bay Hearing & Balance Center, ©2023.

1.5 Vzácna onemocnění

Vzácná onemocnění jsou dle Národního zdravotnického informačního portálu charakterizována jako onemocnění, jejichž prevalence je nižší než 5 osob z 10 000, přičemž tyto onemocnění jsou spojena s nárůstem morbidity a mortality, případně snížením kvality života postižených jedinců. V současné době je známo přibližně 8 000 vzácných onemocnění. Vzácna onemocnění v rámci Evropské unie postihují 6–8 % populace, což odpovídá přibližně 27 až 36 milionům lidí (*Národní zdravotnický informační portál*, 2023).

Vzácná onemocnění a jejich příčinné geny jsou katalogizovány v různých databázích. Jednou z nejčastěji používaných je portál Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) dostupný na <https://www.omim.org>. U onemocnění sítnice je významným zdrojem informací databáze RetNet (<https://web.sph.uth.edu/RetNet/>), pro onemocnění asociované se ztrátou sluchu slouží databáze Hereditary Hearing Loss Homepage (<https://hereditaryhearingloss.org/>).

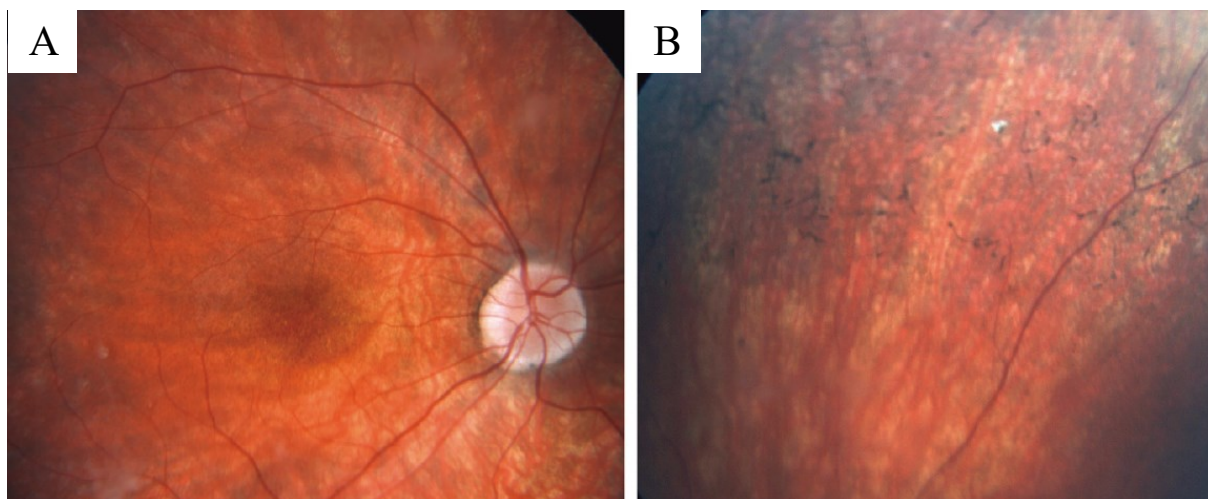
Rozmanitost monogenně podmíněných onemocnění zraku a sluchu je obrovská. V další části práce jsou proto selektivně zmíněna pouze ta, která byla detekována u pacientů romského původu žijících v ČR v rámci této práce anebo byla již dříve popsána v literatuře.

1.5.1 Retinitis pigmentosa

Retinitis pigmentosa (RP) je geneticky heterogenní skupina dědičných onemocnění vedoucí k progresivní degeneraci sítnice. Mezi typické symptomy RP patří šeroslepost, postupné omezování zorného pole a vznik tunelového vidění (Obr. 7). Na buněčné úrovni dochází nejprve k apoptóze tyčinek a retinálního pigmentového epitelu, posléze také čípků (Obr. 8A). Typickou známkou RP při vyšetření očního pozadí je pak přítomnost tzv. kostních buněk, což jsou shluky migrovaného retinálního pigmentového epitelu (Obr. 8B) (Ferrari *et al*, 2011).



Obrázek 7: Porovnání vidění: A, zdravého jedince; B, jedince s onemocněním retinitis pigmentosa.



Obrázek 8: Fotografie fundu jedince s onemocněním retinitis pigmentosa. A, vzhledově normální papila, relativně zachovalá makula s cirkulárním projasněním v kontrastu s chorioretinální atrofií v periferii; B, shluky migrovaného retinálního pigmentového epitelu ve tvaru kostních buněk. Převzato a upraveno z Kousal *et al*, 2013.

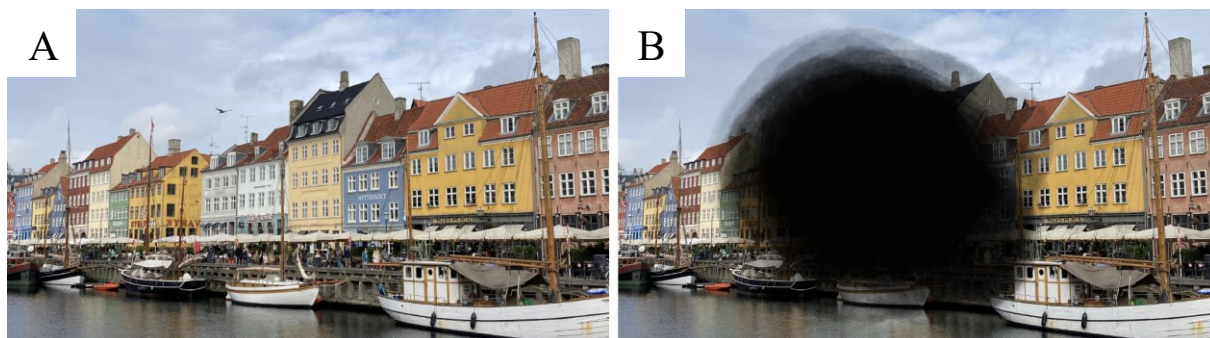
RP může být děděná autozomálně dominantně, autozomálně recesivně, digenně nebo X-vázaně, přičemž tato forma bývá nejzávažnější (Veltel *et al*, 2008; Ferrari *et al*, 2011). Nejčastěji se objevuje jako samostatné onemocnění bez postižení dalších orgánů, přičemž tento typ je asociován dle databáze RetNet s patogenními variantami v přibližně 70 genech (*RetNet, the Retinal Information Network*, ©1996–2022). Pokud je RP jednou ze známek syndromového onemocnění, jedná se nejčastěji o Usherův syndrom (viz Kapitola 1.5.10) (Ferrari *et al*, 2011; Daiger *et al*, 2013).

Přestože je RP onemocněním relativně častým s odhadovanou prevalencí v Evropských populacích 1 postižený na 4 000 obyvatel, nebyla v odborné literatuře nalezena žádná zmínka o tomto onemocnění u Romů žijících na území ČR.

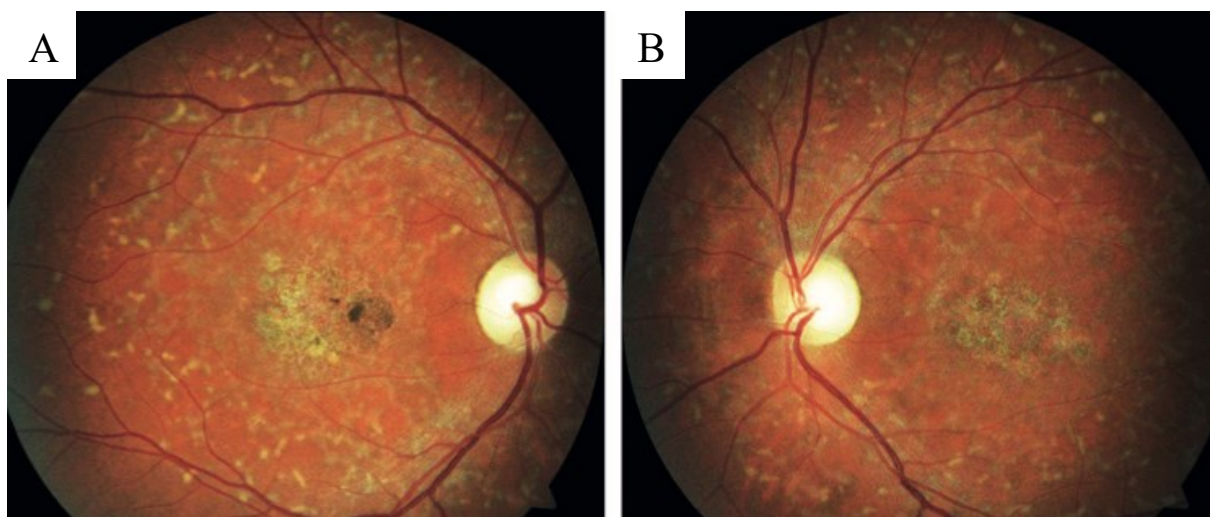
1.5.2 Stargardtova choroba

Stargardtova choroba (STGD – angl. Stargardt disease) je nejčastější hereditární makulární dystrofií s autozomálně recesivní a dominantní dědičností. Toto onemocnění se manifestuje jako bilaterální ztráta centrálního vidění (Obr. 9) v důsledku progresivní degenerace tyčinek a čípků na podkladě hromadění lipofuscinu v buňkách retinálního pigmentového epitelu (Obr. 10) (Allikmets *et al*, 1997). STGD je asociována s mutacemi v genech *ABCA4* (*601691), *ELOVL4* (*605512) a *PROM1* (*604365).

STGD se vyskytuje s prevalencí přibližně 1 postiženého na 8 000–10 000 narozených dětí (Kousal *et al*, 2014). Toto onemocnění také nebylo v odborné literatuře popsáno u Romů z ČR.



Obrázek 9: Porovnání vidění: A, zdravého jedince; B, jedince s Stargardtovou chorobou.



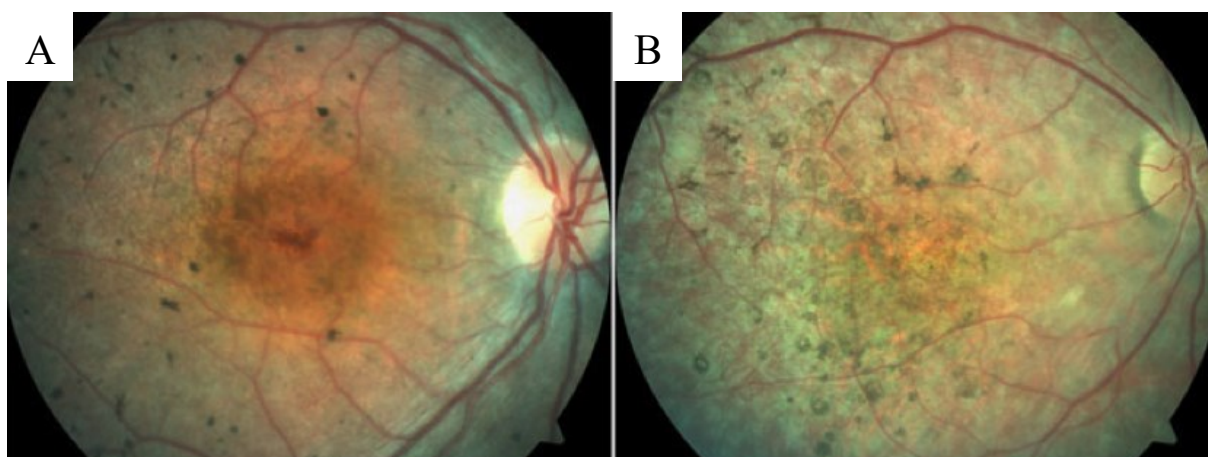
Obrázek 10: Fotografie fundu jedince se Stargardtovou chorobou dokumentující ložiska nahromaděného lipofuscinu a atrofii retinálního pigmentového epitelu. A, pravé oko; B, levé oko. Převzato a upraveno z Kousal *et al*, 2014.

1.5.3 Leberova kongenitální amauroza/dystrofie sítnice s časnou manifestací

Leberova kongenitální amauroza (LCA – angl. Leber congenital amaurosis) představuje soubor především autozomálně recesivně dědičných retinálních dystrofií, které se manifestují do prvního roku života (Chao *et al*, 2019). Onemocnění postihuje jak tyčinky, tak čípky (Kumaran *et al*, 2018; Huang *et al*, 2021).

LCA se projevuje jako těžké postižení zraku nebo jeho úplná ztráta, součástí bývá i nystagmus a strabismus. V počínající fázi onemocnění se sítnice může jevit při vyšetření očního pozadí jako normální, později lze zachytit abnormality retinálního pigmentového epitelu i sítnice ve formě prořídnutí, ztenčení a shluků pigmentu (Chung & Traboulsi, 2009). LCA může být také součástí různých syndromů, nejčastějšími jsou Bardetův-Biedelův syndrom, Seniorův-Lokenův syndrom nebo neuronální ceroidní lipofuscinóza (viz Kapitola 1.5.7) (Senior *et al*, 1961; Loken *et al*, 1961; Lindstrand *et al*, 2016). Syndromové formy se řadí převážně mezi ciliopatie (Waters & Beales, 2011).

Dystrofie sítnice s časnou manifestací (EOSRD – angl. early onset retinal dystrophy) je také progresivní degenerativní onemocnění (Obr. 11), které vzniká na rozdíl od LCA až v dětství, zpravidla do 5. roku života postiženého jedince (Kumaran *et al*, 2018). EOSRD bývají v odborné literatuře často zaměňovány za LCA nebo bývají uváděny dohromady jako LCA/EOSRD. Dle webu GeneVision jsou LCA/EOSRD asociovány s mutacemi ve více než 26 genech (GeneVision, ©2020).



Obrázek 11: Fotografie fundu jedinců s dystrofií sítnice s časnou manifestací. A, penízková pigmentace u probanda (6 let); B, penízková pigmentace a shluky migrovaného retinálního pigmentového epitelu ve tvaru kostních buněk u jiného probanda (28 let). Převzato a upraveno z Kousal *et al*, 2016.

Odhadovaná prevalence LCA/EOSRD je 1 postižený na 33 000–81 000 narozených dětí (Kumaran *et al*, 2017). U Romů žijících v ČR nebylo v odborné literatuře toto onemocnění zatím popsáno. U slovenských Romů byla detekována homozygotní mutace NM_000329.3:c.1451G>T p.(Gly484Val) v genu *RPE65* (osobní komunikace s MUDr. Beátou Bušányovou, Bratislava).

1.5.4 Achromatopsie

Achromatopsie neboli úplná barvoslepost je neprogresivní autozomálně recesivně dědičné onemocnění charakterizované fotofóbií, sníženou zrakovou ostroší, nystagmem, a především neschopností rozlišovat jednotlivé barvy (Obr. 12). Na buněčné úrovni dochází k nefunkčnosti na podkladě defektu proteinů fototransdukční kaskády. U některých pacientů lze pozorovat atrofii čípků v makulární oblasti. Achromatopsie je způsobená patogenními variantami v 6 genech (Kohl *et al*, 1998, Michalakis *et al*, 2022).



Obrázek 12: Porovnání vidění: A, zdravého jedince; B, jedince s onemocněním achromatopsie.

Prevalence achromatopsie je 1 postižený na 30 000–50 000 jedinců (Hlavatá *et al*, 2019). V odborné literatuře nebyla nalezena zmínka o výskytu tohoto onemocnění v romské populaci v ČR.

1.5.5 Primární kongenitální glaukom

Primární kongenitální glaukom (PCG – angl. primary congenital glaucoma) je autozomálně recesivně dědičné onemocnění manifestující se jako zvýšený nitrooční tlak při narození, vedoucí k buftalmu (zvětšení bulbu), vzniku Haabových strií (trhliny Descemetovy membrány) a edému rohovky (Obr. 13). Ireverzibilní degenerace zrakového nervu je pak příčinou snížení zrakové ostroší až nevidomosti (Azmanov *et al*, 2011).

Onemocnění vzniká nejčastěji na podkladě patogenních variant v genech *CYP11B* (OMIM *601771) a *LTBP2* (OMIM *602091).



Obrázek 13: Fotografie jedince s primárním kongenitálním glaukomem. Převzato z *EyeWiki – American Academy of Ophthalmology*, ©2019.

PCG se v Evropě vyskytuje přibližně u 1 dítěte na 10 000–18 000 narozených (Marx-Gross *et al*, 2017). Výraznější četnost byla popsána u slovenských Romů, kde se odhaduje výskyt 1 případ na 800 narozených dětí (Atrata, 2008). Naprostá většina jsou nositelé homozygotní patogenní varianty NM_000104.2:c.1159G>A p.(Glu387Lys) v genu *CYP11B* (Azmanov *et al*, 2011). Pro Romy žijící na území ČR nejsou údaje o prevalenci v literatuře dostupné.

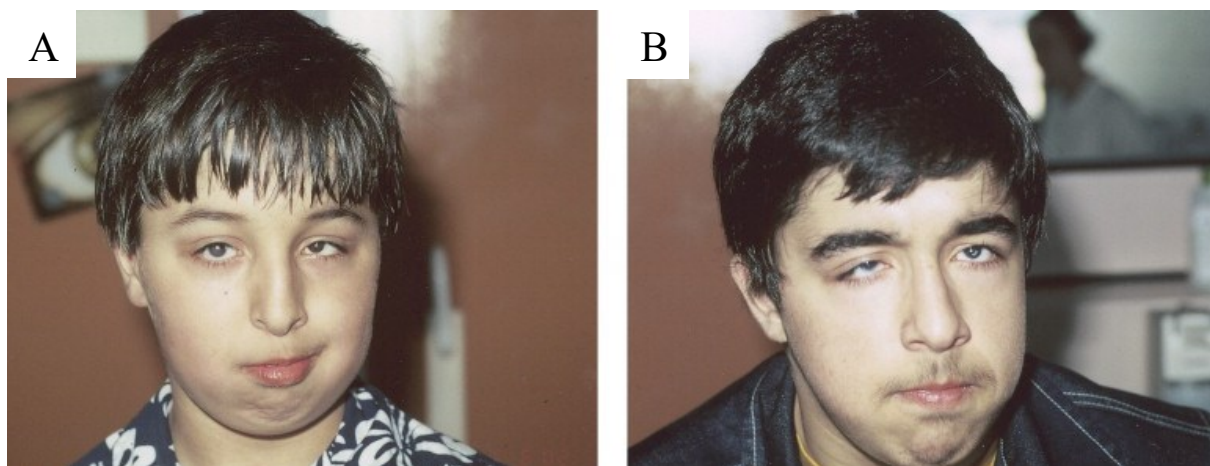
1.5.6 Nanoftalmus

Nanoftalmus je jak autozomálně dominantně, tak autozomálně recesivně dědičná vývojová anomálie oka, charakterizovaná výrazným zmenšením strukturálně normálního oka. Mezi klinické projevy tohoto onemocnění je celkové zmenšení oka (někdy samostatně vyčleňováno jako mikroftalmus), případně zmenšení předního nebo zadního segmentu oka, doprovázeného vysokou hypermetropií, glaukomem, a v některých případech také pigmentovou retinopatií (Carricondo *et al*, 2018; Ďud'áková *et al*, 2020).

Prevalence nanoftalmu není přesně známa, ale předpokládá se, že postižení by mohli být 2–17 ze 100 000 narozených jedinců (Shah *et al*, 2011). Toto onemocnění bylo již popsáno u dvou romských pacientů z jedné rodiny v ČR. U obou postižených jedinců byla nalezena varianta NM_001195129.2:c.1509G>C p.(Met503Ile) v genu *PRSS56* v homozygotním stavu (Ďud'áková *et al*, 2020).

1.5.7 Syndrom kongenitální katarakty, faciálního dysmorfismu a demyelinizační neuropatie

Syndrom kongenitální katarakty, faciálního dysmorfismu a demyelinizační neuropatie (CCFDN – angl. congenital cataract, facial dysmorphism and neuropathy) je autozomálně recesivní dědičné onemocnění postihující výhradně romskou populaci. Onemocnění je způsobeno jednonukleotidovou substitucí v intronu 6 genu *CTDPI* (OMIM *604927). Tento syndrom se projevuje jako kongenitální katarakta variabilně asociovaná s mikroftalmem, typickými rysy v obličeji (prominující středová část obličeje, velký nos, vyčnívající zuby a malá spodní čelist), progresivní periferní neuropatií vedoucí k opoždění motorického vývoje a v dospělosti jako významná porucha mobility (Laššuthová *et al*, 2014; Ďudřáková *et al*, 2020). Faciální dysmorfismus je zachycen na Obr. 14.



Obrázek 14: Jedinci se syndromem kongenitální katarakty, faciálního dysmorfismu a demyelinizační neuropatie. Fotografie A a B zachycuje faciální dysmorfismus. Převzato a upraveno z Müllner-Eidenböck *et al*, 2004.

CCFDN byla v literatuře popsána minimálně u 11 Romů žijících na území ČR (Laššuthová *et al*, 2014; Ďudřáková *et al*, 2020).

1.5.8 Neuronální ceroidní lipofuscinóza

Neuronální ceroidní lipofuscinóza (NCL – angl. neuronal ceroid lipofuscinosis) je skupina závažných progresivních neurodegenerativních onemocnění s manifestací zpravidla již v dětském věku. NCL se dědí autozomálně recesivně, přičemž příčinných genů je známo 13 (Haltia & Goebel, 2013). Onemocnění je charakterizováno úbytkem neuronů a fotoreceptorů v důsledku intracelulární akumulace autofluorescenčního lipopigmentového materiálu.

Mezi hlavní projevy patří progresivní demence, epileptické záchvaty a ztráta vidění (Mole *et al*, 2005; Nolan & Fink, 2018).

Prevalence tohoto onemocnění odpovídá 1 postiženému na 12 500 jedinců (Chang, 2022). NCL typ 7 byla popsána minimálně u 14 Romů pocházejících z ČR a ze Slovenska a vzniká na základě homozygotní varianty NM_001371596.2:c.881C>A p.(Thr294Lys) v genu *MFSD8* (OMIM *611124) (Kousi *et al*, 2009).

1.5.9 Nesyndromová ztráta sluchu

Nesyndromová ztráta sluchu je nejčastější senzoričné onemocnění. Jedná se o kongenitální neprogresivní izolovanou poruchu různého stupně závažnosti vykazující všechny typy dědičnosti (Hilgert *et al*, 2010; del Castillo *et al*, 2002). Příčinou nesyndromové ztráty sluchu jsou mutace ve více než 120 genech (*Hereditary Hearing Loss Homepage*, 2021).

Prevalence nesyndromové ztráty sluchu odpovídá 1–3 postiženým na 1 000 narozených. V české populaci představuje až 80 % všech patogenních mutací asociovaných s tímto onemocněním varianta NM_004004.6:c.35del p.(Gly12ValfsTer13) v genu *GJB2*, která byla ale popsána i u jedinců romského původu ve Španělsku (Álvarez *et al*, 2005). Pro romskou populaci na území Evropy, včetně ČR, je typický výskyt varianty NM_004004.6:c.71G>A p.(Trp24Ter) v genu *GJB2* (Minárik *et al*, 2003; Seeman *et al*, 2004; Seeman & Šišková, 2006). U Romů žijících v ČR a na Slovensku byla nalezena také patogenní varianta NM_001038603.2:c.1331+2T>C v genu *MARVELD2* (Šafka Brožková *et al*, 2011; Mašindová *et al*, 2015).

1.5.10 Usherův syndrom

Usherův syndrom je geneticky a klinicky heterogenní autozomálně recesivně dědičné onemocnění, charakterizované kongenitální vadou sluchu různého stupně, a progresivní degenerací sítnice manifestující se v pozdějším věku, v první nebo druhé dekádě života (Eudy *et al*, 1998).

Dle závažnosti postižení sluchu a zraku a případných problémů s rovnováhou je Usherův syndrom klinicky rozdělován na tři podtypy (Eudy *et al*, 1998). Nejčastější je typ II s mírnou až těžkou vadou sluchu a normálními vestibulárními odpověďmi, naopak pacienti s Usherovým syndromem typu I jsou zcela neslyšící od narození s vestibulární dysfunkcí.

K manifestaci RP u nich dochází dříve než u typu II. Pro Usherův syndrom typu III je pak charakteristická progresivní ztráta sluchu s různým stupněm vestibulárních odpovědí a RP (Eudy *et al*, 1998; Yan & Liu, 2010).

Tento syndrom je způsoben patogenními variantami v 15 genech (*RetNet, the Retinal information Network*, ©1996–2022). Prevalence Usherova syndromu je 4–17 postižených na 100 000 narozených jedinců (Toms *et al*, 2020).

1.5.11 Cohenův syndrom

Cohenův syndrom je vzácné multisystémové autozomálně recesivně dědičné onemocnění manifestující se jako opožděný psychomotorický vývoj, mentální postižení, hypotonie, faciální dysmorfismus, retinální dystrofie a neutropenie. Mohou se projevit také záchvaty v důsledku malformace mozku nebo atrofie hipokampu, kostní a hormonální abnormality. Toto onemocnění je způsobeno variantami v genu *VPS13B* (OMIM *607817) (Kolehmainen *et al*, 2003; AbdelAleem *et al*, 2023).

Cohenův syndrom je také velice vzácné onemocnění, které bylo popsáno u přibližně 200 postižených jedinců (Momtazmanesh *et al*, 2020). Jedná se především o jedince z izolovaných populací. V odborné literatuře nebyla nalezena zmínka o výskytu tohoto onemocnění u Romů žijících na území ČR a na Slovensku.

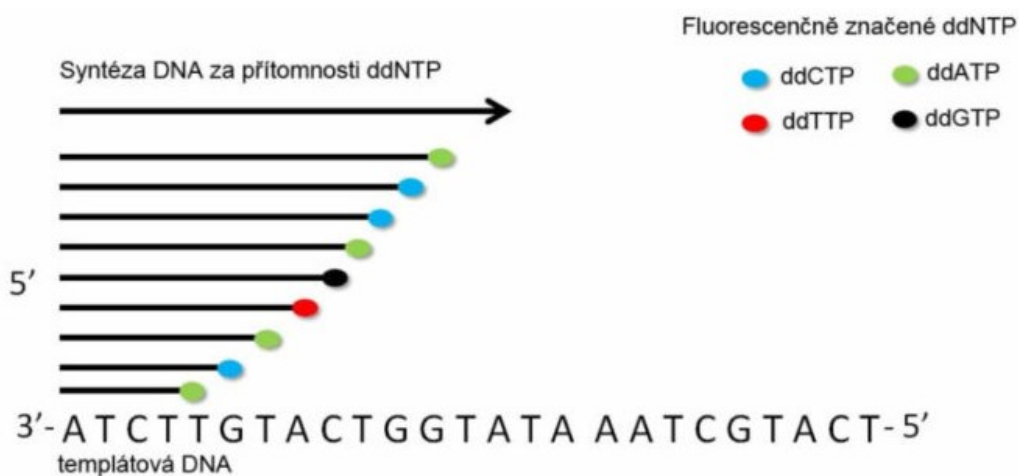
1.6 Sekvenování

Sekvenování je biologicko-chemický proces umožňující čtení pořadí jednotlivých bází (A – adenin, C – cytosin, G – guanin, T – thymin) v DNA. Pro stanovení pořadí nukleotidů se využívá několik různých přístupů, z nichž nejčastěji v praxi využívaným je sekvenování syntézou.

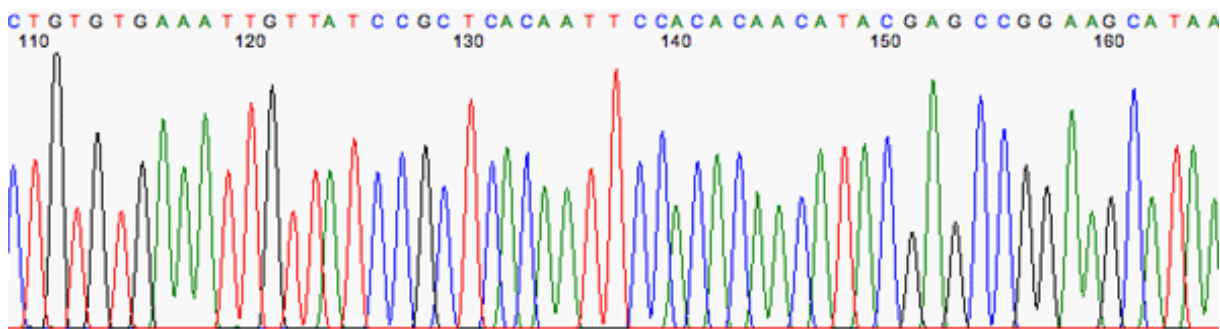
1.6.1 Sangerova metoda sekvenování

V 70. letech minulého století byla Fredericem Sangerem vyvinuta sekvenační metoda, jejíž modifikace je i v současnosti stále nejpoužívanější a nejspolehlivější metodou sekvenování. Využívá se především pro sekvenování krátkých úseků DNA a pro validaci výsledků jiných metod sekvenování.

Sangerova metoda sekvenování je založená na replikaci DNA – do značné míry se jedná o využití techniky polymerázové řetězové reakce (PCR – angl. polymerase chain reaction) za přítomnosti volných deoxynukleotidů a dříve radioaktivně, dnes fluorescenčně značených 2', 3'- dideoxynukleotidů, které syntetizují nový komplementární řetězec DNA k příslušné předloze. Začleněním dideoxynukleotidu je syntéza řetězce ukončena v důsledku nepřítomnosti –OH skupiny na 3'- uhlíku, na něž se již nemůže navázat další deoxynukleotid. Začleňování deoxynukleotidů a 2', 3'- dideoxynukleotidů je zcela náhodný proces, což má za důsledek vznik směsi různě dlouhých fragmentů DNA (Obr. 15). Produkty sekvenačních reakcí jsou následně analyzovány pomocí kapilární elektroforézy s laserovou detekcí, jejíž výstupem je grafické znázornění, tzv. sekvenogram (Obr. 16) (Sanger *et al*, 1977; Smith *et al*, 1986).



Obrázek 15: Princip Sangerovy metody sekvenování. Převzato a upraveno z *LAB Guide – Průvodce laboratoří*.

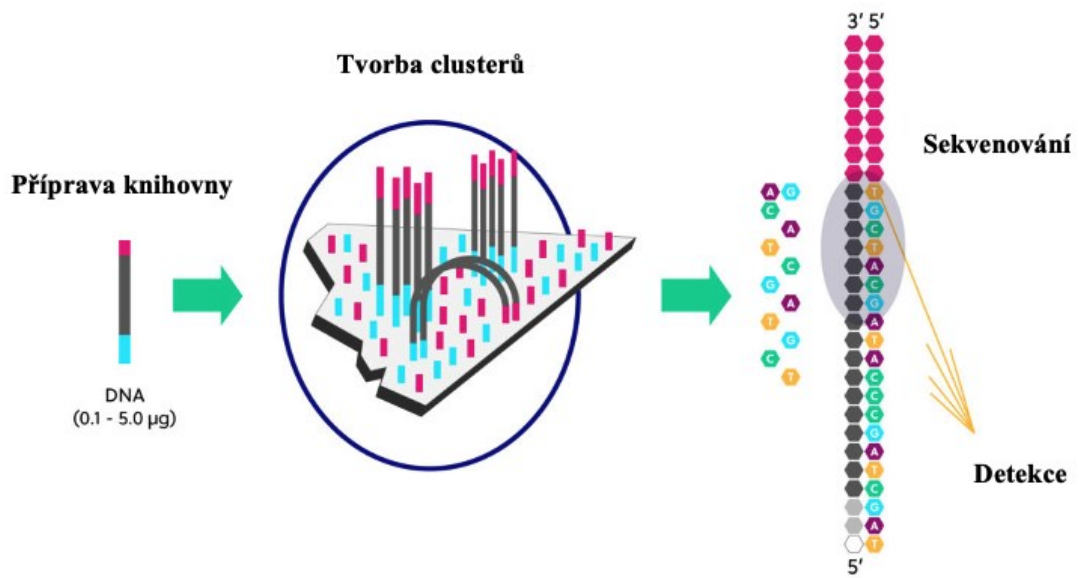


Obrázek 16: Sekvenogram. Převzato z *Palex – Constant Improvement*, ©2022.

1.6.2 Masivní paralelní sekvenování

Na přelomu tisíciletí vyvinutá technologie masivního paralelního sekvenování, známá také jako sekvenování nové generace (NGS – angl. next-generation sequencing), přinesla zásadní výhody oproti předchozím metodám sekvenování a to zejména rychlejší a levnější generování velkého objemu dat a komplexní pokrytí genomu. Právě množství získaných výstupních dat, zajištěné masivním paralelním čtením fragmentů DNA, je tím největším rozdílem oproti sekvenování dle Sangera, při kterém je možné sekvenovat v jednu chvíli pouze jedinou molekulu DNA. Tato výkonná technologie našla své využití v mnoha oblastech biologie a medicíny (Pervez *et al*, 2022).

Metoda NGS využívá různých platform, z nichž nejrozšířenější je Illumina, která je obdobně jako Sangerova metoda sekvenování založena na amplifikaci pomocí PCR. Fragmenty templátové DNA jsou náhodně rozmístěny na čipu, uchyceny adaptéry a amplifikace je zajištěna pomocí speciální můstkové PCR – při amplifikaci dochází k ohnutí fragmentu a vytvoření můstku mezi dvěma komplementárními koncovými adaptéry. Tímto způsobem dochází k vytvoření tzv. clusterů – shluků namnožených kopií určitého fragmentu v jeho okolí sloužící pro zvýšení signálu pro detekci. Samotné sekvenování všech amplifikovaných fragmentů DNA pak probíhá zároveň. Přidáním fluorescenčně značených nukleotidů s inaktivovanou –OH na 3'- uhlíku je zajištěno začlenění vždy jen jednoho z nich (Obr. 17). Po každé inkorporaci nukleotidu je pořízena citlivým detektorem fotografie čipu, která je následně vyhodnocena, poté jsou terminační skupina na 3'- konci a fluorescenční barvička odstraněny a celý proces opakován. V závěru jsou pomocí softwaru nejprve poskládány sekvence jednotlivých fragmentů, které pak na základě překryvů sestavují souvislou sekvenci DNA (Pervez *et al*, 2022).



Obrázek 17: Princip metody masivního paralelního sekvenování na platformě Illumina.
 Převzato a upraveno z *Irepertoire*, ©2023.

2 Cíle práce

- Zkoumat molekulárně genetickou podstatu onemocnění oka, popř. kombinovaného postižení se sluchovou vadou u pacientů romského původu vyšetřených na Oční klinice 1. LF UK a VFN v Praze.
- Analyzovat frekvence výskytu vybraných patogenních sekvenčních variant podmiňující monogenně dědičná onemocnění zraku a sluchu v romské populaci na území ČR.
- Přispět ke zlepšení klinického poradenství pacientům romského původu a jejich rodinám, včetně zefektivnění DNA diagnostiky.
- Upozornit na specifika dědičných onemocnění zraku a sluchu u Romů žijících na území ČR.

3 Materiál a metody

3.1 Soubor pacientů

Výzkum byl proveden v souladu s Helsinskou deklarací Světové lékařské asociace o etických zásadách pro lékařský výzkum zahrnující lidské subjekty, včetně výzkumu na identifikovatelném lidském materiálu a datech (*World Medical Association*, 1964). Všichni pacienti a jejich rodinní příslušníci byli před vyšetřením poučeni, podepsali písemný informovaný souhlas, který jim byl následně spolu s Písemnou informací pro účastníka studie předán. Oba dokumenty byly projednány a schváleny Etickou komisí VFN v Praze.

Pacienti romského původu byli odesláni do Centra klinické oční genetiky při Oční klinice 1. LF UK a VFN v Praze pro podezření nebo s již stanovenou diagnózou vzácného onemocnění zraku. V rámci vyšetření byla probandům a jejich rodinným příslušníkům nabídnuta účast ve výzkumném programu Laboratoře pro studium vzácných nemocí KPDPM 1. LF UK a VFN v Praze s cílem zjistit molekulárně genetické příčiny jejich onemocnění. Etnický původ byl určen na základě posouzení a dotazu vyšetřujícího lékaře.

Pokud vzniklo podezření na syndromové onemocnění, byli pacienti nasměrováni k dalším klinickým specialistům dle symptomů (např. neurolog, otorinolaryngolog). Přednostně byla vybírána pracoviště zapojená do Evropských referenčních sítí (ERN – angl. European Reference Networks) pro vzácná onemocnění.

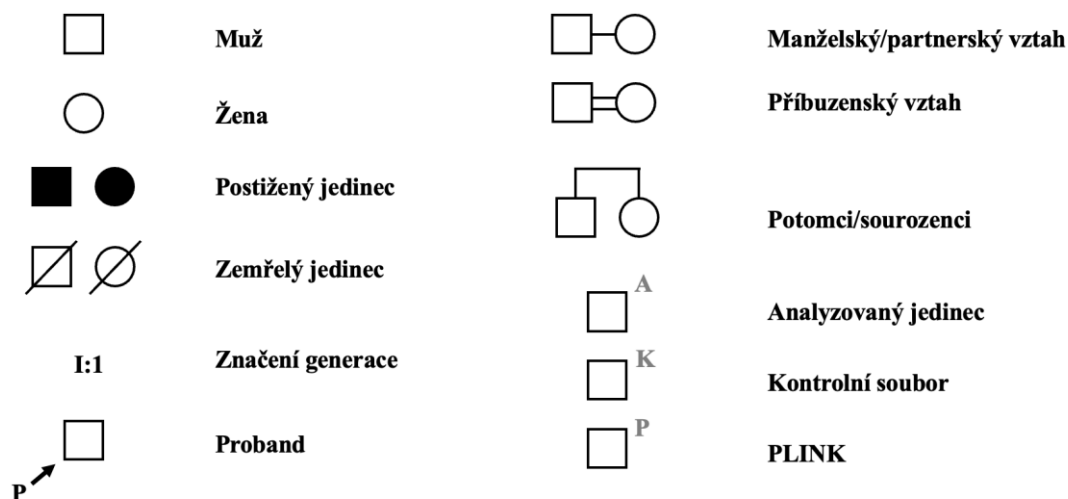
3.2 Soubor dat anonymizovaných romských jedinců

V rámci této diplomové práce bylo pro výpočet frekvencí minoritních alel v romské populaci na území ČR využita celoexomová data 89 anonymizovaných kontrolních romských jedinců generovaných v rámci dřívějších projektů Národního centra lékařské genomiky (<https://ncmg.cz>). Obdobným způsobem bylo využito údajů o frekvencích minoritních alel z celoexomových a celogenomových dat 44 zdravých nepříbuzných romských jedinců analyzovaných ve Fakultní nemocnici v Motole.

3.3 Genealogická analýza

Grafické znázornění rodokmenů v této diplomové práci bylo vytvořeno pomocí volně dostupného a stažitelného softwaru HaploPainter (Thiele & Nürnberg, 2005). Do rodokmenů byli dle rodinné anamnézy získané od pacienta vyznačeni postižení a nepostižení jedinci a na základě těchto informací byl odhadován mendelovský typ dědičnosti daného onemocnění.

Při zakreslování byly využity standardní symboly (Obr. 18), které odpovídají aktualizované verzi genealogické nomenklatury (Bennett *et al*, 2008). Rodokmeny v této práci slouží pro vyobrazení vztahů mezi jednotlivými rodinnými příslušníky a pochopení dědičnosti daného onemocnění v rodině. Dále bylo rodokmenů využito pro segregáční analýzy, při kterých byl sledován výskyt konkrétních variant ve vztahu k danému onemocnění.



Obrázek 18: Základní genealogická nomenklatura využívaná při genealogické analýze.

3.4 Metody izolace DNA

3.4.1 Izolace DNA z krve

Po seznámení se s informacemi pro pacienty a podepsání informovaného souhlasu dle typu onemocnění, kterým pacient trpí (např. dystrofie sítnice; Příloha 1), bylo postiženým jedincům a jejich rodinným příslušníkům odebráno 2×6 ml žilní krve do zkumavek s antikoagulačním činidlem EDTA (kyselina etylendiamintetraoctová). Při odběru žilní krve u dětí byl zohledněn věk a váha. Jedna ze zkumavek byla použita na izolaci DNA, druhá byla uschována v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro případnou potřebu opakované izolace. DNA byla izolována pomocí komerčního kitu Puregene Blood Core Kit C, kat. číslo: 158389 (Qiagen, Hilden, Germany).

Tento izolační kit obsahuje:

- **Red Blood Cell Lysis Solution (RBCLS)** zajišťující lýzu erytrocytů;
- **Cell Lysis Solution (CLS)** narušující membrány buněk pro uvolnění DNA;
- **Rnase A Solution** sloužící pro enzymatickou degradaci RNA;
- **Protein Precipitation Solution (PPS)** umožňující vysrážení proteinů a oddělení nukleových kyselin v důsledku koncentrace soli v tomto pufru;
- **DNA Hydration Solution (DNA HS)** vytvářející vhodné prostředí pro dlouhodobé uchování DNA (1mM EDTA, 10mM Tris, pH 7,5).

Dále byly k izolaci použity (není součástí kitu):

- 100% isopropanol a 70% etanol.

Postup izolace:

1. Do 50ml zkumavek bylo napipetováno 18 ml RBCLS a poté byl k roztoku přidán celý obsah jedné zkumavky s krví (6 ml). Směs byla inkubována při pokojové teplotě za stálého otáčení zkumavky po dobu 5 minut, poté byla provedena centrifugace při 2000× g po dobu 5 minut.
2. Po centrifugaci byl opatrně odstraněn supernatant a pelet bílých krvinek resuspendován vortexováním po dobu 10 sekund. K suspenzi bylo přidáno 6 ml CLS a směs byla promíchána vortexováním opět po dobu 10 sekund.
3. Následně byla směs inkubována v inkubátoru při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin.
4. Ke směsi bylo přidáno 30 μl Rnase A Solution a obsah zkumavky byl promíchán několikerým otočením. Směs byla inkubována v inkubátoru při teplotě 37 °C po dobu dalších 15 minut. Po inkubaci byl vzorek prudce zchlazen na ledu po dobu 5 minut.
5. K vychlazené směsi bylo dále přidáno 2,7 ml PPS a obsah zkumavky byl promíchán vortexováním po dobu 20 sekund. Byla provedena centrifugace při 2000× g po dobu 10 minut.
6. Supernatant byl přelit do nových 50ml zkumavek s připravenými 8,1 ml isopropanolu. Obsah zkumavky byl opatrně promíchán pomalým otáčením zkumavky, dokud nebylo možné pozorovat pouhým okem DNA v podobě bílé sraženiny. Poté byla provedena centrifugace při 2000× g po dobu 5 minut.

7. Supernatant byl opatrně odstraněn a k peletě bylo přidáno 6 ml 70% etanolu. Pelet byl promyt etanolem několikerým otočením zkumavky. Byla provedena centrifugace při 2000× g po dobu 5 minut.
8. Supernatant byl opatrně odstraněn a pelet byl ponechán samovolnému uschnutí na absorpčním papíře při pokojové teplotě po dobu 10–15 minut.
9. V závislosti na množství DNA dle velikosti peletu bylo přidáno odpovídající množství DNA HS. Směs byla promíchána vortexováním po dobu 5 sekund a inkubována v inkubátoru při teplotě 65 °C po dobu 1 hodiny.
10. Vzorek izolované DNA byl uskladněn při –20 °C.

V případě menšího objemu krve při neúspěšném odběru nebo u dětí, byly všechny uvedené objemy roztoků poměrově přepočítány.

3.4.2 Izolace DNA ze slin

Alternativní způsob odběru biologického materiálu na izolaci DNA představuje odběr slin a buněk bukalní sliznice. Při dodržení všech pravidel návodu k odběru, je výtěžek dostatečný i pro celogenomové sekvenování. Pro tento účel byly využívány soupravy Oragene DNA kit pro pacienty schopné volně poskytnout sliny v požadovaném množství, kat. číslo: OG-500 (DNA Genotek, Ottawa, Ontario, Canada). U malých dětí a kojenců byly voleny kity pro asistovaný odběr Oragene DNA kit, kat. číslo: OG-675 a kat. číslo: OC-175. Tyto soupravy (Obr. 19) umožňují snadný a rychlý odběr a poskytují optimální podmínky pro následnou izolaci i skladování vzorku při laboratorní teplotě po dobu několika let.



Obrázek 19: Soupravy Oragene DNA kity. A, OG-500 Oragene DNA kit pro pacienty schopné volně poskytnout sliny; B, OG-675, Oragene DNA kit pro asistovaný odběr slin; C, OC-175, Oragene DNA kit pro asistovaný odběr slin u novorozenců a kojenců. Převzato a upraveno z *DNA Genotek*, ©2023.

Návody k odběru slin pomocí jednotlivých souprav jsou přiloženy k této diplomové práci jako Příloha 2, Příloha 3 a Příloha 4.

DNA byla izolována za pomoci komerčního kitu PrepIT-L2P, kat. číslo: PT-L2P-5 (DNA Genotek, Ottawa, Ontario, Canada).

Tento izolační kit obsahuje:

- **PrepIT-L2P** zajišťují purifikaci genomové DNA ze vzorků slin.

Dále byly k izolaci použity (není součástí kitu):

- 97% a 70% etanol;
- **DNA Hydration Solution (DNA HS)** z komerčního kitu Puregene Blood Core Kit C, kat. číslo: 158389 (Qiagen, Hilden, Germany) vytvářející vhodné prostředí pro dlouhodobé uchování DNA (1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7,5).

Postup izolace:

1. Vzorek slin v soupravě Genotek byl nejprve promíchán vortexováním a dále inkubován v inkubátoru při teplotě 50 °C po dobu 2 hodin.
2. Do 1,5ml zkumavky s 20 µl roztoku PT-L2P bylo napipetováno 500 µl vzorku slin. Obsah zkumavky byl promíchán vortexováním.
3. Vzorek byl prudce zchlazen na ledu po dobu 10 minut. Byla provedena centrifugace při 15 000× g po dobu 5 minut.
4. Supernatant byl opatrně přepipetován do nové 1,5ml zkumavky s 600 µl 95–100% ethanolu. Obsah zkumavky byl promíchán pomalým otáčením zkumavky přibližně 10×.
5. Vzorky byly ponechány samovolné precipitaci DNA. V tomto kroku je možné pozorovat DNA jako bílou sraženinu. Byla provedena centrifugace při 15 000× g po dobu 2 minut.
6. Supernatant byl opatrně odstraněn a pelet DNA byl promyt 250 µl 70% ethanolu.
7. Supernatant byl opatrně odstraněn a pelet DNA byl ponechán samovolnému uschnutí při laboratorní teplotě po dobu 10 minut.
8. Pelet DNA byl rozpuštěn v optimálním množství HS DNA (QIAGEN). Obsah zkumavky byl promíchán krátkým vortexováním.
9. DNA byla ponechána samovolnému rozpouštění v inkubátoru při 50 °C po dobu 1 hodiny. DNA byla následně skladována při teplotě –20 °C.

3.5 Stanovení koncentrace, čistoty a integrity DNA

Koncentrace, čistota a integrita izolované DNA byla stanovena u jednotlivých vzorků pomocí spektrofotometrického přístroje Nanodrop One (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). V některých případech byla koncentrace DNA přeměřena na fluorimetrickém přístroji Qubit (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), za použití Qubit dsDNA Broad Range Assay kitu, kat. číslo: Q32853.

3.6 Celoxomové a celogenomové sekvenování

Celoxomové a celogenomové sekvenování bylo zajištěno společností Novogene, Cambridge, UK za využití analyzátorů HiSeq 4000 a NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, CA, USA). DNA knihovny pro celoxomové sekvenování byly připravovány pomocí SureSelect Human All Exome V5 a V6 capture kitu (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Příprava DNA knihovny pro celogenomové sekvenování byla provedena pomocí kitu NEBNext Ultra II DNA Prep Kit for Illumina (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, US). Pro vlastní sekvenování byl využit sekvenační kit HiSeq 3000/4000 SBS Kit (Illumina, San Diego, CA, USA).

Získaná raw data celoxomové a celogenomové sekvenování ve formátu FASTAQ (.fq) byla zpracována tak, že jednotlivé sekvence byly v programu Novoalign (NovoCraft, Petaling Jaya, Selangor, Malaysia) namapovány na verzi sekvence lidského referenčního genomu (UCSC Genome Browser hg19), následně zkonvertovány do souborů formátu BAM (.bam) a prohlížena pomocí volně dostupného a stažitelného softwaru IGV (Robinson *et al*, 2011), nebo byla zpracována pomocí platformy Franklin (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>).

Franklin uplatňuje postupy umělé inteligence a umožňuje automatizované zpracování sekvenačních dat ve formátu FASTAQ (.fq) či VCF (.vcf) s prioritizací užšího seznamu kandidátních variant na základě zadaných fenotypových znaků. Dále poskytuje klasifikaci jednotlivých variant, jejich anotaci, odkazy na literaturu týkající se daného onemocnění či zmiňující danou variantu, informace o zastoupení variant v populacích a další nástroje.

3.7 Analýza a hodnocení variant

Varianty zjištěné pomocí celoexomového a celogenomového sekvenování byly filtrovány na základě jejich četnosti. Jako potenciálně patogenní byly zvažovány varianty s frekvencí 0,02 a nižší v online dostupné populační databázi gnomAD v2.1.1 (Karczewski *et al*, 2020), která představuje soubor 125 748 celoexomových a 15 708 celogenomových dat (celkem 141 456 jedinců) převážně evropského původu bez manifestace závažného onemocnění. Frekvence výskytu dané varianty v této databázi může poukázat na její klinický význam a pomoci při určování, zda se jedná o potenciální patogenní variantu či běžný polymorfismus. Dále bylo vyhledáno, zda byla varianta již popsána, přičemž byly použity dostupné literární zdroje a internetové databáze NCBI Clinvar (Landrum *et al*, 2018) a genově specifická LOVD (Leiden Open Variation Database) (Fokkema *et al*, 2011).

Nalezené varianty byly dále vyhodnocovány pomocí online dostupných predikčních programů: Revel (Ioannidis *et al*, 2016), Varsity (Wu *et al*, 2021), SIFT (Ng & Henikoff, 2001), Polyphen2 (Adzhubei *et al*, 2010), MutationTaster2 (Schwarz *et al*, 2014), FATHMM (Shihab *et al*, 2013), DANN (Quang *et al*, 2014) a Varsome (Kopanos *et al*, 2018). Predikční programy Revel, Varsity, SIFT, Polyphen 2, FATHMM a DANN využívají pro své predikce skóre a jejich interpretace jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1. Skóre predikčních programů a jejich interpretace.

Revel		
Patogenní (od 1 do 0,644)	Nejasný význam (od 0,643 do 0,290)	Benigní (od 0,289 do 0)
Varsity		
Patogenní (od 1 do 0,5)	Nejasný významu (od 0,49 do 0,35)	Benigní (od 0,34 do 0)
SIFT		
Patogenní (od 0 do 0,001)	Nejasný význam (od 0,002 do 0,008)	Benigní (od 0,009 do 1)
Polyphen 2		
Patogenní (od 1 do 0,15)	Benigní (od 0,14 do 0)	
FATHMM		
Patogenní (od -16,13 do -4,14)	Nejasný významu (od -4,13 do 3,32)	Benigní (od 3,31 do 10,64)
DANN		
Patogenní (od 1 do 0,5)	Benigní (od 0,49 do 0)	

Výsledky hodnocení byly interpretovány na základě kritérií American College of Medical Genetics and Genomics and Association of Molecular Pathology (ACMG-AMP) (Richards *et al*, 2015) s upřesněním počtu o kosegregaci patogenních variant s onemocněním (Jarvik & Browning, 2016). ACMG-AMP kritéria jsou uvedena v Tabulce 2. Kritérium PP5 a BP6 bylo na základě aktualizovaného doporučení vynecháno (Biesecker & Harrison, 2019). ACMG-AMP systém rozřazuje varianty do pěti základních kategorií: patogenní, pravděpodobně patogenní, varianty nejasného významu, pravděpodobně benigní a benigní.

Tabulka 2: ACMG-AMP kritéria.

Kritérium	
Patogenní velmi silný (Pathogenic Very Strong)	
PVS1	Specifické varianty typu nonsense, varianty posunující čtecí rámeček, zasahující kanonické sestřihové místo ± 2 nt do intronu nebo iniciační kodón, delece ≥ 1 exonu u genů, kde je známým patogenním mechanismem ztráta funkce (LOF – angl. loss of function).
Patogenní silný (Pathogenic Strong)	
PS1	Zjištěná nukleotidová záměna vede k aminokyselinové změně, která byla již dříve popsána jako patogenní.
PS2	<i>De novo</i> mutace detekována u probanda bez výskytu onemocnění v rodinné anamnéze, varianta vyloučena u obou rodičů (rodičovství potvrzeno).
PS3	Dobře popsané <i>in vitro</i> nebo <i>in vivo</i> funkční studie dokládají škodlivý dopad na gen nebo genový produkt.
PS4	Zastoupení varianty ve skupině nemocných osob je signifikantně vyšší v porovnání se skupinou kontrol.
PP1	Vysoce početná kosegregace varianty u postižených v rodině v genu, u kterého jsou známy patogenní varianty způsobující dané onemocnění.
Patogenní mírný (Pathogenic Moderate)	
PM1	Varianta je lokalizována v oblasti s častým výskytem mutací nebo v dobře popsané funkční doméně bez benigních variant.
PM2	Varianta se nevyskytuje v gnomAD populační databázi (u recesivních onemocnění ve velmi nízké frekvenci).
PM3	Varianty detekované <i>in trans</i> se známou patogenní variantou u recesivních onemocnění.
PM4	Vlivem delece/inzerce v nerepetitivní oblasti zachovávající čtecí rámeček nebo stop-loss varianty dojde ke změně délky proteinu.

PM5	Nová záměna na aminokyselinové úrovni v místě, kde byla již dříve popsána jiná patogenní varianta.
PM6	Predikovaná <i>de novo</i> varianta bez ověření paternity a maternity u rodičů.
PP1	Středně početná kosegregace varianty s onemocněním u postižených v rodině v genu, u kterého jsou známe patogenní varianty způsobující dané onemocnění.
Patogenní podpůrný (Pathogenic Supporting)	
PP1	Málo početná kosegregace varianty s onemocněním u postižených v rodině v genu, u kterého jsou známe patogenní varianty způsobující dané onemocnění.
PP2	Varianta způsobující aminokyselinovou záměnu v genu, u kterého je tento typ záměn popsán jako častý mechanismus vzniku onemocnění a u kterého se benigní varianty tohoto typu vyskytují jen zřídka.
PP3	Několik predikčních algoritmů <i>in silico</i> předpovídá zásadní vliv varianty na funkci genu nebo proteinu (z hlediska konzervace, evoluce, vlivu sestřihu na mRNA).
PP4	Fenotyp pacienta nebo rodinná anamnéza jsou vysoce specifické pro onemocnění způsobené jedním genem.
Benigní podpůrný (Benign Supporting)	
BP1	Varianty způsobující záměnu aminokyselin v genu, kde jsou jako patogenní popisovány primárně nonsense varianty a varianty měnící čtecí rámeček.
BP2	Varianta byla nalezena <i>in trans</i> s patogenní variantou v genu pro plně penetrantní dominantní onemocnění a/nebo detekována <i>in cis</i> s patogenní variantou bez žádného dědičného vzoru.
BP3	Jedná se o delecii/inzerci v repetitivní oblasti bez známé funkce.
BP4	Několik predikčních algoritmů <i>in silico</i> nepředpovídá zásadní vliv varianty na funkci genu nebo proteinu (z hlediska konzervace, evoluce, vlivu sestřihu na mRNA).
BP5	Varianta byla nalezena u onemocnění s možnou alternativní molekulární příčinou.
BP7	Jedná se o synonymní (tichou) variantu, která podle počítačových prediktivních programů nemá efekt na kanonickou sestřihovou sekvenci, nevzniká díky ní nové sestřihové místo a daný nukleotid není vysoce konzervovaný.
Benigní silný (Benign Strong)	
BS1	Alelická frekvence je vyšší než očekávaná frekvence pro dané onemocnění.
BS2	Varianta byla nalezena u zdravého dospělého jedince v homozygotním stavu pro recesivní, v heterozygotním stavu pro dominantní nebo v hemizygotním stavu pro X-vázané onemocnění – platí pro plně penetrantní onemocnění s časnou manifestací.
BS3	Dobře popsané <i>in vitro</i> nebo <i>in vivo</i> funkční studie nedokládají žádný škodlivý efekt.
BS4	Chybí segregace varianty s nemocnými členy rodiny.

Při analýze frekvencí vybraných variant nalezených u Romů byly kromě databáze gnomAD dále také využity databáze ALFA (Phan *et al*, 2020), shromažďující celogenomová data 12 majoritních populací, přičemž z každé populace bylo vybráno a analyzováno 1000 náhodných jedinců, databáze TOPMED, která obsahuje celogenomová data 53 831 jedinců z celého světa (Taliun *et al*, 2021) a databáze NCMG obsahující dohromady 1 055 vzorků mužů a žen českého původu, z nichž 483 jedinců představuje selektovanou kontrolní populaci starší 70 let bez závažných onemocnění (*Národní centrum lékařské genomiky*, 2019).

3.8 Navržení primerů

Pro ověření přítomnosti patogenních variant nalezených analýzou dat celoexomového či celogenomového sekvenování byly navrženy specifické oligonukleotidové primery za použití volně dostupných webových programů Primer3 Tool (Untergasser *et al*, 2012) a OligoAnalyzer Tool (IDT, Coralville, Iowa, USA) a to tak, aby jednotlivé primery splňovaly následující podmínky:

- délka primeru: 20–24 bp;
- GC poměr: 45–55 %;
- teplota tání: 56–64 °C
- hodnota Maximum Delta G: nižší než –10,00 kcal/mol.

Hodnota Maximum Delta G je číselná hodnota (kcal/mol) udávající, jaká je volná energie primerů pro vznik homodimerních nebo heterodimerních struktur na základě primární sekvence primeru či primerového páru. Hodnota je vypočítána pomocí nejdelšího úseku komplementárních bází a případných přídatných bází mimo tento nejdelší úsek, které mohou podpořit vznik dimerních struktur.

Na zakázku vyrobené syntetické primery (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR) byly dodány ve vysušeném stavu a následně rozpuštěny a naředěny speciální redestilovanou vodou (ddH₂O) na koncentraci 0,1 mM.

Primery použité pro ověření přítomnosti nalezených variant v jednotlivých genech jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Sekvence primerů. F (angl. forward; přímý); R (angl. reverse; opačný).

Gen (referenční sekvence)	Pozice	Primer	Sekvence	Délka PCR produktu (bp)
<i>ABCA4</i> (NM_000350.3)	exon 43	F	CCCAGCTCACACACACTT	296
		R	GCCTCAGAGCCACCCTACTA	
<i>ADGRV1</i> (NM_032119.4)	exon 35	F	GCATGCTTGGGATTTGGGTT	300
		R	AGTGCTGCTTTTCTATCCCAT	
<i>CDH23</i> (NM_022124.6)	exon 10	F	TTGAACCAGCATTTCATTCAAG	303
		R	AGGGGCATCTCCTCTACCTG	
<i>CTDP1</i> (NM_004715.4)	intron 6	F	TCCTGACCTCGTGATCTTCC	820
		R	CCTGGGAGACAGTGGGAGTA	
<i>CYP1B1</i> (NM_000104.2)	exon 3	F	CCCTATGTCCTGGCCTTCCTT	271
		R	GCCTTTTGCCCACTGAAAAA	
<i>GJB2</i> (NM_004004.6)	exon 2	F	TGCTTGCTTACCCAGACTCA	359
		R	GACACGAAGATCAGCTGCAG	
<i>LCA5</i> (NM_181714.4)	exon 4	F	CGGACCCACTTGTGTTAGGA	820
		R	CCGTCAATCAACATGTAGCTCA	
<i>PRSS56</i> (NM_001195129.2)	exon 12	F	ACCGCAACCGTTCATTATTC	301
		R	CCTCGGACCCTCTACCTACC	
<i>RDH12</i> (NM_152443.3)	exon 5	F	GGCTGGGAGAATGAATGCTC	365
		R	GGGGTGGATGATGGTTCTGA	
<i>VPS13B</i> (NM_152564.5)	exon 31	F	CCTTTTTCATAGATGTGCCCCAGT	414
		R	CACCAACTATTCTGGCAATGAAGT	

3.9 Polymerázová řetězová reakce

Pro ověření přítomnosti patogenních variant byl metodou PCR namnožen produkt pro následné Sangerovo sekvenování. V laminárním boxu s vertikálním prouděním byly do 0,2ml tenkostěnných laboratorních mikrozkušavek připraveny PCR reakce o celkovém objemu 20 μ l (Tabulka 4).

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro jeden vzorek PCR.

Reagencie pro PCR reakci	Objem (μ l)
PCR Master Mix	10
PCR H ₂ O	7
DNA	2
Primer F + R	0,5 + 0,5

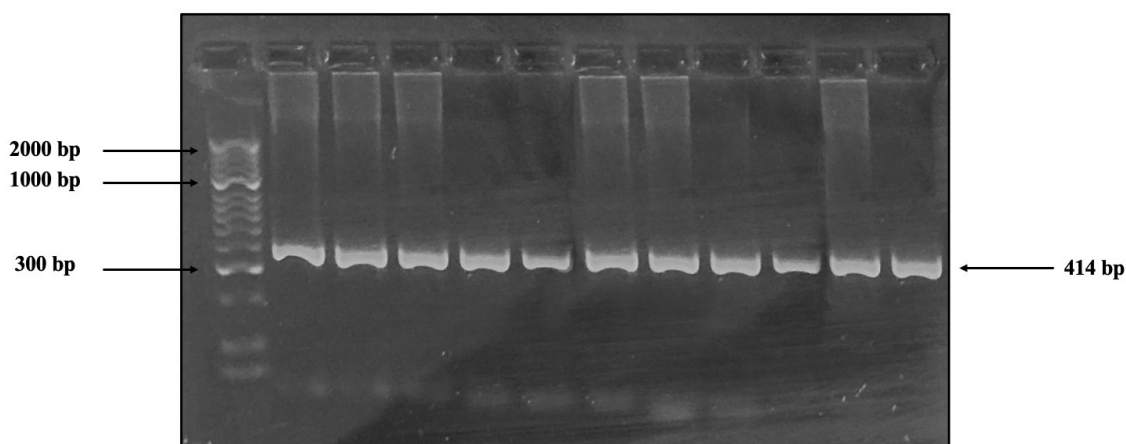
PCR reakce byly provedeny v termocykleru Biometra Tone 96 G (AnalytikJena, Jena, Germany). Jednotlivé sekvence byly optimalizovány s různými PCR mixy pro větší výtěžnost. Jednalo se o DreamTaq Green PCR Master Mix (2 \times), kat. číslo: K1081 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), Platinum SuperFi II Green PCR Master Mix, kat. číslo: 12369050 (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) a 2 \times RANGER Mix, kat. číslo: BIO-25025 (Bioline by Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio, USA). PCR reakce byly provedeny při následujícím programu o různých teplotách (Tabulka 5).

Tabulka 5: Program pro PCR reakci.

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace	95 °C	3 min	1x
Denaturace	95 °C	30 s	30 \times
Annealing	Teplota dle použitého primerového páru	30 s	
Elongace	72 °C	40 s	
Elongace	72 °C	5 s	1x
Chlazení	16 °C	∞	

3.10 Elektroforetické ověření PCR produktů

Kontrola produktů PCR reakce byla provedena na 1% agarózovém gelu obsahující 4 μl Gel Red, kat. číslo: 41003 (Biotium, Fremont, CA, USA) v 10 \times ředěném UltraPure 10 \times TBE pufaru, kat. číslo: 15581-044 (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) při napětí 100 V po dobu 30 minut. Na agarózový gel bylo nanášeno 5 μl markeru HyperLadder 50bp smíchaného s 1 μl 5 \times Loading Buffer, Blue, kat. číslo: BIO-33039 (Bioline by Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio, USA); obdobně bylo nanášeno 5 μl PCR reakce smíchaného s 1 μl 5 \times Loading Buffer, Blue. V případě použití PCR Master Mixu již obsahujícího barvičku, bylo nanášeno 5 μl PCR produktu. Horizontální elektroforéza byla provedena v elektroforetické soupravě Biometra Compact M (AnalytikJena, Jena, Germany). Příklad vizualizace fragmentů pomocí gelové elektroforézy zobrazuje Obr. 20.



Obrázek 20: Vizualizace fragmentů pomocí gelové elektroforézy. Příklad kontroly produktů PCR genu *VPS13B*, exonu 31 o velikost úseku 414 bp (angl. base pair; párů bází) v 1% agarózovém gelu.

3.11 Přechistění produktu

Do 0,2ml tenkostěnných laboratorních mikrozkušavek bylo odebráno 1–5 μl PCR produktu podle koncentrace odečtené z 1% agarózového gelu a doplněny do celkového objemu 5 μl ddH₂O. Pro purifikaci produktů PCR reakce byly ke vzorkům přidány 2 μl směsi ExoSAP-IT, kat. číslo: 78201.1.ML (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). V tomto kroku dochází k enzymatickému odstranění všech nevyužitých deoxynukleotidů a primerů a zároveň dochází také ke konzervaci PCR produktů pro následné sekvenování. Přechistění produktů PCR reakce bylo provedeno v termocykleru Biometra Tone 96 G (AnalytikJena, Jena, Germany) při následujícím programu (Tabulka 6):

Tabulka 6: Program přečištění produktu PCR reakce.

Krok	Teplota	Čas
Degradace	37 °C	15 min
Inaktivace	80 °C	15 min
Chlazení	16 °C	∞

3.12 Sangerova metoda sekvenování

Do každé zkumavky s přečištěným produktem PCR reakce byl přidán 20× ředěný přímý (forward, F) nebo reverzní (reverse, R) primer. Další zpracování sekvenační reakce a vlastní sekvenování proběhlo v sekvenační laboratoři Core facility Genomika, PřF UK, Biocev na jednom z následujících sekvenačních analyzátorů: čtyřkapilární 3130 Genetic Analyzer, šestnáctikapilární 3130xl Genetic Analyzer a čtyřadvacetikapilární 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

3.13 Analýza sekvencí

Sangerovou metodou získaná DNA sekvenační data ve formátu Chromatogram File (.seq) byla analyzována ve volně dostupném softwaru Chromas 2.6.6 (Technelysium, South Brisbane, Australia).

3.14 Analýza příbuznosti

Analýza příbuznosti 43 romských jedinců, kteří poskytli souhlas s výzkumem v Laboratoři pro studium vzácných nemocí KPDPM 1. LF UK a VFN v Praze byla provedena anonymně ve spolupráci s Laboratoří lidské genomové diverzity Univerzity Pompeu Fabra v Barceloně pomocí funkce IBD (angl. identity by descent) volně dostupného analytického softwaru PLINK verze 1.9 (Purcell *et al*, 2007). DNA byla genotypována pomocí Axiom Genome-Wide Human Origin Array (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Z analýzy byly vyjmuty markery, které se systematicky odchylovaly od Hardyho-Weinbergova zákona ($p < 0,001$), dále markery, jejichž frekvence minoritní alely byla nižší než 0,01, a zároveň ty, které chyběly u více než 5 % analyzovaných jedinců v souboru. Ze souboru byly dále vyjmuti jedinci, kteří vykazovali více než 85%

genomovou shodu a ti, u kterých chybělo více než 10 % markerů. Finální dataset obsahoval genotypy pro 176 541 variant.

Příbuzní 1. stupně (rodiče, potomci, sourozenci) spolu sdílí přibližně $\frac{1}{2}$ dědičné informace. Tomuto stupni příbuznosti odpovídá příbuzenské skóre $\pm 0,5$. Příbuzní 2. stupně (prarodiče, vnuci a vnučky, sourozenci rodičů, synovci a neteře) spolu sdílí přibližně $\frac{1}{4}$ dědičné informace, čemuž odpovídá příbuzenské skóre $\pm 0,25$. Mezi příbuzné 3. stupně se řadí praprarodiče, pravnuci a pravnučky, prastrýcové a pratety, bratrance a sestřence. Tito jedinci spolu sdílí přibližně 12,5 % dědičné informace, příbuzenské skóre je $\pm 0,125$. Vzdálenější příbuzní, tedy příbuzní 4. stupně, spolu sdílí 6,25 % dědičné informace. Tomuto odpovídá příbuzenské skóre $\pm 0,0625$ (*International Society of Genetic Genealogy*, ©2005–2022).

3.15 Výběr jedinců pro stanovení populačně specifických frekvencí

Pro stanovení frekvence vybraných patogenních variant byla použita anonymní celoexomová data jedinců romského původu z Národního centra lékařské genomiky (89 jedinců), Fakultní nemocnice v Motole (44 jedinců) a dalších 29 jedinců bylo vybráno z dat generovaných v rámci molekulárně genetických analýz rodin v Laboratoři pro studium vzácných nemocí KPDPM 1. LF UK a VFN v Praze. Kauzální varianta zjištěná v konkrétní rodině nebyla použita pro výpočet frekvence, tj. např. u dystrofie sítnice na podkladě homozygotní varianty mohly být jako kontroly zařazeni oba rodiče, přičemž bylo předpokládáno, že mohou být náhodní nositelé všech sledovaných variant kromě té, která byla zjištěna u jejich dítěte jako patogenní. V takovém případě nebyly tyto jejich alely započítány do celkového počtu. Pro výpočet frekvencí variant nebyli zařazeni jedinci, jejichž stupeň příbuznosti byl bližší nebo roven 3. stupni příbuzenského vztahu dle analýzy popsané v Kapitole 3.14.

3.16 Výpočet frekvence minoritní alely

Frekvence minoritní alely (MAF – angl. minor allele frequency) v romské populaci žijící v ČR byly vypočítány tak, že počet mutovaných alel byl vydělen počtem všech alel v souboru (Charames *et al*, 2021). Počet mutovaných alel byl zjišťován manuálně prohlížením sekvenačních dat pomocí softwaru IGV (Robinson *et al*, 2011). Mezi mutované alely byly zařazeny alely s minimálním pokrytím 10 čtení, přičemž za mutované alely v heterozygotním stavu byly považovány všechny alely se zastoupením záměny v 30–70 % z nich.

V případě, že u daného jedince nebylo provedeno celoexomové či celogenomové sekvenování nebo byl daný úsek nedostatečně pokryt, bylo provedeno přímé sekvenování Sangerovou metodou a přítomnost mutované alely byla odečtena ze sekvenačních dat, obdobným způsobem jako v Kapitole 3.13, pomocí volně dostupného programu Chromas 2.6.6.

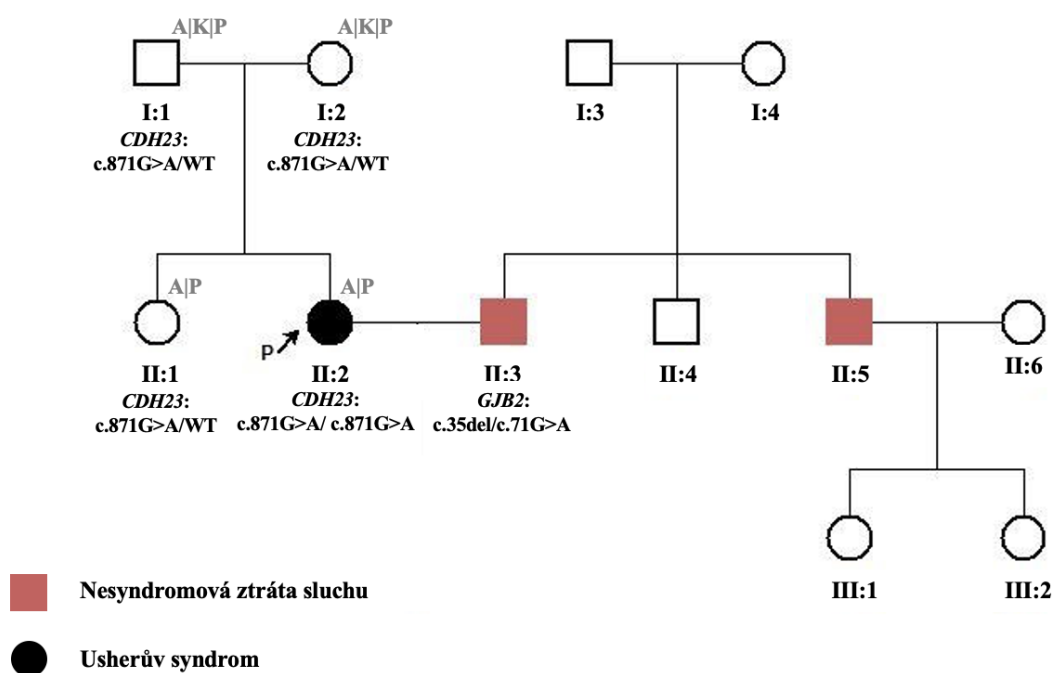
4 Výsledky

4.1 Molekulárně genetická analýza

V rámci diplomové práce bylo v Laboratoři pro studium vzácných nemocí KPDPM 1. LF UK a VFN v Praze molekulárně geneticky analyzováno s cílem zjistit kauzální mutace pro onemocnění postihující zrak anebo sluch 17 romských rodin o 43 jedincích, přičemž u 5 probandů nebyli při zpracování této práce prozatím vyšetřeni příbuzní jedinci.

4.1.1 Rodina 1 – Usherův syndrom a nesyndromová ztráta sluchu

DNA probandky (II:2, Obr. 21) s projevy Usherova syndromu byla analyzována pomocí celoexomového sekvenování a následně byly cíleně vyhledávány varianty v genech asociovaných s tímto syndromem.



Obrázek 21: Rodokmen Rodiny 1. WT (angl. wild type; divoká alela).

U probandky byla nalezena dříve popsaná kauzální varianta NM_022124.6:c.871G>A p.(Gly291Arg) v exonu 10 genu *CDH23* (Aparisi *et al*, 2014) v homozygotním stavu. U všech analyzovaných nepostížených členů rodiny byla prokázána přítomnost této varianty v heterozygotním stavu. Tato varianta byla dříve popsána v souvislosti s Usherovým syndromem v jedné španělské a jedné alžírské rodině (Aparisi *et al*, 2014; Abdi *et al*, 2016).

Tato varianta je klasifikována jako patogenní na základě následujících ACMG-AMP kritérií: PS4, PM2, PM3, PP3 a PP4. *In silico* hodnocení této missense varianty pomocí predikčních programů je rozepsáno v Tabulce 7.

Tabulka 7: *In silico* hodnocení varianty NM_022124.6:c.871G>A v genu *CDH23* pomocí predikčních programů.

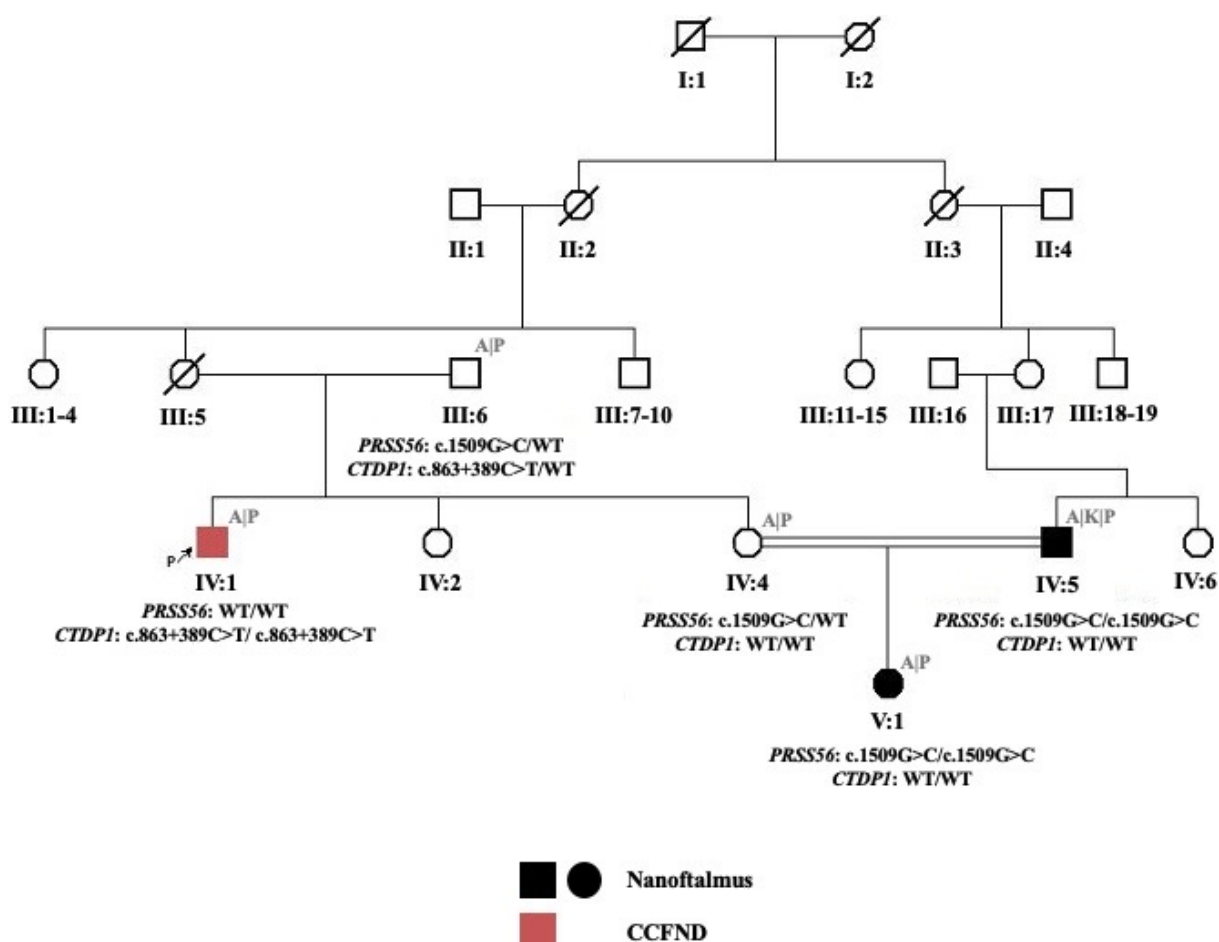
Revel	Varity	SIFT	PolyPhen2
Patogenní	Patogenní	Benigní	Patogenní
MutationTaster	FATHMM	DANN	Varsome
Patogenní	Nejasný význam	Patogenní	Pravděpodobně patogenní

U manžela probandky, který je také romského původu, byla v externí diagnostické laboratoři prokázána přítomnost dvou již dříve reportovaných kauzálních variant v genu *GJB2* (NM_004004.6), způsobujících nesyndromovou ztrátu sluchu: c.35del p.(Gly12ValfsTer2) a c.71G>A p.(Trp24Ter) obě v exonu 2 v pozici *in trans* (Zelante *et al*, 1997; Kelsell *et al*, 1997). Nonsense varianta c.35del je klasifikována jako patogenní na základě následujících ACMG-AMP kritérií: PVS1, PS3, PS4, PM2, PM3 a PP4. Nonsense varianta c.71G>A je klasifikována jako patogenní na základě těchto ACMG-AMP kritérií: PVS1, PS3, PS4, PM2, PM3 a PP4.

Při analýze příbuznosti pomocí softwaru PLINK nebyl prokázán příbuzenský vztah rodičů probandky.

4.1.2 Rodina 2 – Syndrom kongenitální katarakty, faciálního dysmorfismu a demyelinizační neuropatie a nanofthalmus

Rodina se známým příbuzenským sňatkem (Obr. 22) s projevy dvou vzácných dědičných onemocnění: nanofthalmus a CCFND, byla analyzována v Laboratoři pro studium vzácných nemocí KPDPM 1. LF UK a VFN v Praze a publikována před zahájením této diplomové práce (Ďudřáková *et al*, 2020).



Obrázek 22: Rodokmen Rodiny 2. CCFND (angl. congenital cataract, facial dysmorphism and neuropathy; syndrom kongenitální katarakty, faciálního dysmorfismu a demyelinizační neuropatie); WT (angl. wild type; divoká alela).

U probanda byla nalezena kauzální varianta NM_004715.4:c.863+389C>T v intronu 6 genu *CTDPI* v homozygotním stavu (Varon *et al*, 2003). Jedná se o variantu specifickou pro romskou populaci klasifikovanou jako patogenní na základě těchto ACMG-AMP kritérií: PS3, PS4, PM2, PM3, PP4.

U postiženého manžela sestry probanda, který je zároveň také bratrancem druhého stupně, a jejich dcery byla nalezena kauzální pravděpodobně patogenní varianta

NM_001195129.2:c.1509G>C p.(Met503Ile) v exonu 12 genu *PRSS56* v homozygotním stavu (Ďudřáková *et al*, 2020). Tato varianta je klasifikována jako pravděpodobně patogenní na základě těchto ACMG-AMP kritérií: PM2, PP1, PP3, a PP4. *In silico* hodnocení této missense varianty pomocí predikčních programů je rozepsáno v Tabulce 8.

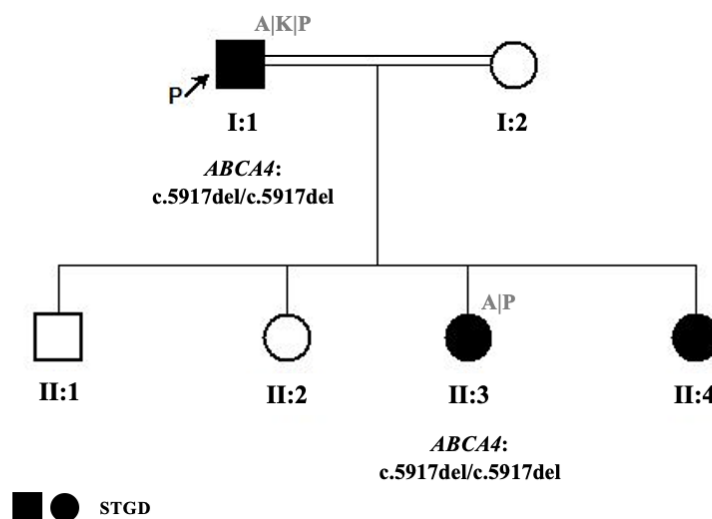
Tabulka 8: *In silico* hodnocení varianty NM_001195129.2: c.1509G>C v genu *PRSS56* pomocí predikčních programů.

Revel	Varity	SIFT	PolyPhen2
-	Patogenní	-	Patogenní
MutationTaster	FATHMM	DANN	Varsome
-	-	Nejasný význam	Nejasný význam

Při analýze softwarem PLINK byl prokázán pokrevný vztah mezi členy IV:4 a IV:5 s příbuzenským skóre 0,1027. Při analýze byla dále zjištěna příbuznost této rodiny s Rodinou 12 (viz Kapitola 3.1.12). Software PLINK vyhodnotil vztah mezi otcem probanda a jedincem I:2 z Rodiny 12 jako příbuzenský vztah 4. stupně na základě příbuzenského skóre: 0,0769.

4.1.3 Rodina 3 – Stargardtova choroba

DNA probanda (I:1, Obr. 23) s projevy retinální dystrofie a jeho dcery byly analyzovány pomocí celoexomového sekvenování a následně byly cíleně vyhledávány varianty v genech panelu Retinal disorders (Version 4.20) pro retinální onemocnění zveřejněném na webu PanelApp (<https://panelapp.genomicsengland.co.uk/>). V rodině je znám pokrevný sňatek, proband je vzdáleným příbuzným (blíže nespecifikováno) matky své manželky.

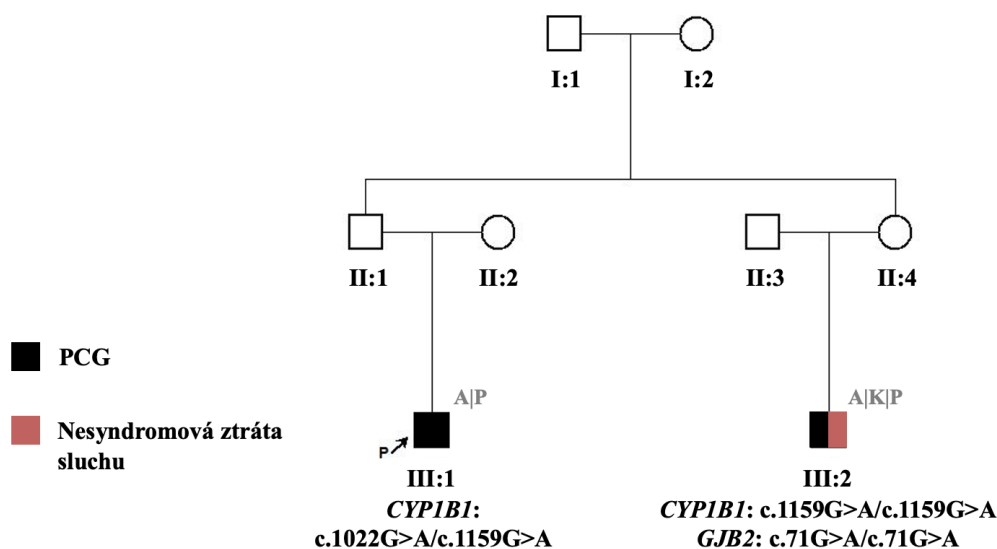


Obrázek 23: Rodokmen Rodiny 3. STGD (angl. Stargardt disease; Stargardtova choroba); WT (angl. wild type; divoká alela).

U obou byla nalezena v homozygotním stavu popsaná kauzální varianta NM_000350.3:c.5917del p.(Val1973Ter) v exonu 43 v genu *ABCA4* (Rivera *et al*, 2000). Tato varianta se vyskytla v souvislosti se STGD v řadě populací, např. německé (Rivera *et al*, 2000; Kitiratschky *et al*, 2008) nebo španělské (Riveiro-Alvarez *et al*, 2013), u Romů její výskyt zaznamenán nebyl. Zernant *et al*, 2014 však popisuje jednu rodinu indického původu, ve které byl proband složeným heterozygotem pro tuto variantu v pozici *in trans* s jinou patogenní variantou v tomto genu. Tato nonsense varianta, asociovaná s onemocněním STGD, je klasifikována jako patogenní na základě následujících ACMG-AMP kritérií: PVS1, PS4, PM2, PM3, PP1a PP4.

4.1.4 Rodina 4 – Primární kongenitální glaukom a nesyndromová ztráta sluchu

U bratrance probanda (III:2, Obr. 24) s duální diagnózou PCG a nesyndromovou ztrátou sluchu bylo provedeno celoexomové sekvenování a následně byly cíleně vyhledávány varianty v genech, jejichž patogenní varianty jsou asociovány s jeho onemocněními. U probanda (III:1) bylo provedeno přímé sekvenování Sangerovou metodou exonů 2 a 3 genu *CYP1B1*.



Obrázek 24: Rodokmen Rodiny 4. PCG (angl. primary congenital glaucoma; primární kongenitální glaukom); WT (angl. wild type; divoká alela).

U probanda byla nalezena varianta NM_000104.2:c.1022G>A p.(Trp341Ter) v exonu 2 a c.1159G>A p.(Glu387Lys) v exonu 3 genu *CYP1B1* v heterozygotním stavu. Pozice variant vůči sobě nemohla být určena pro absenci vzorků příbuzných 1. stupně.

Nonsense varianta c.1022G>A nebyla zatím popsána v odborné literatuře. Klasifikována je jako patogenní na základě následujících ACMG-AMP kritérií: PVS1, PM2, PP3, PP4. Varianta c.1159G>A je známá jako častá příčina PCG u Romů (Stoilov *et al*, 1998; Azmanov *et al*, 2011) a je klasifikována jako patogenní na základě následujících ACMG-AMP kritérií: PS4, PM2, PM3, PP1, PP3 a PP4. *In silico* hodnocení této missense varianty pomocí predikčních programů je rozepsáno v Tabulce 9.

Tabulka 9: *In silico* hodnocení varianty NM_000104.2:c.1159G>A v genu *CYP11B1* pomocí predikčních programů.

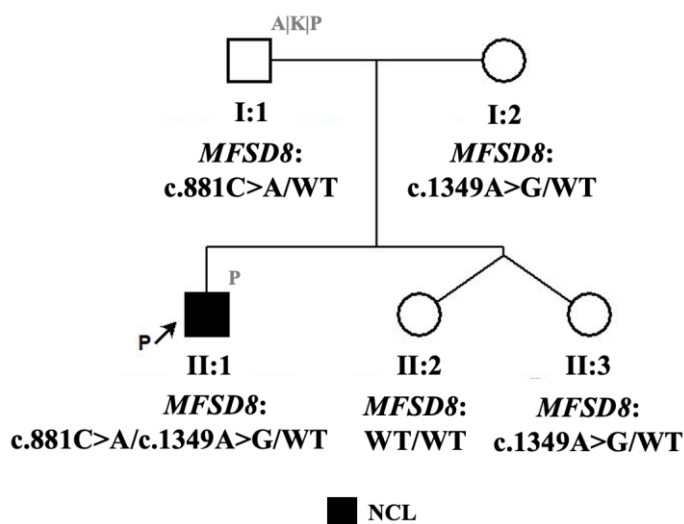
Revel	Varity	SIFT	PolyPhen2
Patogenní	Patogenní	-	Patogenní
MutationTaster	FATHMM	DANN	Varsome
Patogenní	-	Patogenní	Patogenní

U bratrance s duální diagnózou PCG a nesyndromové ztráty sluchu byla prokázána přítomnost kauzální patogenní varianty NM_000104.2:c.1159G>A v genu *CYP11B1* a NM_004004.6:c.71G>A p.(Trp24Ter) v genu *GJB2*, obě v homozygotním stavu. Již dříve popsaná nonsense varianta c.71G>A (Kelsell *et al*, 1997) je klasifikována jako patogenní na základě následujících ACMG-AMP kritérií: PVS1, PS3, PS4, PM2, PM3 a PP4.

Při analýze softwarem PLINK byla zjištěna příbuznost této rodiny s Rodinou 5 (viz Kapitola 3.1.5). Vztah mezi probandem a jedincem I:1 z Rodiny 5 byl vyhodnocen jako příbuzenský vztah 4. stupně za základě příbuzenského skóre 0,0839.

4.1.5 Rodina 5 – Neuronální ceroidní lipofuscinóza

Proband (II:1, Obr. 25) s projevy EOSRD byl vyšetřen v Centru klinické oční genetiky, Oční kliniky 1. LF UK a VFN v Praze. Vzhledem ke vzniku epilepsie nedlouho poté, vzniklo podezření na NCL, a proto byl proveden cílený screening genu *MFSD8* (NM_001371596.2) v Laboratoři DNA diagnostiky KPDPM 1. LF UK a VFN v Praze.



Obrázek 25: Rodokmen Rodiny 5. NCL (angl. neuronal ceroid lipofuscinosis; neuronální ceroidní lipofuscinóza); WT (angl. wild type; divoká alela).

Zjištěna byla jedna již dříve reportovaná kauzální varianta c.881C>A p.(Thr294Lys) v exonu 9 (Mole & Williams, 2001) a nová varianta c.1349A>G p.(Gln450Arg) v exonu 11 v pozici *in trans*. U nepostiženého otce byla prokázána přítomnost varianty c.881C>A v heterozygotním stavu, u nepostižené matky a jedné sestry byla nalezena varianta c.1349A>G, u druhé sestry nebyla prokázána přítomnost žádné z těchto variant.

Varianta c.881C>A je klasifikována jako patogenní na základě následujících ACMG-AMP kritérií: PS4, PM2, PM3, PP2, PP3 a PP4. *In silico* hodnocení této missense varianty pomocí predikčních programů je rozepsáno v Tabulce 10.

Tabulka 10: *In silico* hodnocení varianty NM_001371596.2:c.881C>A v genu *MFSD8* pomocí predikčních programů.

Revel	Varity	SIFT	PolyPhen2
Nejasný význam	Patogenní	Nejasný význam	Nejasný význam
MutationTaster	FATHMM	DANN	Varsome
Patogenní	Nejasný význam	Patogenní	Patogenní

Varianta c.1349A>G je klasifikována jako patogenní na základě následujících ACMG-AMP kritérií: PM2, PM3, PP2, PP3 a PP4. *In silico* hodnocení této missense varianty pomocí predikčních programů je rozepsáno v Tabulce 11.

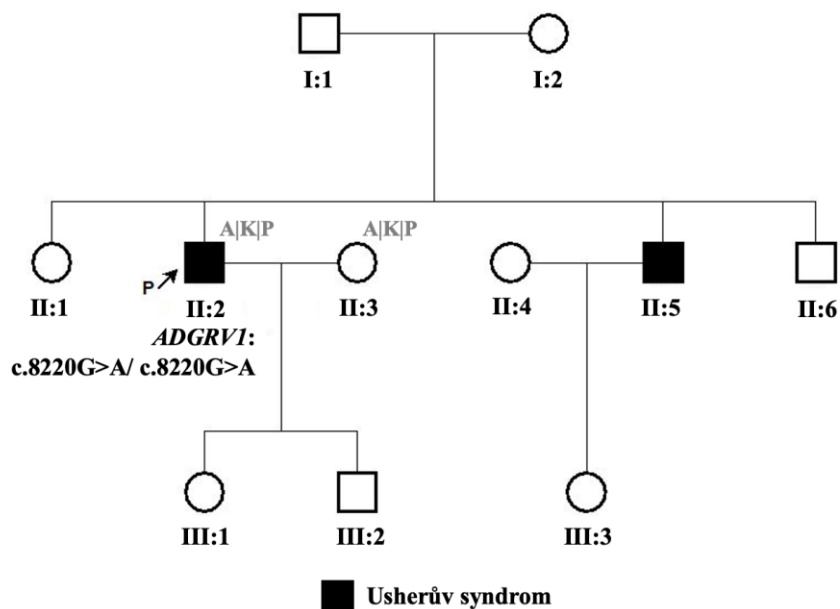
Tabulka 11: *In silico* hodnocení varianty NM_001371596.2:c.1349A>G v genu *MFSD8* pomocí predikčních programů.

Revel	Varity	SIFT	PolyPhen2
Patogenní	Patogenní	Patogenní	-
MutationTaster	FATHMM	DANN	Varsome
Patogenní	Nejasný význam	Patogenní	Pravděpodobně patogenní

Při analýze byla zjištěna příbuznost této rodiny s Rodinou 4 (viz Kapitola 3.1.4). Software PLINK vyhodnotil vztah mezi otcem probanda a jedincem III:1 Rodiny 4 jako příbuzenský vztah 4. stupně za základě příbuzenského skóre 0,0839.

4.1.6 Rodina 6 – Usherův syndrom

DNA probanda (II:2, Obr. 26) s projevy onemocnění Usherova syndromu byla analyzována pomocí celoexomového sekvenování a následně byly cíleně vyhledávány varianty v genech, jejichž patogenní varianty jsou asociovány s tímto onemocněním.



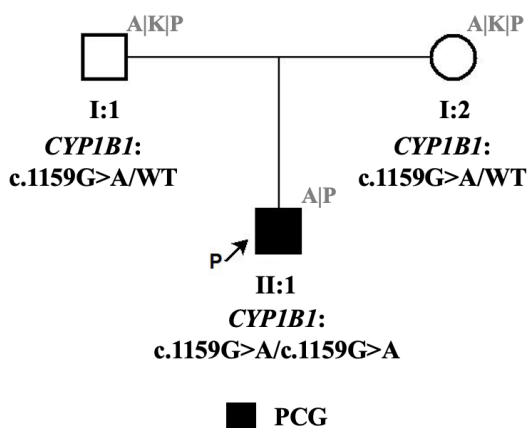
Obrázek 26: Rodokmen Rodiny 6. WT (angl. wild type; divoká alela).

U probanda byla nalezena nová, v odborné literatuře zatím nepopsaná, varianta NM_032119.4:c.8220G>A p.(Trp2740Ter) v exonu 35 genu *ADGRV1* v homozygotním stavu. Tato nonsense varianta je klasifikována jako patogenní na základě následujících ACMG-AMP kritérií: PVS1, PM2 a PP4.

Při analýze příbuznosti pomocí softwaru PLINK nebyl prokázán příbuzenský vztah probanda a jeho manželky.

4.1.7 Rodina 7 – Primární kongenitální glaukom

DNA probanda (II:1, Obr. 27) s projevy PCG byla podrobena celoxomovému sekvenování a následně byly cíleně vyhledávány varianty v genech, jejichž patogenní varianty jsou asociovány s tímto onemocněním.



Obrázek 27: Rodokmen Rodiny 7. PCG (angl. primary congenital glaucoma; primární kongenitální glaukom); WT (angl. wild type; divoká alela).

Nalezena byla kauzální varianta NM_000104.2:c.1159G>A p.(Glu387Lys) v exonu 3 genu *CYP1B1* v homozygotním stavu. Tato varianta je v romské populaci známá jako častá příčina PCG, klasifikována jako patogenní na základě následujících ACMG-AMP kritérií: PS4, PM2, PM3, PP1, PP3 a PP4. *In silico* hodnocení této missense varianty pomocí predikčních programů je rozepsáno v Tabulce 12.

Tabulka 12: *In silico* hodnocení varianty NM_000104.2:c.1159G>A v genu *CYP1B1* pomocí predikčních programů.

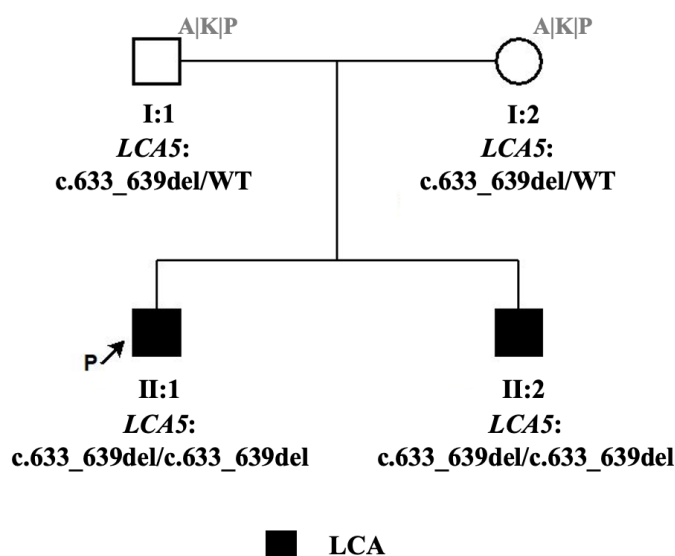
Revel	Varity	SIFT	PolyPhen2
Patogenní	Patogenní	-	Patogenní
MutationTaster	FATHMM	DANN	Varsome
Patogenní	-	Patogenní	Patogenní

Při analýze byla zjištěna příbuznost této rodiny s Rodinou 11 a Rodinou 14 (viz Kapitola 3.1.11 a Kapitola 3.1.14). Software PLINK vyhodnotil vztah mezi matkou probanda a druhou generací Rodiny 11 jako příbuzenský vztah 4. stupně s příbuzenským skóre: 0,0837 (matka probanda a II:1 z Rodiny 11) a 0,0983 (matka probanda a II:4 z Rodiny 11).

Vztah matky probanda k II:1 z Rodiny 14 byl vyhodnocen jako příbuzenský vztah 4. stupně s příbuzenským skóre: 0,0664. Nebyla prokázána příbuznost mezi rodiči probanda.

4.1.8 Rodina 8 – Leberova kongenitální amauroza

Proband (II:1, Obr. 28) a jeho bratr s projevy LCA byli vyšetřeni v externí diagnostické laboratoři, u obou sourozenců byla nalezena reportovaná kauzální varianta NM_181714.4:c.633_639del p.(Glu211AspfsTer13) v exonu 4 genu *LCA5* (Mackay *et al*, 2013) v homozygotním stavu.



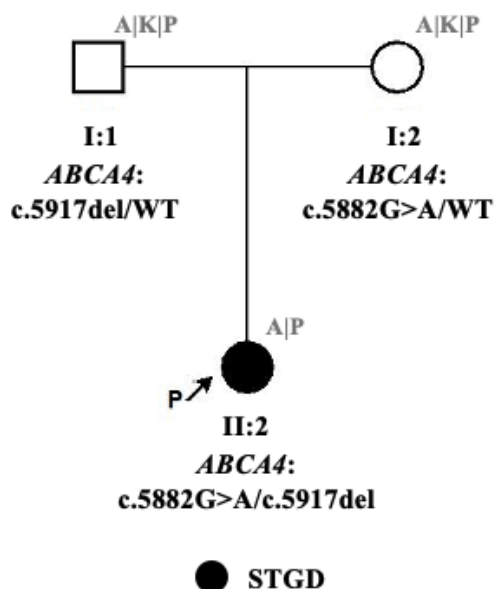
Obrázek 28: Rodokmen Rodiny 8. LCA (angl. Leber congenital amaurosis; Leberova kongenitální amauroza); WT (angl. wild type; divoká alela).

Pro účel této diplomové práce bylo provedeno celoexomové sekvenování rodičů, při kterém byla u obou prokázána přítomnost této varianty v heterozygotním stavu. Varianta c.633_639del je klasifikována jako patogenní na základě následujících ACMG-AMP kritérií: PVS1, PS4, PM2 a PP4.

Při analýze příbuznosti pomocí softwaru PLINK nebyl prokázán příbuzenský vztah rodičů postižených sourozenců.

4.1.9 Rodina 9 – Stargardtova choroba

DNA probandky (II:1, Obr. 29) s projevy retinální dystrofie a jejích rodičů byly analyzovány pomocí celoexomového sekvenování a následně byly cíleně vyhledávány varianty v genech panelu Retinal disorders (Version 4.20) pro retinální onemocnění zveřejněném na webu PanelApp (<https://panelapp.genomicsengland.co.uk/>).



Obrázek 29: Rodokmen Rodiny 9. STGD (angl. Stargardt disease; Stargardtova choroba); WT (angl. wild type; divoká alela).

U probandky byly nalezeny dvě reportované kauzální varianty v genu *ABCA4* (NM_000350.3): c.5882G>A p. (Gly1961Glu) v exonu 42 (Allikmets *et al*, 1997) a c.5917del p.(Val1973Ter) v exonu 43 v genu *ABCA4* (Rivera *et al*, 2000) v pozici *in trans*. U nepostížené matky byla prokázána přítomnost varianty c.5882G>A v heterozygotním stavu, u nepostíženého otce byla v heterozygotním stavu prokázána přítomnost varianty c.5917del.

Missense varianta c.5882G>A je klasifikována jako patogenní na základě následujících ACMG-AMP kritérií: PS4, PM2, PM3, PM5, PP2, PP3, a PP4. *In silico* hodnocení této missense varianty pomocí predikčních programů je rozepsáno v Tabulce 13.

Tabulka 13: *In silico* hodnocení varianty NM_000350.3:c.5882G>A v genu *ABCA4* pomocí predikčních programů.

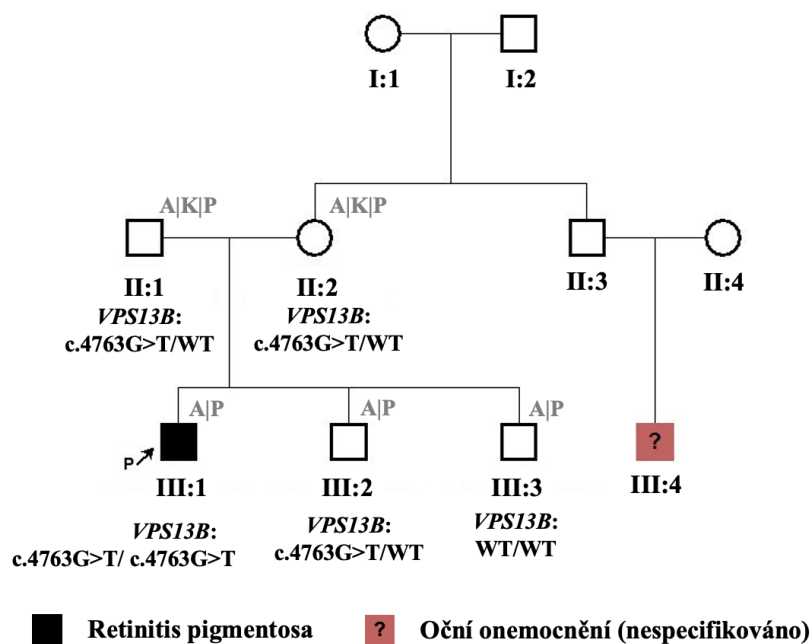
Revel	Varity	SIFT	PolyPhen2
Patogenní	-	Nejasný význam	Patogenní
MutationTaster	FATHMM	DANN	Varsome
Patogenní	Nejasný význam	Patogenní	Patogenní

Nonsense varianta c.5917del je klasifikována jako patogenní na základě následujících ACMG-AMP kritérií: PVS1, PS4, PM2, PM3, PP1a PP4. Stejná varianta byla nalezena u Rodiny 3 (viz Kapitola 3.1.3).

Při analýze příbuznosti pomocí softwaru PLINK nebyl prokázán příbuzenský vztah rodičů probandky.

4.1.10 Rodina 10 – Retinitis pigmentosa

Proband (III:1, Obr. 30) s projevy onemocnění RP byl nejprve vyšetřen v diagnostické laboratoři Agel v Novém Jičíně, testován byl pomocí NGS panelu očních genů, patogenní varianta nebyla detekována. Po negativním výsledku byla DNA probanda, jeho nepostižených rodičů a následně také jeho dvou nepostižených bratrů analyzována pomocí celoexomového sekvenování a následně byly cíleně vyhledávány varianty v genech, jejichž patogenní varianty jsou asociovány s onemocněním RP.



Obrázek 30: Rodokmen Rodiny 10. WT (angl. wild type; divoká alela).

U probanda byla nalezena varianta NM_152564.5:c.4763G>T p.(Gly1588Val) v exonu 31 genu *VPS13B* v homozygotním stavu. U nepostižených rodičů a jednoho nepostiženého bratra byla tato varianta nalezena v heterozygotním stavu, u druhého nepostiženého bratra nebyla tato varianta v genu *VPS13B* přítomna.

Tato missense varianta je klasifikována jako varianta neznámého významu na základě následujících ACMG-AMP kritérií: PM2 a PP3. *In silico* hodnocení této varianty pomocí predikčních programů je rozepsáno v Tabulce 14.

Tabulka 14: *In silico* hodnocení varianty NM_152564.5:c.4763G>T v genu *VPSI3B* pomocí predikčních programů.

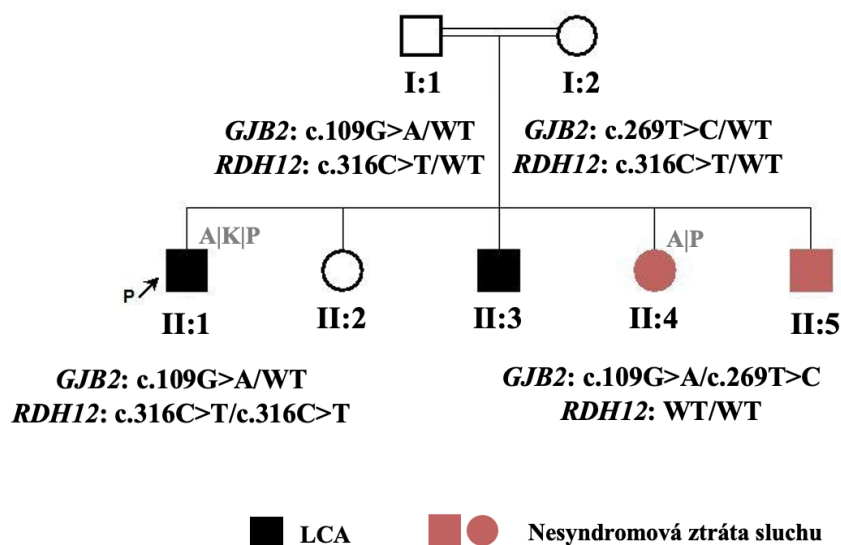
Revel	Varity	SIFT	PolyPhen2
Patogenní	-	Nejasný význam	Patogenní
MutationTaster	FATHMM	DANN	Varsome
Patogenní	Nejasný význam	Patogenní	Nejasný význam

V rámci komunity Franklin byl v Maďarsku nalezen případ pacienta romské původu se stejnou variantou v homozygotním stavu. Zatím se však nepodařilo zajistit bližší informace o přesných fenotypových projevech tohoto pacienta. V současnosti tedy není možné na základě dostupných informací určit, zda se jedná o kauzální variantu projevující se pouze jako onemocnění RP nebo se jedná o benigní variantu. Následujícím krokem, v objasnění příčiny onemocnění probanda, bude odeslání jeho vzorku DNA k celogenomovému sekvenování, které již nebude součástí této diplomové práce.

Při analýze příbuznosti pomocí softwarů PLINK nebyl prokázán příbuzenský vztah rodičů probanda.

4.1.11 Rodina 11 – Leberova kongenitální amauroza

Slyšící proband (II:1, Obr. 31) s projevy LCA a jeho neslyšící sestra (II:4) bez projevů očního onemocnění byly vyšetřeny v Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a Fakultní nemocnice v Motole. V rodině je znám pokrevný sňatek, rodiče jsou příbuznými 3. stupně (bratranec-sestřenice). Následně byly analyzovány pomocí celoexomového a celogenomového sekvenování.



Obrázek 31: Rodokmen Rodiny 11. LCA (angl. Leber congenital amaurosis; Leberova kongenitální amauroza); WT (angl. wild type; divoká alela).

U probanda byla nalezena reportovaná kauzální varianta NM_152443.3: c.316C>T p.(Arg106Ter) v exonu 5 genu *RDH12* (Mackay *et al*, 2011) v homozygotním stavu. Tato nonsense varianta je klasifikována jako patogenní na základě následujících ACMG-AMP kritérií: PVS1, PS4, PM2, PM3, PP1 a PP4.

U jeho neslyšící sestry (II:4) byly nalezeny dvě již reportované varianty v genu *GJB2* (NM_004004.6): c.109G>A p.(Val37Ile) a c.269T>C p.(Leu90Pro) obě v exonu 2 (Smith & Jones, 1998; Denoyelle *et al*, 1999) v pozici *in trans*.

Varianta c.109G>A je klasifikována jako patogenní na základě následujících ACMG-AMP kritérií: PS4, PM1, PM2, PM3, PM5, PP1, PP2, PP3 a PP4. *In silico* hodnocení této missense varianty pomocí predikčních programů je rozepsáno v Tabulce 15.

Tabulka 15: *In silico* hodnocení varianty NM_152443.3:c.109G>A v genu *GJB2* pomocí predikčních programů.

Revel	Varity	SIFT	PolyPhen2
Patogenní	-	Benigní	Benigní
MutationTaster	FATHMM	DANN	Varsome
Patogenní	Patogenní	Patogenní	Patogenní

Varianta c.269T>C je klasifikována jako patogenní na základě následujících ACMG-AMP kritérií: PM1, PM2, PM3, PP2, PP3 a PP4. *In silico* hodnocení této missense varianty pomocí predikčních programů je rozepsáno v Tabulce 16.

Tabulka 16: *In silico* hodnocení varianty NM_152443.3:c.269T>C v genu *GJB2* pomocí predikčních programů.

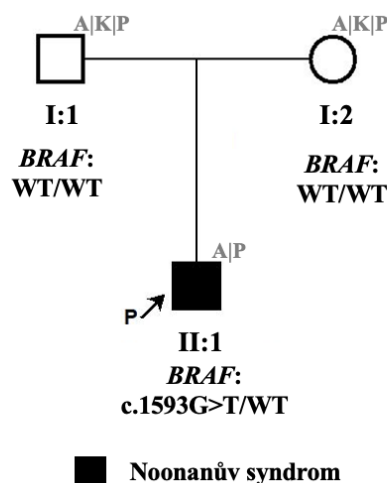
Revel	Varity	SIFT	PolyPhen2
Patogenní	-	Patogenní	Patogenní
MutationTaster	FATHMM	DANN	Varsome
Patogenní	Patogenní	Patogenní	Patogenní

U probanda byla prokázána přítomnost varianty c.109G>A v heterozygotním stavu, u neslyšící sestry nebyla prokázána přítomnost varianty v genu *RDH12*.

Při analýze byla zjištěna příbuznost této rodiny s Rodinou 7 (viz Kapitola 3.1.7). Software PLINK vyhodnotil vztah mezi probandem a jeho sestrou s I:2 Rodiny 7 jako příbuzenský vztah 4. stupně s příbuzenským skóre: 0,0837 (proband a I:2 Rodiny 7) a 0,0983 (sestra probanda a I:2 Rodiny 7).

4.1.12 Rodina 12 – Noonanův syndrom

DNA probanda (II:1, Obr. 32) a jeho rodičů byly analyzovány pomocí celoexomového sekvenování a následně byly cíleně vyhledávány varianty v genech, jejichž patogenní varianty jsou asociovány s onemocněním Noonanův syndrom.



Obrázek 32: Rodokmen Rodiny 12. WT (angl. wild type; divoká alela).

U probanda byla nalezena již reportovaná kauzální patogenní varianta NM_004333.5:c.1593G>T p.(Trp531Cys) v exonu 13 genu *BRAF* (Sarkozy *et al*, 2009) v heterozygotním stavu. Tato varianta nebyla nalezena u rodičů probanda, předpokládáme tedy vznik *de novo*. Varianta je klasifikována jako patogenní na základě následujících ACMG-AMP kritérií: PS1, PS2, PM1, PM2, PM5, PP2, PP3 a PP4. *In silico* hodnocení této missense varianty pomocí predikčních programů je rozepsáno v Tabulce 17.

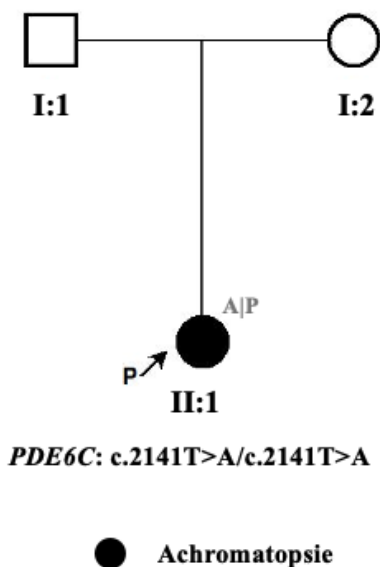
Tabulka 17: *In silico* hodnocení varianty NM_004333.5:c.1593G>T v genu *BRAF* pomocí predikčních programů.

Revel	Varity	SIFT	PolyPhen2
Patogenní	Patogenní	-	-
MutationTaster	FATHMM	DANN	Varsome
Patogenní	-	Patogenní	Patogenní

Při analýze byla dále zjištěna příbuznost této rodiny s Rodinou 2 (viz Kapitola 3.1.2). Software PLINK vyhodnotil vztah mezi matkou probanda a jedincem Rodiny 2 jako příbuzenský vztah 4. stupně na základě příbuzenského skóre 0,0769.

4.1.13 Rodina 13 – Achromatopsie

DNA probandky (II:1, Obr. 33) s projevy achromatopsie byla analyzována pomocí celoexomového sekvenování a následně byly cíleně vyhledávány varianty v genech, jejichž patogenní varianty jsou asociovány s tímto onemocněním.



Obrázek 33: Rodokmen Rodiny 13.

U pacientky byla nalezena varianta NM_006204.4:c.2141T>A p.(Ile714Asn) v exonu 17 genu *PDE6C* v homozygotním stavu (Weisschuh *et al*, 2018).

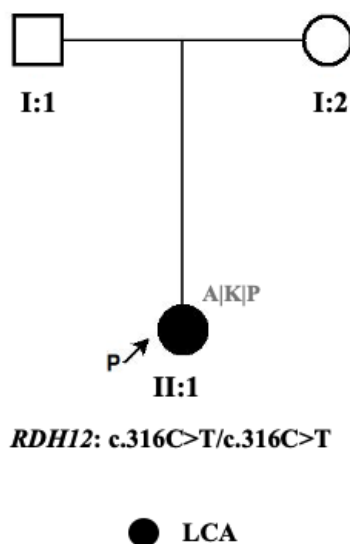
Tato varianta je klasifikována jako patogenní na základě následujících ACMG-AMP kritérií: PS4, PM2, PP3 a PP4. *In silico* hodnocení této missense varianty pomocí predikčních programů je rozepsáno v Tabulce 18.

Tabulka 18: *In silico* hodnocení varianty NM_006204.4:c.2141T>A v genu *PDE6C* pomocí predikčních programů.

Revel	Varity	SIFT	PolyPhen2
Patogenní	Patogenní	Patogenní	-
MutationTaster	FATHMM	DANN	Varsome
Patogenní	Nejasný význam	Patogenní	Pravděpodobně patogenní

4.1.14 Rodina 14 – Leberova kongenitální amauroza

DNA probandky (II:1, Obr. 34) s projevy LCA byla analyzována pomocí celoexomového sekvenování a následně byly cíleně vyhledávány varianty v genech, jejichž patogenní varianty jsou asociovány s tímto onemocněním.



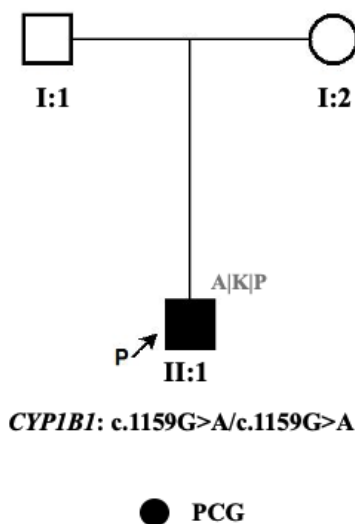
Obrázek 34: Rodokmen Rodiny 14. LCA (angl. Leber congenital amaurosis; Leberova kongenitální amauroza); WT (angl. wild type; divoká alela).

U probandky byla nalezena reportovaná kauzální varianta NM_152443.3:c.316C>T p.(Arg106Ter) v exonu 5 genu *RDH12* (Mackay *et al*, 2011) v homozygotním stavu. Tato nonsense varianta je klasifikována jako patogenní na základě následujících ACMG-AMP kritérií: PVS1, PS4, PM2, PM3, PP1 a PP4.

Při analýze byla zjištěna příbuznost této rodiny s Rodinou 7 (viz Kapitola 3.1.7). Software PLINK vyhodnotil vztah probandky k I:2 z Rodiny 7 byl vyhodnocen jako příbuzenský vztah 4. stupně s příbuzenským skóre: 0,0664.

4.1.15 Rodina 15 – Primární kongenitální glaukom

DNA probanda (II:1, Obr. 35) s projevy PCG byl vyšetřen pomocí celoxomového sekvenování a následně byly cíleně vyhledávány varianty v genech, jejichž patogenní varianty jsou asociovány s tímto onemocněním.



Obrázek 35: Rodokmen Rodiny 15. PCG (angl. primary congenital glaucoma; primární kongenitální glaukom); WT (angl. wild type; divoká alela).

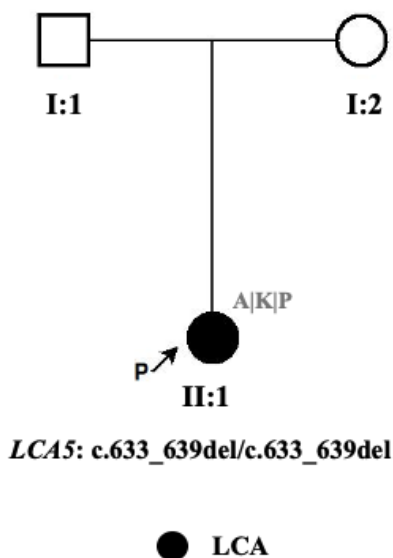
U probanda byla nalezena v databázi NCBI Clinvar již reportovaná kauzální patogenní varianta NM_000104.3:c.1159G>A p.(Glu387Lys) v exonu 3 genu *CYP1B1* (Stoilov *et al*, 1998) v homozygotním stavu. Tato varianta je klasifikována jako patogenní na základě následujících ACMG-AMP kritérií: PM2, PM3, PP1, PP3 a PP4. *In silico* hodnocení této missense varianty pomocí predikčních programů je rozepsáno v Tabulce 19.

Tabulka 19: *In silico* hodnocení varianty NM_000104.3:c.1159G>A v genu *CYP1B1* pomocí predikčních programů.

Revel	Varity	SIFT	PolyPhen2
Patogenní	Patogenní	-	Patogenní
MutationTaster	FATHMM	DANN	Varsome
Patogenní	-	Patogenní	Patogenní

4.1.16 Rodina 16 – Leberova kongenitální amauroza

DNA probandky (II:1, Obr. 36) s projevy LCA byla analyzována pomocí celoxomového sekvenování a následně byly cíleně vyhledávány varianty v genech, jejichž patogenní varianty jsou asociovány s tímto onemocněním.

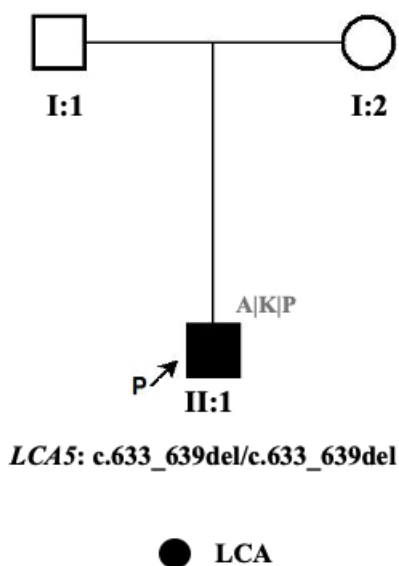


Obrázek 36: Rodokmen Rodiny 16. LCA (angl. Leber congenital amaurosis; Leberova kongenitální amauroza).

U probandky byla nalezena reportovaná kauzální patogenní varianta NM_181714.4:c.633_639del p.(Glu211AspfsTer13) v exonu 4 genu *LCA5* (Mackay *et al*, 2013) v homozygotním stavu. Tato nonsense varianta je klasifikována jako patogenní na základě následujících ACMG-AMP kritérií: PVS1, PS4, PM2 a PP4.

4.1.17 Rodina 17 – Leberova kongenitální amauroza

Vzorek DNA probanda (II:1, Obr. 37) s projevy LCA byl podroben celoexomovému sekvenování a následně byly cíleně vyhledávány varianty v genech, jejichž patogenní varianty jsou asociovány s tímto onemocněním.



Obrázek 37: Rodokmen Rodiny 17. LCA (angl. Leber congenital amaurosis; Leberova kongenitální amauroza).

U probanda byla nalezena reportovaná kauzální patogenní varianta NM_181714.4:c.633_639del p.(Glu211AspfsTer13) v exonu 4 genu *LCA5* (Mackay *et al*, 2013) v homozygotním stavu. Tato nonsense varianta je klasifikována jako patogenní na základě následujících ACMG-AMP kritérií: PVS1, PS4, PM2 a PP4.

4.2 Analýza frekvencí pro určení populačně specifických romských variant

V rámci diplomové práce bylo analyzováno 19 patogenních/pravděpodobně patogenních variant a 1 varianta neznámého významu v romském kontrolním souboru (Tabulka 20). Sledovaná frekvence výskytu náhodných přenašečů těchto variant v romské populaci byla následně porovnána s frekvencemi výskytu v selektované české populaci, frekvencemi výskytu v Evropě, Jižní Asii a v globálním měřítku s využitím dat z volně dostupných databází.

Tabulka 20: Analyzované varianty. CCFND (angl. congenital cataract, facial dysmorphism and neuropathy; syndrom kongenitální katarakty, faciálního dysmorfismu a demyelinizační neuropatie); PCG (angl. primary congenital glaucoma; primární kongenitální glaukom); LCA (angl. Leber congenital amaurosis; Leberova kongenitální amauróza); NCL (angl. neuronal ceroid lipofuscinosis; neuronální ceroidní lipofuscinóza).

Gen	cDNA	Protein	NM_	Onemocnění	OMIM
<i>ABCA4</i>	c.5917del	p.(Val1973Ter)	NM_000350.3	Stargardtova choroba typ 1	#248200
<i>ADGRV1</i>	c.8220G>A	p.(Trp2740Ter)	NM_032119.4	Usherův syndrom typ 2C	#605472
<i>CDH23</i>	c.871G>A	p.(Gly291Arg)	NM_022124.6	Usherův syndrom typ 1D	#601067
<i>CTDPI</i>	c.863+389C>T	-	NM_004715.4	CCFND	#604168
<i>CYP1B1</i>	c.1022G>A	p.(Trp341Ter)	NM_000104.2	PCG 3A	#231300
<i>CYP1B1</i>	c.1159G>A	p.(Glu387Lys)	NM_000104.3	PCG 3A	#231300
<i>GJB2</i>	c.35delG	p.(Gly12ValfsTer2)	NM_004004.6	Nesyndromová ztráta sluchu typ 1A	#220290
<i>GJB2</i>	c.71G>A	p.(Trp24Ter)	NM_004004.6	Nesyndromová ztráta sluchu typ 1A	#220290
<i>GJB2</i>	c.109G>A	p.(Val37Ile)	NM_004004.6	Nesyndromová ztráta sluchu typ 1A	#220290
<i>GJB2</i>	c.269T>C	p.(Leu90Pro)	NM_004004.6	Nesyndromová ztráta sluchu typ 1A	#220290
<i>LCA5</i>	c.633_639del	p.(Glu211AspfsTer13)	NM_181714.4	LCA typ 5	#604537
<i>LTBP2</i>	c.895C>T	p.(Arg299Ter)	NM_000428.3	PCG typ 3D	#613086
<i>MARVELD2</i>	c.1331+2T>C	-	NM_001038603.2	Nesyndromová ztráta sluchu typ 49	#610153
<i>MFSD8</i>	c.881C>A	p.(Thr294Lys)	NM_001371596.2	NCL typ 7	#610951
<i>MFSD8</i>	c.1349A>G	p.(Gln450Arg)	NM_001371596.2	NCL typ 7	#610951
<i>PDE6C</i>	c.2141T>A	p.(Ile714Asn)	NM_006204.4	Achromatopsie typ 5	#613093
<i>PRSS56</i>	c.1509G>C	p.(Met503Ile)	NM_001195129.2	Nanoftalmus	#613517
<i>RDH12</i>	c.316C>T	p.(Arg106Ter)	NM_152443.3	LCA typ 13	#612712
<i>RPE65</i>	c.1451G>T	p.(Gly484Val)	NM_000329.3	LCA typ 2	#204100
<i>VPS13B</i>	c.4763G>T	p.(Gly1588Val)	NM_152564.5	Cohenův syndrom	#216550

4.2.1 Varianta NM_000350.3 (*ABCA4*):c.5917del

Varianta NM_000350.3:c.5917del v genu *ABCA4* byla zařazena mezi sledované varianty na základě nálezů ve dvou vyšetřovaných nepříbuzných romských rodinách, Rodině 3 a Rodině 9 (viz Kapitoly 3.1.3 a 3.1.9). V romském kontrolním souboru byla tato varianta bez frekvence (0 alel z 308). Frekvence této varianty ve volně dostupných databázích jsou uvedeny v Tabulce 21.

Tabulka 21: Frekvence varianty NM_000350.3 (*ABCA4*):c.5917del

Kontrolní soubor	NCMG	gnomAD souhrnně	gnomAD Jižní Asie	gnomAD Evropa
0	0	0,00002792	0,0001634	0,00001766
ALFA souhrnně	ALFA Evropa	ALFA Jižní Asie	TOPMED	
0,00005	0	0	-	

4.2.2 Varianta NM_032119.4 (*ADGRV1*):c.8220G>A

Varianta NM_032119.4:c.8220G>A v genu *ADGRV1* byla zařazena mezi sledované varianty na základě nálezů v jedné z vyšetřovaných romských rodin, Rodině 6 (viz Kapitola 3.1.6). V romském kontrolním souboru byla tato varianta bez frekvence (0 alel z 310). Frekvence této varianty ve volně dostupných databázích jsou uvedeny v Tabulce 22.

Tabulka 22: Frekvence varianty NM_032119.4 (*ADGRV1*):c.8220G>A

Romská populace	NCMG	gnomAD souhrnně	gnomAD Jižní Asie	gnomAD Evropa
0	-	0,00001684	0,0001385	0
ALFA souhrnně	ALFA Evropa	ALFA Jižní Asie	TOPMED	
-	-	-	-	

4.2.3 Varianta NM_022124.6 (*CDH23*):c.871G>A

Varianta NM_022124.6:c.871G>A v genu *CDH23* byla zařazena mezi sledované varianty na základě nálezů v jedné z vyšetřovaných romských rodin, Rodině 1 (viz Kapitola 3.1.1). V romském kontrolním souboru byla tato varianta nalezena v heterozygotním stavu s frekvencí 0,00877193 (2 pozitivní alely z 228). Frekvence této varianty ve volně dostupných databázích jsou uvedeny v Tabulce 23.

Tabulka 23: Frekvence varianty NM_022124.6 (CDH23):c.871G>A

Kontrolní soubor	NCMG	gnomAD souhrnně	gnomAD Jižní Asie	gnomAD Evropa
0,00877193	-	0,000004012	0	0,000008848
ALFA souhrnně	ALFA Evropa		ALFA Jižní Asie	TOPMED
0	0		0	-

4.2.4 Varianta NM_004715.4 (CTDPI):c.863+389C>T

Varianta NM_004715.4:c.863+389C>T v genu *CTDPI* byla zařazena mezi sledované varianty na základě nálezu v jedné z vyšetřovaných romských rodin, Rodině 2 (viz Kapitola 3.1.2). Vzhledem k tomu, že se jedná o hlubokou intronovou variantu, byl počet jedinců v romském kontrolním souboru velmi nízký (0 alel z 27) z důvodu nedostatečného pokrytí celoexomových dat. V selektované české populaci a ve volně dostupných databázích byla tato varianta bez frekvence.

4.2.5 Varianta NM_000104.2 (CYP1B1):c.1022G>A

Varianta NM_000104.2:c.1022G>A v genu *CYP1B1* byla zařazena mezi sledované varianty na základě nálezu v jedné z vyšetřovaných romských rodin, Rodině 4 (viz Kapitola 3.1.4). V romském kontrolním souboru byla tato varianta bez frekvence (0 alel z 312). Frekvence této varianty ve volně dostupných databázích jsou uvedeny v Tabulce 24.

Tabulka 24: Frekvence varianty NM_000104.2 (CYP1B1):c.1022G>A

Kontrolní soubor	NCMG	gnomAD souhrnně	gnomAD Jižní Asie	gnomAD Evropa
0	-	-	-	-
ALFA souhrnně	ALFA Evropa		ALFA Jižní Asie	TOPMED
0	0		0	0,000008

4.2.6 Varianta NM_000104.2 (CYP1B1):c.1159G>A

Varianta NM_000104.2:c.1159G>A v genu *CYP1B1* byla zařazena mezi sledované varianty na základě nálezu ve třech vyšetřovaných romských rodinách, Rodině 4, Rodině 7 a Rodině 15 (viz Kapitola 3.1.4, 3.1.7 a 3.1.15). V romském kontrolním souboru byla tato varianta nalezena v heterozygotním stavu s frekvencí 0,006578947 (2 pozitivní alely z 304). Frekvence této varianty ve volně dostupných databázích jsou uvedeny v Tabulce 25.

Tabulka 25: Frekvence varianty NM_000104.2 (CYP1B1):c.1159G>A

Kontrolní soubor	NCMG	gnomAD souhrnně	gnomAD Jižní Asie	gnomAD Evropa
0,006578947	0,0010352	0,0002744	0	0,0004545
ALFA souhrnně	ALFA Evropa		ALFA Jižní Asie	TOPMED
0,000252	0,000265		0	0,000246

4.2.7 Varianta NM_004004.6 (GJB2):c.35del

Varianta NM_004004.6:c.35del v genu *GJB2* byla zařazena mezi sledované varianty na základě nálezu v jedné z vyšetřovaných romských rodin, Rodině 1 (viz Kapitola 3.1.1). V romském kontrolním souboru byla tato varianta bez frekvence (0 alel z 232). Frekvence této varianty ve volně dostupných databázích jsou uvedeny v Tabulce 26.

Tabulka 26: Frekvence varianty NM_004004.6 (GJB2):c.35del

Kontrolní soubor	NCMG	gnomAD souhrnně	gnomAD Jižní Asie	gnomAD Evropa
0	0,01271186	0,006188	0,0008167	0,009578
ALFA souhrnně	ALFA Evropa		ALFA Jižní Asie	TOPMED
0,00556	0,00556		0	-

4.2.8 Varianta NM_004004.6 (GJB2):c.71G>A

Varianta NM_004004.6:c.71G>A v genu *GJB2* byla zařazena mezi sledované varianty na základě nálezu ve dvou z vyšetřovaných romských rodin, Rodině 1 a Rodině 4 (viz Kapitola 3.1.1 a 3.1.4). V romském kontrolním souboru byla tato varianta nalezena v heterozygotním stavu s frekvencí 0,051612903 (16 pozitivních alel z 310). Frekvence této varianty ve volně dostupných databázích jsou uvedeny v Tabulce 27.

Tabulka 27: Frekvence varianty NM_004004.6 (GJB2):c.71G>A

Kontrolní soubor	NCMG	gnomAD souhrnně	gnomAD Jižní Asie	gnomAD Evropa
0,051612903	-	0,0005223	0,004377	0,00006262
ALFA souhrnně	ALFA Evropa		ALFA Jižní Asie	TOPMED
0,000044	0,00001		0,011	0,000023

4.2.9 Varianta NM_004004.6 (GJB2):c.109G>A

Varianta NM_004004.6:c.109G>A v genu *GJB2* byla zařazena mezi sledované varianty na základě nálezu v jedné z vyšetřovaných romských rodin, Rodině 11 (viz Kapitola 3.1.11). V romském kontrolním souboru byla tato varianta nalezena v heterozygotním stavu s frekvencí 0,00884956 (2 pozitivní alely z 262). Frekvence této varianty ve volně dostupných databázích jsou uvedeny v Tabulce 28.

Tabulka 28: Frekvence varianty NM_004004.6 (GJB2):c.109G>A

Kontrolní soubor	NCMG	gnomAD souhrnně	gnomAD Jižní Asie	gnomAD Evropa
0,00884956	-	0,007556	0,0003924	0,001393
ALFA souhrnně	ALFA Evropa		ALFA Jižní Asie	TOPMED
0,003860	0,001468		0	0,004515

4.2.10 Varianta NM_004004.6 (GJB2):c.269T>C

Varianta NM_004004.6:c.269T>C v genu *GJB2* byla zařazena mezi sledované varianty na základě nálezu v jedné z vyšetřovaných romských rodin, Rodině 11 (viz Kapitola 3.1.11). V romském kontrolním souboru byla tato varianta nalezena v heterozygotním stavu s frekvencí 0,0327434 (3 pozitivní alely z 262). Frekvence této varianty ve volně dostupných databázích jsou uvedeny v Tabulce 29.

Tabulka 29: Frekvence varianty NM_004004.6 (GJB2):c.269T>C

Kontrolní soubor	NCMG	gnomAD souhrnně	gnomAD Jižní Asie	gnomAD Evropa
0,01327434	0,00623701	0,0006297	0,00006533	0,001185
ALFA souhrnně	ALFA Evropa		ALFA Jižní Asie	TOPMED
0,00077	0,00090		0	0,000582

4.2.11 Varianta NM_181714.4 (LCA5):c.633_639del

Varianta NM_181714.4:c.633_639del v genu *LCA5* byla zařazena mezi sledované varianty na základě nálezu ve třech vyšetřovaných romských rodin, Rodině 8, Rodině 16 a Rodině 17 (viz Kapitola 3.1.8, 3.1.16 a 3.1.17). V romském kontrolním souboru byla tato varianta nalezena v heterozygotním stavu s frekvencí 0,006578947 (2 pozitivní alely z 304). Ve volně dostupných databázích a v selektované české populaci byla tato varianta bez frekvence (Tabulka 30).

Tabulka 30: Frekvence varianty NM_181714.4 (LCA5): c.633_639del

Kontrolní soubor	NCMG	gnomAD souhrnně	gnomAD Jižní Asie	gnomAD Evropa
0,006578947	-	-	-	-
ALFA souhrnně	ALFA Evropa		ALFA Jižní Asie	TOPMED
-	-		-	-

4.2.12 Varianta NM_000428.3 (LTBP2):c.895C>T

Varianta NM_000428.3:c.895C>T v genu *LTBP2* byla zařazena mezi sledované varianty na základě práce Azmanov *et al*, 2011. V romském kontrolním souboru byla tato varianta nalezena v heterozygotním stavu s frekvencí 0,003205128 (1 pozitivní alela z 312). Frekvence této varianty ve volně dostupných databázích jsou uvedeny v Tabulce 31.

Tabulka 31: Frekvence varianty NM_000428.3 (LTBP2):c.895C>T

Kontrolní soubor	NCMG	gnomAD souhrnně	gnomAD Jižní Asie	gnomAD Evropa
0,003205128	-	0,00002077	0	0,00003714
ALFA souhrnně	ALFA Evropa		ALFA Jižní Asie	TOPMED
0,000012	0,000014		0	0,000011

4.2.13 Varianta NM_002038603.2 (MARVELD2):c.1331+2T>C

Varianta NM_002038603.2:c.1331+2T>C v genu *MARVELD2* byla zařazena mezi sledované varianty na základě článku Šafka Brožková *et al*, 2011. V romském kontrolním souboru byla tato varianta nalezena v heterozygotním stavu s frekvencí 0,004310345 (1 pozitivní alela z 232). Frekvence této varianty ve volně dostupných databázích jsou uvedeny v Tabulce 32.

Tabulka 32: Frekvence varianty NM_002038603.2 (MARVELD2):c.1331+2T>C

Kontrolní soubor	NCMG	gnomAD souhrnně	gnomAD Jižní Asie	gnomAD Evropa
0,004310345	-	0,00003980	0,0001960	0,00002642
ALFA souhrnně	ALFA Evropa		ALFA Jižní Asie	TOPMED
0	0		0	-

4.2.14 Varianta NM_001371596.2 (MFSD8):c.881C>A

Varianta NM_001371596.2:c.881C>A v genu *MFSD8* byla zařazena mezi sledované varianty na základě nálezu v jedné z vyšetřovaných romských rodin, Rodině 5 (viz Kapitola 3.1.5). V romském kontrolním souboru byla tato varianta nalezena v heterozygotním stavu s frekvencí 0,009677419 (3 pozitivní alely z 310). Frekvence této varianty ve volně dostupných databázích jsou uvedeny v Tabulce 33.

Tabulka 33: Frekvence varianty NM_001371596.2 (MFSD8):c.881C>A

Kontrolní soubor	NCMG	gnomAD souhrnně	gnomAD Jižní Asie	gnomAD Evropa
0,009677419	0	0,000008018	0	0,000008838
ALFA souhrnně	ALFA Evropa		ALFA Jižní Asie	TOPMED
0	0		0	0,000011

4.2.15 Varianta NM_001371596.2 (MFSD8):c.1349A>G

Varianta NM_001371596.2:c.1349A>G v genu *MFSD8* byla zařazena mezi sledované varianty na základě nálezu v jedné z vyšetřovaných romských rodin, Rodině 5 (viz Kapitola 3.1.5). V romském kontrolním souboru byla tato varianta bez frekvence (0 alel z 312). Varianta nebyla přítomna ani v selektované české populaci a ani ve volně dostupných databázích.

4.2.16 Varianta NM_006204.4 (*PDE6C*):c.2141T>A

Varianta NM_006204.4:c.2141T>A v genu *PDE6C* byla zařazena mezi sledované varianty na základě nálezu u jedné z vyšetřovaných rodin, Rodiny 13 (viz Kapitola 3.1.13). V romském kontrolním souboru byla tato varianta nalezena v heterozygotním stavu s frekvencí 0,003225806 (1 pozitivní alela z 310). Frekvence této varianty ve volně dostupných databázích jsou uvedeny v Tabulce 34.

Tabulka 34: Frekvence varianty NM_006204.4 (*PDE6C*):c.2141T>A

Kontrolní soubor	NCMG	gnomAD souhrnně	gnomAD Jižní Asie	gnomAD Evropa
0,003225806	0	0,000003989	0	0,000008826
ALFA souhrnně	ALFA Evropa		ALFA Jižní Asie	TOPMED
-	-		-	-

4.2.17 Varianta NM_001195129.2 (*PRSS56*):c.1509G>C

Varianta NM_001195129.2:c.1509G>C v genu *PRSS56* byla zařazena mezi sledované varianty na základě nálezu v jedné z vyšetřovaných romských rodin, Rodině 2 (viz Kapitola 3.1.2). V romském kontrolním souboru byla tato varianta nalezena v heterozygotním stavu s frekvencí 0,006451613 (2 pozitivní alely z 310). Ve volně dostupných databázích a v selektované české populaci byla tato varianta bez frekvence (Tabulka 35).

Tabulka 35: Frekvence varianty NM_001195129.2 (*PRSS56*): c.1509G>C

Kontrolní soubor	NCMG	gnomAD souhrnně	gnomAD Jižní Asie	gnomAD Evropa
0,006451613	-	-	-	-
ALFA souhrnně	ALFA Evropa		ALFA Jižní Asie	TOPMED
-	-		-	-

4.2.18 Varianta NM_152443.3 (RDH12):c.316C>T

Varianta NM_152443.3:c.316C>T v genu *RDH12* byla zařazena mezi sledované varianty na základě nálezů ve dvou z vyšetřovaných romských rodin, Rodině 11 a Rodině 14 (viz Kapitola 3.1.11 a 3.1.14). V romském kontrolním souboru byla tato varianta nalezena v heterozygotním stavu s frekvencí 0,003246753 (1 pozitivní alela z 308). Frekvence této varianty ve volně dostupných databázích jsou uvedeny v Tabulce 36.

Tabulka 36: Frekvence varianty NM_152443.3 (RDH12):c.316C>T

Kontrolní soubor	NCMG	gnomAD souhrnně	gnomAD Jižní Asie	gnomAD Evropa
0,003246753	-	0,00001591	0,00006533	0,00001758
ALFA souhrnně	ALFA Evropa		ALFA Jižní Asie	TOPMED
0	0		0	0,000011

4.2.19 Varianta NM_000329.3 (RPE65):c.1451G>T

Varianta NM_000329.3:c.1451G>T v genu *RPE65* byla zařazena mezi sledované varianty na základě práce Skorczyk-Werner *et al*, 2020. V romském kontrolním souboru byla tato varianta nalezena v heterozygotním stavu s frekvencí 0,003205128 (1 pozitivní alela z 312). Frekvence této varianty ve volně dostupných databázích jsou uvedeny v Tabulce 37.

Tabulka 37: Frekvence varianty NM_000329.3 (RPE65):c.1451G>T

Kontrolní soubor	NCMG	gnomAD souhrnně	gnomAD Jižní Asie	gnomAD Evropa
0,00974026	-	0,00002799	-	0,00001801
ALFA souhrnně	ALFA Evropa		ALFA Jižní Asie	TOPMED
0,00003	0,00004		0	0,000008

4.2.20 Varianta NM_152564.5 (*VPS13B*):c.4763G>T

Varianta NM_152564.5:c.4763G>T v genu *VPS13B* byla zařazena mezi sledované varianty na základě nálezů v jedné z vyšetřovaných romských rodin, Rodině 10 (viz Kapitola 3.1.10). V romském kontrolním souboru byla tato varianta nalezena v heterozygotním stavu s frekvencí 0,00974026 (3 pozitivní alely z 308). Frekvence této varianty ve volně dostupných databázích jsou uvedeny v Tabulce 38.

Tabulka 38: Frekvence varianty NM_152564.5 (*VPS13B*):c.4763G>T

Kontrolní soubor	NCMG	gnomAD souhrnně	gnomAD Jižní Asie	gnomAD Evropa
0,00974026	-	0,00002799	0,0001635	0,000008845
ALFA souhrnně	ALFA Evropa		ALFA Jižní Asie	TOPMED
0,00003	0,00004		0	0,000008

5 Diskuze

Cílem této diplomové práce byla molekulárně genetická analýza jedinců romského etnika vyšetřených na Oční klinice 1. LF UK a VFN v Praze trpících různými genetickými, monogenně podmíněnými, onemocněními zraku, případně kombinovanými onemocněními s postižením sluchu. Následně byla stanovena frekvence výskytu nalezených anebo v literatuře popsaných variant v kontrolním souboru Romů a porovnána s frekvencemi výskytu v selektované české populaci, v Evropě, v Jižní Asii a v globálním měřítku s využitím dat z volně dostupných databází.

V rámci této diplomové práce bylo molekulárně geneticky analyzováno 17 romských rodin čítajících 43 jedinců, z nichž 21 trpělo poruchou zraku, sluchu nebo kombinovanou vadou. Kauzální varianty se podařilo nalézt u 16 rodin.

Celkem bylo detekováno 19 variant ve 13 genech, přičemž 17 bylo vyhodnoceno jako patogenních a jedna jako pravděpodobně patogenní. U jednoho probanda byla nalezena v homozygotním stavu pouze varianta nejasného významu. V odborné literatuře bylo již dříve popsáno 14 z těchto variant, přičemž 8 z nich bylo pozorováno v romské populaci. Tyto varianty jsou asociovány s 10 klinickými jednotkami, jednalo se o achromatopsii, CCFND, LCA, nanofthalmus, NCL, nesyndromovou ztrátu sluchu, Noonanův syndrom, PCG, STGD a Usherův syndrom.

U probandky z Rodiny 1 s Usherovým syndromem byla nalezena kauzální varianta NM_022124.6:c.871G>A p.(Gly291Arg) v exonu 10 genu *CDH23* (Aparisi *et al*, 2014) v homozygotním stavu. Tato varianta způsobuje na úrovni proteinu záměnu aminokyseliny glycin za arginin. Kadheriny jsou skupinou proteinů zajišťující adhezi buněk. Protein kadherin 23 sehrává klíčovou roli ve vývoji vláskových buněk a jejich stereocilií, dále zajišťuje vzájemné spojení sousedních stereocilií. Mutace v tomto genu způsobují rozpad těchto spojení, který vede k narušení soudržnosti buněk a tím i jejich správné funkce (Vanniya *et al*, 2018). V rámci sítnice přispívají kadheriny k morfogenezi fotoreceptorů, tvorbě nervových okruhů, adhezivním spojením vnější hematoretinální bariéry a celkové soudržnosti. Přesná funkce kadherinu 23 v sítnici zatím nebyla charakterizována (Yusuf *et al*, 2022).

U probanda z Rodiny 3 a jeho dcery se STGD typ 1 byla nalezena kauzální varianta NM_000350.3:c.5917del p.(Val1973Ter) v exonu 43 v genu *ABCA4* (Rivera *et al*, 2000) v homozygotním stavu, která způsobuje předčasné ukončení translace proteinu a ztrátu jeho funkce. Rodina ATP-vázajících kazetových transmembránových proteinů zajišťuje aktivní

transport různých látek skrze membránu za spotřeby energie v podobě ATP. Gen *ABCA4* kóduje protein zajišťující odstraňování toxických retinoidních látek z fotoreceptorů. Mutace v tomto genu zapříčiňují akumulaci odpadních látek, čímž dochází ke zmenšování a odumírání retinálního pigmentového epitelu nutného pro správnou funkci a přežití fotoreceptorů, které v důsledku nedostatku výživy a transportu kyslíku atrofují a odumírají společně s ním (Molday *et al*, 2022). Tato varianta byla v heterozygotním stavu v pozici *in trans* s variantou NM_000350.3:c.5882G>A p. (Gly1961Glu) v exonu 42 stejného genu (Allikmets *et al*, 1997), způsobující záměnu aminokyseliny glycin za kyselinu glutamovou v kodonu 1961, nalezena také u probandky Rodiny 9.

Patogenní varianta NM_000104.2:c.1159G>A p.(Glu387Lys) v exonu 3 genu *CYP1B1* byla nalezena u probanda s PCG z Rodiny 4 v homozygotním stavu. V důsledku této mutace dochází k aminokyselinové záměně kyseliny glutamové za lysin na pozici 387. kodonu. Gen *CYP1B1* kóduje polypeptid 1 cytochromu P450 rodiny 1, podrodiny B, jehož funkce v oku nebyla prozatím přesně objasněna (Amirmokhtari *et al*, 2021), ale na základě studie Libby *et al*, 2003 a Doshi *et al*, 2006 se předpokládá, že snížený nebo chybějící metabolismus klíčových endogenních substrátů tohoto enzymu nepříznivě ovlivňuje vývoj trabekulární sítě oka. V heterozygotním stavu spolu s variantou NM_000104.2:c.1022G>A p.(Trp341Ter) v exonu 2 stejného genu byla tato varianta nalezena u bratrance probanda. V homozygotním stavu byla tato varianta nalezena také u probanda Rodiny 7 a Rodiny 15.

Probanda z Rodiny 5 byl složeným heterozygotem pro kauzální, již dříve popsanou, variantu NM_001371596.2: c.881C>A p.(Thr294Lys) v exonu 9 (Mole & Williams, 2001) a novou variantu c.1349A>G p.(Gln450Arg) v exonu 11 genu *MFSD8*, kódující lysozomální transmembránový protein. Obě tyto varianty způsobují aminokyselinovou záměnu v tomto proteinu. Mutace v genu *MFSD8* způsobují NCL typ 7 na podkladě intracelulární akumulace autofluorescentního lipopigmentového materiálu v neuronech a v důsledku toho dochází k progresivní ztrátě vidění, zhoršujícím se mentálnímu a motorickému postižení, záchvatům a předčasnému úmrtí (Aldahmesh *et al*, 2009).

U probanda Rodiny 6 byla nalezena nová kauzální varianta NM_032119.4:c.8220G>A p.(Trp2740Ter) v exonu 35 genu *ADGRV1* v homozygotním stavu, která způsobuje předčasné ukončení translace proteinu a ztrátu jeho funkce. Gen *ADGRV1* kóduje protein Vlgr1 (angl. very large G-protein coupled receptor 1), spadající mezi receptory cytoplazmatických membrán. Tento protein interaguje s jinými proteiny, např. usheriny či kadheriny, a zajišťuje vláknité membránové spojení cilií vláskových buněk vnitřního ucha a fotoreceptorů na sítnici.

Obdobně jako u variant v genu *CDH23*, mutace v tomto genu způsobují narušení soudržnosti buněk a jejich správné funkce (Varela *et al*, 2023).

Patogenní mutace NM_181714.4:c.633_639del p.(Glu211AspfsTer13) v exonu 4 genu *LCA5* (Mackay *et al*, 2013) byla v homozygotním stavu detekována u probanda z Rodiny 8 a jeho bratra. Tato varianta způsobí posun čtecího rámce s následným začleněním 12 chybných aminokyselin a předčasného stop kodonu. *LCA5* gen kóduje protein lebercilin, který je exprimován v ciliích mezi vnějším a vnitřním segmentem fotoreceptorů (den Hollander *et al*, 2007). Ztráta funkce tohoto proteinu způsobuje dysregulaci maturace retinálního pigmentového epitelu a ciliární funkce (Lanfranco *et al*, 2018). Tato varianta byla v homozygotním stavu nalezena také u probandky Rodiny 16 a probanda Rodiny 17.

U probanda z Rodiny 10 se jako u jediného nepodařilo prozatím určit kauzální mutaci pro jeho onemocnění sítnice. Nalezena byla pouze varianta nejasného významu NM_152564.5:c.4763G>T p.(Gly1588Val) v exonu 31 genu *VPSI3B* v homozygotním stavu. Mutace v tomto genu způsobují Cohenův syndrom, což je multisystémové onemocnění, jehož projevy jsou retinální dystrofie, faciální dysmorfismus, mikrocefalie, mentální retardace a neutropenie (Duplomb *et al*, 2014). Proband však mimo projevy retinální dystrofie neměl žádné další projevy tohoto syndromu. Cohenův syndrom je fenotypově velmi variabilní onemocnění a jeho projevy mohou být rozdílné v závislosti na jednotlivých patogenních variantách (Douzgou & Petersen, 2011). Prozatím nebyl popsán žádný případ izolované RP na podkladě variant v genu *VPSI3B*. Pokud by se v budoucnosti s postupujícím výzkumem našli další pacienti s izolovanou RP, je možné, že se zjištěná varianta posune do kategorie pravděpodobně patogenní či dokonce patogenní.

U probanda Rodiny 11 byla nalezena kauzální varianta NM_152443.3: c.316C>T p.(Arg106Ter) v exonu 5 genu *RDH12* (Mackay *et al*, 2011) v homozygotním stavu. Tato mutace způsobuje předčasné ukončení translace proteinu a ztrátu jeho funkce. Gen *RDH12* kóduje enzym retinol dehydrogenázu, který je lokalizován ve vnitřním segmentu tyčinek a čípků. Tento protein plní funkci ochrany před akumulací odpadních látek. Ztrátou funkce tohoto enzymu dochází k akumulaci all-trans retinalu, v důsledku čehož dochází k makulární atrofii a ztrátě fotoreceptorů (Mackay *et al*, 2011). Tato varianta v homozygotním stavu byla nalezena i u probandky Rodiny 14.

U probanda Rodiny 12 byla zjištěna kauzální varianta NM_006204.4:c.2141T>A p.(Ile714Asn) v exonu 17 genu *PDE6C* v homozygotním stavu (Weisschuh *et al*, 2018). Tato

mutace vede k záměně aminokyseliny isoleucin za asparagin v 714. kodonu. Gen *PDE6C* kóduje katalytickou podjednotku alfa fosfodiesterázy čípků esenciální pro fototransdukční kaskádu. Patogenní varianty v tomto genu vedou k poruše fototransdukční kaskády čípků, což se projevuje jako barvoslepost a světloplachost (Weisschuh *et al*, 2018).

U manžela probandky z Rodiny 1, bratrance probanda z Rodiny 4 a sestry probanda z Rodiny 11 byly prokázány patogenní varianty v genu *GJB2* (NM_004004.6). Jednalo se o varianty c.35del p.(Gly12ValfsTer2), způsobující posun čtecího rámce s následným začleněním 1 chybné aminokyseliny a předčasného stop kodonu; c.71G>A p.(Trp24Ter), způsobující předčasné ukončení translace proteinu a ztrátu jeho funkce; c.109G>A p.(Val37Ile), způsobující záměnu aminokyseliny valin za isoleucin v kodonu 37 a c.269T>C p.(Leu90Pro) taktéž způsobující záměnu aminokyseliny leucin za prolin v 90. kodonu. Tento gen kóduje protein konexin 26, který umožňuje výměnu iontů a dalších látek mezi přiléhajícími buňkami vnitřního ucha, čímž dochází ke generování receptorového potenciálu vláskových buněk. Mutace v tomto genu způsobují akumulaci nebo abnormality konexinu 26, což má za následek funkční deficit a tedy různý stupeň nedoslýchavosti až po úplnou hluchotu (D'Andrea *et al*, 2002).

Ve spolupráci s Laboratoří lidské genomové diverzity Univerzity Pompeu Fabra v Barceloně byla provedena analýza příbuznosti 43 jedinců, která odhalila 4 případy možné příbuznosti mezi zdánlivě nepříbuznými rodinami. Jednalo se o příbuznost 4. stupně mezi Rodinou 2 a 12, Rodinou 4 a 5, Rodinou 7 a 11 a dále Rodinou 7 a 14. Vzhledem k vysoké míře endogamie romské populace lze hovořit pouze o pravděpodobné příbuznosti, neboť příbuzenské skóre může být zvýšené i v důsledku výrazně redukované genetické variability této populace.

Frekvence výskytu 16 kauzálních patogenních/pravděpodobně patogenních variant nalezených u pacientů, 3 variant sledovaných na základě zmínky v odborné literatuře a osobní komunikace s lékaři v ČR a na Slovensku a 1 varianty nejasného významu byly stanoveny v kontrolním souboru Romů o celkovém počtu 156 jedinců (312 alel). Je třeba ale podotknout, že pokrytí čtení sledovaných variant nedosahovalo v řadě případů prahové hodnoty a reálný počet alel k výpočtu frekvence byl nižší, proto je ve výsledcích vždy uveden počet pozitivních alel a jejich celkový počet. Ze sledovaných variant bylo 14 nalezeno v heterozygotním stavu alespoň u jednoho kontrolního jedince, 5 variant bylo bez frekvence, u hluboké intronové varianty v genu *CTDPI* byl počet kontrolních alel považován za příliš nízký k dosažení relevantního výsledku.

Varianta NM_022124.6:c.871G>A v genu *CDH23* byla v romském kontrolním souboru nalezena s frekvencí 0,00877193. V odborné literatuře byla popsána jako kauzální u jedné španělské a jedné alžírské rodiny (Aparisi *et al*, 2014; Abdi *et al*, 2016). Amellal & Michel, 2013 zmiňují, že v 19. století za doby francouzské okupace migrovali Španělé spolu s Romy na území Alžírsko. Na základě těchto informací lze uvažovat o této variantě jako o zakladatelské mutaci se vznikem na území Evropy.

Varianta NM_000104.2:c.1159G>A v genu *CYP11B1* byla v romském kontrolním souboru byla nalezena s frekvencí 0,006578947. Tato varianta je v této populaci známou zakladatelskou mutací. Na základě již dříve provedené analýzy haplotypů vznikla přibližně ve 14. století na území Balkánského poloostrova (Azmanov *et al*, 2011), což také potvrzuje přítomnost této mutace u obyvatelů Evropy, ale ne na území Jižní Asie.

Varianta NM_004004.6:c.71G>A v genu *GJB2* byla v romském kontrolním souboru nalezena s frekvencí 0,051612903. Tato varianta je další známou zakladatelskou mutací, která vznikla přibližně před 8000 lety (RamShankar *et al*, 2003), tedy ještě před migrací romské populace z Indie. Tuto skutečnost potvrzují frekvence mutace jak v populaci Evropy, tak v populaci Jižní Asie.

Varianta NM_004004.6:c.109G>A v genu *GJB2* byla v romském kontrolním souboru nalezena s frekvencí 0,00884956. Tato varianta byla popsána u slovenských Romů (Minárik *et al*, 2003), zároveň však byla nalezena i v řadě jiných populací, např. v populaci Japonska, Číny, Německa či Brazílie (Abe *et al*, 2000; Liu *et al*, 2002; Kupka *et al*, 2002, Batissoco *et al*, 2009). Na základě globálního výskytu této varianty lze vyhodnotit, že se nejedná o etnicky specifickou zakladatelskou mutaci. Výskyt této mutace v ČR je však vyšší v romském kontrolním souboru oproti selektované české populaci, kde tato varianta nebyla přítomna, což je s největší pravděpodobností způsobeno mírou endogamie.

Varianta NM_004004.6:c.269T>C v genu *GJB2* byla v romském kontrolním souboru nalezena s frekvencí 0,01327434. Obdobně byla také tato varianta popsána u slovenských Romů (Minárik *et al*, 2003), zároveň však i v řadě jiných populací, např. v populaci Argentiny či Koreji (Dalamón *et al*, 2005; Kim *et al*, 2015) a lze tedy vyhodnotit, že se nejedná o etnicky specifickou zakladatelskou mutaci. Výskyt této mutace v ČR je však 2× vyšší v romském kontrolním souboru oproti selektované české populaci, což je s největší pravděpodobností také způsobeno mírou endogamie této populace.

Varianta NM_181714.4:c.633_639del v genu *LCA5* měla v romském kontrolním souboru frekvenci 0,006578947. Ve volně dostupných databázích a v selektované české populaci byla tato varianta bez frekvence. Tato varianta byla již dříve popsána u jednoho romského probanda na Slovensku (Mackay *et al*, 2013). Na základě těchto skutečností lze o této variantě uvažovat jako o etnicky specifické zakladatelské mutaci, která s největší pravděpodobností vznikla v poměrně nedávné době na území ČR nebo Slovenska.

Varianta NM_000428.3:c.895C>T v genu *LTBP2* byla v romském kontrolním souboru nalezena s frekvencí 0,003205128. Tato varianta je známou zakladatelskou mutací, která na základě analýzy haplotypů vznikla přibližně před 1000 lety, tedy ještě před příchodem Romů na území Evropy. To také potvrzuje přítomnost této mutace ve volně dostupných databázích v populaci Evropy, ale ne na území Jižní Asie.

Varianta NM_002038603.2:c.1331+2T>C v genu *MARVELD2* byla v romském kontrolním souboru přítomna s frekvencí 0,004310345, tato varianta se vykytuje také v dalších evropských populacích a u obyvatel Jižní Asie. V odborné literatuře byla tato varianta popsána jako kauzální u českých, slovenských a maďarských Romů, rodiny pakistánského původu a u rodiny tureckého původu (Riazuddin *et al*, 2006; Šafka Brožková *et al*, 2011; Nayak *et al*, 2015; Mašindová *et al*, 2015; Atik *et al*, 2015; Schrauwen *et al*, 2019). Vzhledem k těmto skutečnostem lze předpokládat, že se jedná o etnicky specifickou zakladatelskou mutaci získanou od společného předka.

Varianta NM_001371596.2:c.881C>A v genu *MFSD8* byla v romském kontrolním souboru nalezena s frekvencí 0,009677419. Tato varianta je ve volně dostupných databázích přítomná také v populaci Jižní Asie. V odborné literatuře byla popsána u rodin tureckého původu a u Romů původem z ČR a Slovenska (Aiello *et al*, 2009; Kousi *et al*, 2009). Na základě těchto informací lze uvažovat o této variantě u Romů jako o populačně specifické.

Varianta NM_006204.4:c.2141T>A v genu *PDE6C* byla v romském kontrolním souboru nalezena s frekvencí 0,003225806. Tato varianta byla ve volně dostupných databázích přítomná i v populaci Evropy. V odborné literatuře byla tato varianta popsána jako kauzální v homozygotním stavu u tří nepříbuzných jedinců nespécifikovaného původu, přičemž bylo poukázáno i na možnost zakladatelské mutace (Weisschuh *et al*, 2018). Na základě dostupných informací však nelze říct, zda se jedná o etnicky specifickou zakladatelskou mutaci.

Varianta NM_001195129.2:c.1509G>C v genu *PRSS56* byla v romském kontrolním souboru přítomna s frekvencí 0,006451613. Ve volně dostupných databázích a v selektované české populaci nebyla přítomna. Tato varianta byla doposud popsána pouze u jedné romské rodiny. Na základě těchto informací lze uvažovat o této variantě jako o etnicky specifické zakladatelské mutaci s nedávným vznikem na území ČR.

Varianta NM_152443.3:c.316C>T v genu *RDH12* byla v romském kontrolním souboru nalezena s frekvencí 0,003246753. Tato varianta byla ve volně dostupných databázích přítomná v populaci Evropy s přibližně 180× nižší frekvencí a v populaci Jižní Asie s přibližně 50× nižší frekvencí. V odborné literatuře byla popsána u jednoho pacienta britského původu (Mackay *et al*, 2011). Na základě těchto informací nelze říct, zda se jedná o etnicky specifickou zakladatelskou mutaci. Objasnění, zda je tato varianta v ostatních populacích přenášena od společného předka, by vyžadovalo provedení haplotypové analýzy.

Varianta NM_000329.3:c.1451G>T v genu *RPE65* byla v romském kontrolním souboru nalezena s frekvencí 0,003205128. Tato varianta je přítomná i v populaci Evropy, nicméně s 540× nižší frekvencí. V odborné literatuře byla popsána u jedné rodiny romského původu s LCA v Polsku (Skorczyk-Werner *et al*, 2020) a dále byla zjištěna u více než 5 romských pacientů na Slovensku. Na základě těchto informací lze uvažovat o této variantě jako o etnicky specifické zakladatelské mutaci.

Bez frekvence v romském kontrolním souboru byly varianty NM_000350.3:c.5917del v genu *ABCA4*, NM_032119.4:c.8220G>A v genu *ADGRV1*, NM_004715.4:c.863+389C>T v genu *CTDPI*, NM_000104.2:c.1022G>A v genu *CYP11B1*, NM_004004.6:c.35del v genu *GJB2* a NM_001371596.2:c.1349A>G v genu *MFSD8*.

Varianta NM_004715.4:c.863+389C>T v genu *CTDPI* je známou zakladatelskou mutací, je třeba podotknout, že vzhledem k hluboké intronové poloze byl soubor kontrolních alel romských jedinců velmi nízký. V ostatních případech jde spíše o sporadický výskyt těchto variant v romské populaci.

Varianta nejasného významu NM_152564.5:c.4763G>T v genu *VPSI3B* byla zařazena mezi sledované varianty na základě nálezu v homozygotním stavu u probanda s RP. V romském kontrolním souboru byla tato varianta přítomna s frekvencí 0,00974026. Tato varianta byla ve volně dostupných databázích přítomná v populaci Evropy a Jižní Asie. Vzhledem k tomu, že se jedná o variantu nejasného významu, nelze se k riziku případného vzniku onemocnění vyjádřit.

Z výsledků analýz provedených v rámci této práce vyplývá, že romská populace na území ČR má oproti majoritní populaci zvýšené riziko vzniku následujících onemocnění: achromatopsie na podkladě varianty NM_006204.4:c.2141T>A v genu *PDE6C*, LCA typu 2, 5 a 13 na podkladě varianty NM_181714.4:c.633_639del v genu *LCA5*, NM_152443.3:c.316C>T v genu *RDH12* a NM_000329.3:c.1451G>T v genu *RPE65*, nanofthalmu na podkladě varianty NM_001195129.2:c.1509G>C v genu *PRSS56*, NCL typ 7 na podkladě varianty NM_001371596.2:c.881C>A v genu *MFSD8*, nesyndromová ztráta sluchu na podkladě variant v genu NM_004004.6:c.71G>A, c.109G>A a c.269T>C v genu *GJB2* a NM_002038603.2:c.1331+2T>C v genu *MARVELD2*, PCG na podkladě variant NM_000104.2:c.1159G>A v genu *CYP11B1* a NM_000428.3:c.895C>T v genu *LTBP2* a Usherova syndromu na podkladě varianty NM_022124.6:c.871G>A v genu *CDH23*.

Z onemocnění zraku a syndromových onemocnění postihujících i zrak představuje největší riziko NCL typ 7, LCA typ 2, PCG a dále pak Usherův syndrom nebo nanofthalmus. Z porovnání frekvencí patogenních alel pro nesyndromovou ztrátu sluchu vyplývá, že onemocnění sluchu je v romské populaci žijící v ČR přibližně 5–15x častější než onemocnění zraku.

6 Souhrn

Péče o pacienty s dědičnými onemocněními oka vyžaduje multidisciplinární přístup kombinující oční a genetickou diagnostiku, popřípadě i další specializační léčbu dle symptomů. Romská populace má řadu specifík včetně výskytu odlišného spektra monogenních onemocnění a jejich prevalence oproti populaci většinové.

Výzkum popsany v této práci pomohl objasnit faktory podílející se na etiopatogenezi onemocnění postihující zrak a sluch u pacientů romského původu žijících na území ČR, což je důležité pro časnou diagnostiku, vypracování efektivního screeningového postupu a zlepšení klinického poradenství. Práce vedla k propojení poznatků o fenotypu se znalostmi o příčině na molekulárně genetické úrovni. Vybraným pacientům umožnila definitivní diagnózu a tím i zpřesnění odhadu vývoje onemocnění a stanovení typu dědičnosti.

Znalost patogenních mutací dává naději na zapojení do klinických zkoušek testujících nové terapie nebo dokonce možnost podstoupit již oficiálně schválenou genovou terapii v případě nositelů bíalelických mutací v genu *RPE65* (*U.S. Food & Drug Administration*, 2017). Vzhledem k tomu, že u pacientů romského původu bylo zjištěno několik případů tohoto onemocnění, molekulárně genetická analýza tedy může vést i k cílené léčbě. Genetické testování by mělo být v případě očních vad v rámci vyšetřovacího procesu rutinně nabízeno.

Dalším navazujícím krokem bude zvýšení informovanosti o geneticky podmíněných onemocněních oka u Romů mezi odborníky i laickou veřejností, což v konečném důsledku umožní pomoc při plánování rodičovství a možnost navrhnout vhodná preventivní opatření, např. ve formě preimplantační genetické diagnostiky.

Závěrem lze konstatovat, že monogenně dědičná onemocnění vyskytující se v Romské populaci jsou stále nedostatečně definována a prozkoumána. Tato práce přispěla alespoň z části k jejich poznání.

7 Seznam použité literatury

- AbdelAleem, A., Haddad, N., Al-Ettribi, G., Crunk, A., & Elstouhy, A. (2023): Cohen syndrome and early-onset epileptic encephalopathy in male triplets: two disease-causing mutations in VPS13B and NAPB. *Neurogenetics*, 24(2), 103–112.
- Abdi, S., Bahloul, A., Behloul, A., Hardelin, J. P., Makrelouf, M., Boudjelida, K., Louha, M., Cheknene, A., Belouni, R., Rous, Y., Merad, Z., Selmane, D., Hasbelaoui, M., Bonnet, C., Zenati, A., & Petit, C. (2016): Diversity of the Genes Implicated in Algerian Patients Affected by Usher Syndrome. *PLoS one*, 11(9), e0161893.
- Abe, S., Usami, S., Shinkawa, H., Kelley, P. M., & Kimberling, W. J. (2000): Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. *Journal of medical genetics*, 37(1), 41–43.
- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S., & Sunyaev, S. R. (2010): A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods*, 7(4), 248–249.
- Allikmets, R., Shroyer, N. F., Singh, N., Seddon, J. M., Lewis, R. A., Bernstein, P. S., Peiffer, A., Zabriskie, N. A., Li, Y., Hutchinson, A., Dean, M., Lupski, J. R., & Leppert, M. (1997): Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5333), 1805–1807.
- Aiello, C., Terracciano, A., Simonati, A., Discepoli, G., Cannelli, N., Claps, D., Crow, Y. J., Bianchi, M., Kitzmuller, C., Longo, D., Tavoni, A., Franzoni, E., Tessa, A., Veneselli, E., Boldrini, R., Filocamo, M., Williams, R. E., Bertini, E. S., Biancheri, R., Carozzo, R., Santorelli, F. M. (2009): Mutations in MFSD8/CLN7 are a frequent cause of variant-late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Human mutation*, 30(3), E530–E540.
- Aldahmesh, M. A., Al-Hassnan, Z. N., Aldosari, M., & Alkuraya, F. S. (2009): Neuronal ceroid lipofuscinosis caused by MFSD8 mutations: a common theme emerging. *Neurogenetics*, 10(4), 307–311.
- Allikmets, R., Singh, N., Sun, H., Shroyer, N. F., Hutchinson, A., Chidambaram, A., Gerrard, B., Baird, L., Stauffer, D., Peiffer, A., Rattner, A., Smallwood, P., Li, Y., Anderson, K. L., Lewis, R. A., Nathans, J., Leppert, M., Dean, M., & Lupski, J. R. (1997): A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nature genetics*, 15(3), 236–246.
- Álvarez, A., del Castillo, I., Villamar, M., Aguirre, L. A., González-Neira, A., López-Nevot, A., Moreno-Pelayo, M. A., & Moreno, F. (2005): High prevalence of the W24X mutation in the gene encoding connexin-26 (GJB2) in Spanish Romani (gypsies) with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *American journal of medical genetics. Part A*, 137A(3), 255–258.
- Amellal, K., Michel, K. (2013): [Implantation des populations tsiganes dans les Bouches-du-Rhone et patrimoine interculturel]. Marseille. [Francouzsky]
- Amirmokhtari, N., Foresi, B. D., Dewan, S. S., Bouhenni, R. A., & Smith, M. A. (2021): Absence of Cytochrome P450-1b1 Increases Susceptibility of Pressure-Induced Axonopathy in the Murine Retinal Projection. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 636321.
- Aparisi, M. J., Aller, E., Fuster-García, C., García-García, G., Rodrigo, R., Vázquez-Manrique, R. P., Blanco-Kelly, F., Ayuso, C., Roux, A. F., Jaijo, T., & Millán, J. M. (2014): Targeted next generation sequencing for molecular diagnosis of Usher syndrome. *Orphanet journal of rare diseases*, 9, 168.
- Atik, T., Onay, H., Aykut, A., Bademci, G., Kirazli, T., Tekin, M., & Ozkinay, F. (2015): Comprehensive Analysis of Deafness Genes in Families with Autosomal Recessive Nonsyndromic Hearing Loss. *PLoS one*, 10(11), e0142154.
- Autrata, R. (2008): Dětská oftalmologie – I. část. Masarykova univerzita, Brno.
- Azmanov, D. N., Dimitrova, S., Florez, L., Cherninkova, S., Draganov, D., Morar, B., Saat, R., Juan, M., Arostegui, J. I., Ganguly, S., Soodyall, H., Chakrabarti, S., Padh, H., López-Nevot, M. A., Chernodrinska, V., Angelov, B., Majumder, P., Angelova, L., Kaneva, R., Mackey, D. A., Kalaydjieva, L. (2011): LTBP2 and CYP1B1 mutations and associated ocular phenotypes in the Roma/Gypsy founder population. *European journal of human genetics : EJHG*, 19(3), 326–333.

- Batissoco, A. C., Abreu-Silva, R. S., Braga, M. C., Lezirovitz, K., Della-Rosa, V., Alfredo, T., Jr, Otto, P. A., & Mingroni-Netto, R. C. (2009): Prevalence of GJB2 (connexin-26) and GJB6 (connexin-30) mutations in a cohort of 300 Brazilian hearing-impaired individuals: implications for diagnosis and genetic counseling. *Ear and hearing*, 30(1), 1–7.
- Bennett, R. L., French, K. S., Resta, R. G., & Doyle, D. L. (2008): Standardized human pedigree nomenclature: update and assessment of the recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *Journal of genetic counseling*, 17(5), 424–433.
- Bianco, E., Laval, G., Font-Porterias, N., García-Fernández, C., Dobon, B., Sabido-Vera, R., Sukarova Stefanovska, E., Kučinskas, V., Makukh, H., Pamjav, H., Quintana-Murci, L., Netea, M. G., Bertranpetit, J., Calafell, F., & Comas, D. (2020): Recent Common Origin, Reduced Population Size, and Marked Admixture Have Shaped European Roma Genomes. *Molecular biology and evolution*, 37(11), 3175–3187.
- Biesecker, L. G., Harrison, S. M., & ClinGen Sequence Variant Interpretation Working Group (2018): The ACMG/AMP reputable source criteria for the interpretation of sequence variants. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, 20(12), 1687–1688.
- Carricondo, P. C., Andrade, T., Prasov, L., Ayres, B. M., & Moroi, S. E. (2018): Nanophthalmos: A Review of the Clinical Spectrum and Genetics. *Journal of ophthalmology*, 2018, 2735465.
- Council of Europe (2020): *Council of Europe Strategic Action Plan for Roma and Traveller Inclusion (2020-2025)*. [online; cit. 1. 4. 2023]. Dostupné z: <https://edoc.coe.int/en/roma-and-travellers/8508-council-of-europe-strategic-action-plan-for-roma-and-traveller-inclusion-2020-2025.html>
- D'Andrea, P., Veronesi, V., Bicego, M., Melchionda, S., Zelante, L., Di Iorio, E., Bruzzone, R., & Gasparini, P. (2002): Hearing loss: frequency and functional studies of the most common connexin26 alleles. *Biochemical and biophysical research communications*, 296(3), 685–691.
- Daiger, S. P., Sullivan, L. S., & Bowne, S. J. (2013): Genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Clinical genetics*, 84(2), 132–141.
- Dalamón, V., Béhéran, A., Diamante, F., Pallares, N., Diamante, V., & Elgoyhen, A. B. (2005): Prevalence of GJB2 mutations and the del(GJB6-D13S1830) in Argentinean non-syndromic deaf patients. *Hearing research*, 207(1-2), 43–49.
- del Castillo, I., Villamar, M., Moreno-Pelayo, M. A., del Castillo, F. J., Alvarez, A., Tellería, D., Menéndez, I., & Moreno, F. (2002): A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *The New England journal of medicine*, 346(4), 243–249.
- den Hollander, A. I., Koenekoop, R. K., Mohamed, M. D., Arts, H. H., Boldt, K., Towns, K. V., Sedmak, T., Beer, M., Nagel-Wolfrum, K., McKibbin, M., Dharmaraj, S., Lopez, I., Ivings, L., Williams, G. A., Springell, K., Woods, C. G., Jafri, H., Rashid, Y., Strom, T. M., van der Zwaag, B., Roepman, R. (2007): Mutations in LCA5, encoding the ciliary protein lebercilin, cause Leber congenital amaurosis. *Nature genetics*, 39(7), 889–895.
- DNA Genotek (©2023). *Collection kits for research*. [online; cit. 30. 6. 2023]. Dostupné z: <https://www.dnagenotek.com/row/products/collection-human/collection-kits-for-research.html>
- Doshi, M., Marcus, C., Bejjani, B. A., & Edward, D. P. (2006): Immunolocalization of CYP1B1 in normal, human, fetal and adult eyes. *Experimental eye research*, 82(1), 24–32.
- Douzgou, S., & Petersen, M. B. (2011): Clinical variability of genetic isolates of Cohen syndrome. *Clinical genetics*, 79(6), 501–506.
- Ďudáková, E., Skalická, P., Ulmanová, O., Hložánek, M., Stránecký, V., Malinka, F., Vincent, A. L., & Liškova, P. (2020): Pseudodominant Nanophthalmos in a Roma Family Caused by a Novel PRSS56 Variant. *Journal of ophthalmology*, 2020, 6807809.
- Duplomb, L., Duvet, S., Picot, D., Jegou, G., El Chehadeh-Djebbar, S., Marle, N., Gigot, N., Aral, B., Carmignac, V., Thevenon, J., Lopez, E., Rivière, J. B., Klein, A., Philippe, C., Droin, N., Blair, E., Girodon, F., Donadieu, J., Bellanné-Chantelot, C., Delva, L., ... Thauvin-Robinet, C. (2014): Cohen syndrome is associated with major glycosylation defects. *Human molecular genetics*, 23(9), 2391–2399.
- Ena, G. F., Aizpurua-Iraola, J., Font-Porterias, N., Calafell, F., & Comas, D. (2022): Population Genetics of the European Roma-A Review. *Genes*, 13(11), 2068.

- Eudy, J. D., Weston, M. D., Yao, S., Hoover, D. M., Rehm, H. L., Ma-Edmonds, M., Yan, D., Ahmad, I., Cheng, J. J., Ayuso, C., Cremers, C., Davenport, S., Moller, C., Talmadge, C. B., Beisel, K. W., Tamayo, M., Morton, C. C., Swaroop, A., Kimberling, W. J., & Sumegi, J. (1998): Mutation of a gene encoding a protein with extracellular matrix motifs in Usher syndrome type IIa. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5370), 1753–1757.
- European Parliament (2023): *Romani people in the EU*. [online; cit. 5. 5. 2023]. Dostupné z: https://multimedia.europarl.europa.eu/cs/package/romani-people-in-eu_20901
- European Union Agency for Fundamental Rights (2018). *Fundamental Rights Report 2018*. [online; cit. 5. 5. 2023]. Dostupné z: <https://fra.europa.eu/en/publication/2018/fundamental-rights-report-2018>
- EyeWiki – American Academy of Ophthalmology (©2019): Primary congenital glaucoma. [online; cit. 21. 7. 2023]. Dostupné z: https://eyewiki.aao.org/Primary_Congenital_Glaucoma
- Ferrari, S., Di Iorio, E., Barbaro, V., Ponzin, D., Sorrentino, F. S., & Parmeggiani, F. (2011): Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. *Current genomics*, 12(4), 238–249.
- Fokkema, I. F., Taschner, P. E., Schaafsma, G. C., Celli, J., Laros, J. F., & den Dunnen, J. T. (2011): LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Human mutation*, 32(5), 557–563.
- Font-Porterías, N., Arauna, L. R., Poveda, A., Bianco, E., Rebato, E., Prata, M. J., Calafell, F., & Comas, D. (2019): European Roma groups show complex West Eurasian admixture footprints and a common South Asian genetic origin. *PLoS genetics*, 15(9), e1008417.
- Fraser, A. M. (1992): *The Gypsies (The Peoples of Europe)*. Blackwell, Cambridge.
- GeneVision (©2020): *Leber congenital amaurosis (LCA)/Early onset severe retinal dystrophy (EOSRD): for professionals*. [online; cit. 10. 7. 2023]. Dostupné z: <https://gene.vision/knowledge-base/leber-congenital-amaurosis-lca-early-onset-severe-retinal-dystrophy-eosrd-for-doctors/>
- Gresham, D., Morar, B., Underhill, P. A., Passarino, G., Lin, A. A., Wise, C., Angelicheva, D., Calafell, F., Oefner, P. J., Shen, P., Tournev, I., de Pablo, R., Kučinskás, V., Perez-Lezaun, A., Marushiakova, E., Popov, V., & Kalaydjieva, L. (2001): Origins and divergence of the Roma (gypsies). *American journal of human genetics*, 69(6), 1314–1331.
- Haltia, M., & Goebel, H. H. (2013): The neuronal ceroid-lipofuscinoses: a historical introduction. *Biochimica et biophysica acta*, 1832(11), 1795–1800.
- Hancock, I. (2006): *On Romani Origins and Identity*. The Romani Archives and Documentation Center. University of Texas at Austin, USA.
- Heissigerová, J. a kolektiv (2018): *Oftalmologie pro pregraduální i postgraduální přípravu*. Maxdorf Jessenius, Praha.
- Hereditary Hearing Loss Homepage (2021): *Summary of genes identified to date*. [online; 30. 7. 2023]. Dostupné z: <https://hereditaryhearingloss.org>
- Hilgert, N., Smith, R. J., & Van Camp, G. (2009): Function and expression pattern of nonsyndromic deafness genes. *Current molecular medicine*, 9(5), 546–564.
- Hlavatá, L., Ďudáková, L., Moravíková, J., Zobanová, A., Kousal, B., & Lišková, P. (2019). Molecular genetic cause of achromatopsia in two patients of Czech origin. *Molekulárně genetická příčina achromatopsie u dvou pacientů českého původu. Česká a slovenská oftalmologie: Časopis České oftalmologické společnosti a Slovenské oftalmologické společnosti*, 75(5), 272–276.
- Horvátová, J. (©2001-2002) *Kapitoly z dějin Romů. Interkulturní vzdělání. Příručka nejen pro středoškolské pedagogy. Člověk v tísní*.
- Huang, C. H., Yang, C. M., Yang, C. H., Hou, Y. C., & Chen, T. C. (2021): Leber's Congenital Amaurosis: Current Concepts of Genotype-Phenotype Correlations. *Genes*, 12(8), 1261.
- Chang, C. H. (2022): *Neuronal Ceroid Lipofuscinosis*. [online; cit. 28. 7. 2023]. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/1178391-overview?form=fpf>
- Chao, D. L., Burr, A., & Pennesi, M. (2019): RPE65-Related Leber Congenital Amaurosis / Early-Onset Severe Retinal Dystrophy. In M. P. Adam (Eds.) et. al., *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle.
- Chludilová, J. (2017): *Chirurgické řešení odchlípené sítnice*. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Brno.

Chung, D. C., & Traboulsi, E. I. (2009): Leber congenital amaurosis: clinical correlations with genotypes, gene therapy trials update, and future directions. *Journal of AAPOS: the official publication of the American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus*, 13(6), 587–592.

International Society of genetic Genealogy Wiki (©2005–2022): *Autosomal DNA statistics*. [online; cit. 1. 3. 2023]. Dostupné z: https://isogg.org/wiki/Autosomal_DNA_statistics

Ioannidis, N. M., Rothstein, J. H., Pejaver, V., Middha, S., McDonnell, S. K., Baheti, S., Musolf, A., Li, Q., Holzinger, E., Karyadi, D., Cannon-Albright, L. A., Teerlink, C. C., Stanford, J. L., Isaacs, W. B., Xu, J., Cooney, K. A., Lange, E. M., Schleutker, J., Carpten, J. D., Powell, I. J., Sieh, W. (2016): REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *American journal of human genetics*, 99(4), 877–885.

iRepertoire (©2023): *NGS overview: from sample to sequencer to results*. [online; cit. 16. 5. 2023]. Dostupné z: <https://irepertoire.com/ngs-overview-from-sample-to-sequencer-to-results/>

Jarvik, G. P., & Browning, B. L. (2016): Consideration of Cosegregation in the Pathogenicity Classification of Genomic Variants. *American journal of human genetics*, 98(6), 1077–1081.

Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alfoldi, J., Wang, Q., Collins, R. L., Laricchia, K. M., Ganna, A., Birbaumer, D. P., Gauthier, L. D., Brand, H., Solomonson, M., Watts, N. A., Rhodes, D., Singer-Berk, M., England, E. M., Seaby, E. G., Kosmicki, J. A., Walters, R. K., MacArthur, D. G. (2020): The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*, 581(7809), 434–443.

Kelsell, D. P., Dunlop, J., Stevens, H. P., Lench, N. J., Liang, J. N., Parry, G., Mueller, R. F., & Leigh, I. M. (1997): Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, 387(6628), 80–83.

Kim, S. Y., Kim, A. R., Han, K. H., Kim, M. Y., Jeon, E. H., Koo, J. W., Oh, S. H., & Choi, B. Y. (2015): Residual Hearing in DFNB1 Deafness and Its Clinical Implication in a Korean Population. *PloS one*, 10(6), e0125416.

Kitiratschky, V. B., Grau, T., Bernd, A., Zrenner, E., Jägle, H., Renner, A. B., Kellner, U., Rudolph, G., Jacobson, S. G., Cideciyan, A. V., Schaich, S., Kohl, S., & Wissinger, B. (2008): ABCA4 gene analysis in patients with autosomal recessive cone and cone rod dystrophies. *European journal of human genetics : EJHG*, 16(7), 812–819.

Kivisild, T. (2013): Founder Effect. *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*, 100–101.

Kohl, S., Marx, T., Giddings, I., Jägle, H., Jacobson, S. G., Apfelstedt-Sylla, E., Zrenner, E., Sharpe, L. T., & Wissinger, B. (1998): Total colourblindness is caused by mutations in the gene encoding the alpha-subunit of the cone photoreceptor cGMP-gated cation channel. *Nature genetics*, 19(3), 257–259.

Kolehmainen, J., Black, G. C., Saarinen, A., Chandler, K., Clayton-Smith, J., Träskelin, A. L., Perveen, R., Kivitie-Kallio, S., Norio, R., Warburg, M., Fryns, J. P., de la Chapelle, A., & Lehesjoki, A. E. (2003): Cohen syndrome is caused by mutations in a novel gene, COH1, encoding a transmembrane protein with a presumed role in vesicle-mediated sorting and intracellular protein transport. *American journal of human genetics*, 72(6), 1359–1369.

Kopanos, C., Tsiolkas, V., Kouris, A., Chapple, C. E., Albarca Aguilera, M., Meyer, R., & Massouras, A. (2019): VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 35(11), 1978–1980.

Kousal, B., Skalická, P., Diblík, P., Kuthan, P., Langrová, H., Lišková, P. (2013): Klinické nálezy u členů české rodiny s retinitis pigmentosa podmíněnou mutací v ORF15 genu *RPGR*. *Česká a slovenská oftalmologie: Časopis České oftalmologické společnosti a Slovenské oftalmologické společnosti*, 69(1), 8–15.

Kousal, B., Záhlava, J., Vejvalová, Š., Hejtmánková, M., Lišková, P. (2014): Molekulárně genetická příčina a klinický nález u dvou probandů se Stargardtovou chorobou. *Česká a slovenská oftalmologie: Časopis České oftalmologické společnosti a Slovenské oftalmologické společnosti*, 70(6), 228–233.

Kousal, B., Ďudáková, L., Gaillyová, R., Hejtmánková, M., Diblík, P., Michaelides, M., Lišková, P. (2016): Phenotypic features of *CRBI*-associated early-onset severe retinal dystrophy and the different approaches to identifying the disease-causing variants. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 254(9), 1833–1839.

Kousi, M., Siintola, E., Dvorakova, L., Vlaskova, H., Turnbull, J., Topcu, M., Yuksel, D., Gokben, S., Minassian, B. A., Elleder, M., Mole, S. E., & Lehesjoki, A. E. (2009): Mutations in *CLN7/MFSD8* are a common cause of variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Brain: a journal of neurology*, 132(Pt 3), 810–819.

Kumaran, N., Moore, A. T., Weleber, R. G., & Michaelides, M. (2017): Leber congenital amaurosis/early-onset severe retinal dystrophy: clinical features, molecular genetics and therapeutic interventions. *The British journal of ophthalmology*, 101(9), 1147–1154.

- Kumaran, N., Pennesi, M. E., Yang, P., Trzuppek, K. M., Schlechter, C., Moore, A. T., Weleber, R. G., & Michaelides, M. (2018): Leber Congenital Amaurosis / Early-Onset Severe Retinal Dystrophy Overview. In M. P. Adam (Eds.) et al., GeneReviews®. University of Washington, Seattle.
- Kupka, S., Braun, S., Aberle, S., Haack, B., Ebauer, M., Zeissler, U., Zenner, H. P., Blin, N., & Pfister, M. (2002): Frequencies of GJB2 mutations in German control individuals and patients showing sporadic non-syndromic hearing impairment. *Human mutation*, 20(1), 77–78.
- LabGuide – Průvodce laboratoří. *Klasické metody sekvenování*. [online; cit. 10. 6. 2023]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/sekvenovani-dna/klasicke-metody-sekvenovani/>
- Landrum, M. J., Lee, J. M., Benson, M., Brown, G. R., Chao, C., Chitipiralla, S., Gu, B., Hart, J., Hoffman, D., Jang, W., Karapetyan, K., Katz, K., Liu, C., Maddipatla, Z., Malheiro, A., McDaniel, K., Ovetsky, M., Riley, G., Zhou, G., Holmes, J. B., Maglott, D. R. (2018): ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic acids research*, 46(D1), D1062–D1067.
- Lanfranco, L., Vasquez J., Shpylchak, I., Pham, J., Zhang, Y., Bennett J., Mills J. (2018): Loss of Lebercilin causes dysregulation of RPE maturation and ciliary function in cellular and animal models. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*;59(9):4017.
- Laššuthová, P., Sišková, D., Haberlová, J., Sakmaryová, I., Filouš, A., & Seeman, P. (2014): Congenital cataract, facial dysmorphism and demyelinating neuropathy (CCFDN) in 10 Czech Gypsy children--frequent and underestimated cause of disability among Czech Gypsies. *Orphanet journal of rare diseases*, 9, 46.
- Libby, R. T., Smith, R. S., Savinova, O. V., Zabaleta, A., Martin, J. E., Gonzalez, F. J., & John, S. W. (2003): Modification of ocular defects in mouse developmental glaucoma models by tyrosinase. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5612), 1578–1581.
- Lindstrand, A., Frangakis, S., Carvalho, C. M., Richardson, E. B., McFadden, K. A., Willer, J. R., Pehlivan, D., Liu, P., Padiatitakis, I. L., Sabo, A., Lewis, R. A., Banin, E., Lupski, J. R., Davis, E. E., & Katsanis, N. (2016): Copy-Number Variation Contributes to the Mutational Load of Bardet-Biedl Syndrome. *American journal of human genetics*, 99(2), 318–336.
- Liu, Y., Ke, X., Qi, Y., Li, W., & Zhu, P. (2002): Connexin26 gene (GJB2): prevalence of mutations in the Chinese population. *Journal of human genetics*, 47(12), 688–690.
- Loken, A. C., Hanssen, O., Halvorsen, S., & Jolster, N. J. (1961): Hereditary renal dysplasia and blindness. *Acta paediatrica*, 50, 177–184.
- Mackay, D. S., Dev Borman, A., Moradi, P., Henderson, R. H., Li, Z., Wright, G. A., Waseem, N., Gandra, M., Thompson, D. A., Bhattacharya, S. S., Holder, G. E., Webster, A. R., & Moore, A. T. (2011): RDH12 retinopathy: novel mutations and phenotypic description. *Molecular vision*, 17, 2706–2716.
- Mackay, D. S., Borman, A. D., Sui, R., van den Born, L. I., Berson, E. L., Ocaka, L. A., Davidson, A. E., Heckenlively, J. R., Branham, K., Ren, H., Lopez, I., Maria, M., Azam, M., Henkes, A., Blokland, E., Qamar, R., Webster, A. R., Cremers, F. P. M., Moore, A. T., Koenekoop, R. K., ... Wissinger, B. (2013): Screening of a large cohort of leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa patients identifies novel LCA5 mutations and new genotype-phenotype correlations. *Human mutation*, 34(11), 1537–1546.
- Martínez-Cruz, B., Mendizabal, I., Harmant, C., de Pablo, R., Ioana, M., Angelicheva, D., Kouvatzi, A., Makukh, H., Netea, M. G., Pamjav, H., Zalán, A., Tournev, I., Marushiakova, E., Popov, V., Bertranpetit, J., Kalaydjieva, L., Quintana-Murci, L., & Comas, D. (2016): Origins, admixture and founder lineages in European Roma. *European journal of human genetics: EJHG*, 24(6), 937–943.
- Mašindová, I., Šoltýsová, A., Varga, L., Mátyás, P., Ficek, A., Hučková, M., Sůrová, M., Šafka-Brožková, D., Anwar, S., Bene, J., Straka, S., Janicsek, I., Ahmed, Z. M., Seeman, P., Melegh, B., Profant, M., Klimeš, I., Riazuddin, S., Kádasi, L., & Gašperíková, D. (2015): MARVELD2 (DFNB49) mutations in the hearing impaired Central European Roma population--prevalence, clinical impact and the common origin. *PLoS one*, 10(4), e0124232.
- Mendizabal, I., Valente, C., Gusmão, A., Alves, C., Gomes, V., Goios, A., Parson, W., Calafell, F., Alvarez, L., Amorim, A., Gusmão, L., Comas, D., & Prata, M. J. (2011): Reconstructing the Indian origin and dispersal of the European Roma: a maternal genetic perspective. *PLoS one*, 6(1), e15988.

- Mendizabal, I., Lao, O., Marigorta, U. M., Wollstein, A., Gusmão, L., Ferak, V., Ioana, M., Jordanova, A., Kaneva, R., Kouvatsi, A., Kučinskas, V., Makukh, H., Metspalu, A., Netea, M. G., de Pablo, R., Pamjav, H., Radojkovic, D., Rolleston, S. J., Sertic, J., Macek, M., Jr, Kayser, M. (2012): Reconstructing the population history of European Romani from genome-wide data. *Current biology: CB*, 22(24), 2342–2349.
- Michalakakis, S., Gerhardt, M., Rudolph, G., Priglinger, S., & Priglinger, C. (2022): Achromatopsia: Genetics and Gene Therapy. *Molecular diagnosis & therapy*, 26(1), 51–59.
- Minárik, G., Ferák, V., Feráková, E., Ficek, A., Poláková, H., & Kádasi, L. (2003): High frequency of GJB2 mutation W24X among Slovak Romany (Gypsy) patients with non-syndromic hearing loss (NSHL). *General physiology and biophysics*, 22(4), 549–556.
- Molday, R. S., Garces, F. A., Scortecci, J. F., & Molday, L. L. (2022): Structure and function of ABCA4 and its role in the visual cycle and Stargardt macular degeneration. *Progress in retinal and eye research*, 89, 101036.
- Mole, S. E., & Williams, R. E. (2001): Neuronal Ceroid-Lipofuscinoses – RETIRED CHAPTER, FOR HISTORICAL REFERENCE ONLY. In M. P. Adam (Eds.) et. al., *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle.
- Mole, S. E., Williams, R. E., & Goebel, H. H. (2005): Correlations between genotype, ultrastructural morphology and clinical phenotype in the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Neurogenetics*, 6(3), 107–126.
- Momtazmanesh, S., Rayzan, E., Shahkarami, S., Rohlf, M., Klein, C., & Rezaei, N. (2020): A novel VPS13B mutation in Cohen syndrome: a case report and review of literature. *BMC medical genetics*, 21(1), 140.
- Moorjani, P., Patterson, N., Loh, P. R., Lipson, M., Kislali, P., Melegh, B. I., Bonin, M., Kádasi, L., Riefl, O., Berger, B., Reich, D., & Melegh, B. (2013): Reconstructing Roma history from genome-wide data. *PLoS one*, 8(3), e58633.
- Müllner-Eidenböck, A., Moser, E., Klebermass, N., Amon, M., Walter, M. C., Lochmüller, H., Gooding, R., & Kalaydjieva, L. (2004). Ocular features of the congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome. *Ophthalmology*, 111(7), 1415–1423.
- Naňka, O., Elišková, M. (2020): Přehled anatomie. Čtvrté vydání. Galén, Praha.
- Národní centrum lékařské genomiky (2019): *NCMG databáze*. [online; cit. 1. 8. 2023]. Dostupné z: https://ncmg.cz/#my_anchor_database
- Národní zdravotnický informační portál (2023): *Vzácné onemocnění*. [online; cit. 5. 7. 2023]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/2112>
- Nayak, G., Varga, L., Trincot, C., Shahzad, M., Friedman, P. L., Klimes, I., Greinwald, J. H., Jr, Riazuddin, S. A., Masindova, I., Profant, M., Khan, S. N., Friedman, T. B., Ahmed, Z. M., Gasperikova, D., Riazuddin, S., & Riazuddin, S. (2015): Molecular genetics of MARVELD2 and clinical phenotype in Pakistani and Slovak families segregating DFNB49 hearing loss. *Human genetics*, 134(4), 423–437.
- Ng, P. C., & Henikoff, S. (2001): Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome research*, 11(5), 863–874.
- Nolan, D., Fink, J. (2018): Chapter 30 – Genetics of epilepsy. *Handbook of Clinical Neurology*. 467-491.
- Norio R. (2003): Finnish Disease Heritage I: characteristics, causes, background. *Human genetics*, 112(5-6), 441–456.
- Palex – Constant Improvement (©2022): *Secuenciación de genomas: Historia y estado actual*. [online; cit. 4. 5. 2023]. Dostupné z: <https://www.rafer.es/innovacion-laboratorio-clinico/secuenciacion-de-genomas-historia-estado-actual/>
- Pamjav, H., Zalán, A., Béres, J., Nagy, M., & Chang, Y. M. (2011). Genetic structure of the paternal lineage of the Roma people. *American journal of physical anthropology*, 145(1), 21–29.
- Pervez, M. T., Hasnain, M. J. U., Abbas, S. H., Moustafa, M. F., Aslam, N., & Shah, S. S. M. (2022): A Comprehensive Review of Performance of Next-Generation Sequencing Platforms. *BioMed research international*, 2022, 3457806.
- Phan, L., Jin, Y., Zhang, H., Qiang, W., Shekhtman, E., Shao, D., Revoe, D., Villamarin, R., Ivanchenko, E., Kimura, M., Wang, Z. Y., Hao, L., Sharopova, N., Bihan, M., Sturcke, A., Lee, M., Popova, N., Wu, W., Bastiani,

- C., Ward, M., Holmes, J. B., Lyoshin, V., Kaur, K., Moyer, E., Feolo, M., Kattman, B. L. (2020) ALFA: Allele Frequency Aggregator. National Center for Biotechnology Information, USA.
- Polvi, A., Linturi, H., Varilo, T., Anttonen, A. K., Byrne, M., Fokkema, I. F., Almusa, H., Metzidis, A., Avela, K., Aula, P., Kestilä, M., & Muilu, J. (2013): The Finnish disease heritage database (FinDis) update—a database for the genes mutated in the Finnish disease heritage brought to the next-generation sequencing era. *Human mutation*, 34(11), 1458–1466.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I., Daly, M. J., & Sham, P. C. (2007): PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics*, 81(3), 559–575.
- Quang, D., Chen, Y., & Xie, X. (2015): DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(5), 761–763.
- RamShankar, M., Girirajan, S., Dagan, O., Ravi Shankar, H. M., Jalvi, R., Rangasayee, R., Avraham, K. B., & Anand, A. (2003): Contribution of connexin26 (GJB2) mutations and founder effect to non-syndromic hearing loss in India. *Journal of medical genetics*, 40(5), e68.
- Regueiro, M., Rivera, L., Chennakrishnaiah, S., Popovic, B., Andjus, S., Milasin, J., & Herrera, R. J. (2012). Ancestral modal Y-STR haplotype shared among Romani and South Indian populations. *Gene*, 504(2), 296–302.
- RetNet, the Retinal Information Network (©1996–2022): *Summaries of genes and Loci Causing Retinal Diseases*. [online; cit. 4. 6. 2023]. Dostupné z: <https://web.sph.uth.edu/RetNet/sumdis.htm?csrt=11787951754596220069#A-genes>
- Riazuddin, S., Ahmed, Z. M., Fanning, A. S., Lagziel, A., Kitajiri, S., Ramzan, K., Khan, S. N., Chattaraj, P., Friedman, P. L., Anderson, J. M., Belyantseva, I. A., Forge, A., Riazuddin, S., & Friedman, T. B. (2006): Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *American journal of human genetics*, 79(6), 1040–1051.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Reh, H. L., & ACMG Laboratory Quality Assurance Committee (2015): Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, 17(5), 405–424.
- Ripley, D. L., & Politzer, T. (2010): Vision disturbance after TBI. *NeuroRehabilitation*, 27(3), 215–216.
- Riveiro-Alvarez, R., Lopez-Martinez, M. A., Zernant, J., Aguirre-Lamban, J., Cantalapiedra, D., Avila-Fernandez, A., Gimenez, A., Lopez-Molina, M. I., Garcia-Sandoval, B., Blanco-Kelly, F., Corton, M., Tatu, S., Fernandez-San Jose, P., Trujillo-Tiebas, M. J., Ramos, C., Allikmets, R., & Ayuso, C. (2013): Outcome of ABCA4 disease-associated alleles in autosomal recessive retinal dystrophies: retrospective analysis in 420 Spanish families. *Ophthalmology*, 120(11), 2332–2337.
- Rivera, A., White, K., Stöhr, H., Steiner, K., Hemmrich, N., Grimm, T., Jurklics, B., Lorenz, B., Scholl, H. P., Apfelstedt-Sylla, E., & Weber, B. H. (2000): A comprehensive survey of sequence variation in the ABCA4 (ABCR) gene in Stargardt disease and age-related macular degeneration. *American journal of human genetics*, 67(4), 800–813.
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., & Mesirov, J. P. (2011): Integrative genomics viewer. *Nature biotechnology*, 29(1), 24–26.
- Rochow, I., Matschke, K. (1998) citováno podle v Gresham, D., Morar, B., Underhill, P. A., Passarino, G., Lin, A. A., Wise, C., Angelicheva, D., Calafell, F., Oefner, P. J., Shen, P., Tournev, I., de Pablo, R., Kučinskis, V., Perez-Lezaun, A., Marushiakova, E., Popov, V., & Kalaydjieva, L. (2001): Origins and divergence of the Roma (gypsies). *American journal of human genetics*, 69(6), 1314–1331.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467.

- Sarkozy, A., Carta, C., Moretti, S., Zampino, G., Digilio, M. C., Pantaleoni, F., Scioletti, A. P., Esposito, G., Cordeddu, V., Lepri, F., Petrangeli, V., Dentici, M. L., Mancini, G. M., Selicorni, A., Rossi, C., Mazzanti, L., Marino, B., Ferrero, G. B., Silengo, M. C., Memo, L., Tartaglia, M. (2009): Germline BRAF mutations in Noonan, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous syndromes: molecular diversity and associated phenotypic spectrum. *Human mutation*, 30(4), 695–702.
- Seeman, P., & Šišková, D. (2006): Autozomálně recesivní etnické choroby českých Romů [Autosomal recessive ethnic diseases of Czech Gypsies]. *Časopis lékaře českých*, 145(7), 557–561.
- Seeman, P., Malíková, M., Rasková, D., Bendová, O., Groh, D., Kubálková, M., Sakmaryová, I., Seemanová, E., & Kabelka, Z. (2004): Spectrum and frequencies of mutations in the GJB2 (Cx26) gene among 156 Czech patients with pre-lingual deafness. *Clinical genetics*, 66(2), 152–157.
- Senior, B., Friedmann, A. I., & Braudo, J. L. (1961): Juvenile familial nephropathy with tapetoretinal degeneration. A new oculorenal dystrophy. *American journal of ophthalmology*, 52, 625–633.
- Shah, S. P., Taylor, A. E., Sowden, J. C., Ragge, N. K., Russell-Eggitt, I., Rahi, J. S., Gilbert, C. E., & Surveillance of Eye Anomalies (SEA-UK) Special Interest Group (2011): Anophthalmos, microphthalmos, and typical coloboma in the United Kingdom: a prospective study of incidence and risk. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(1), 558–564.
- Shihab, H. A., Gough, J., Cooper, D. N., Stenson, P. D., Barker, G. L., Edwards, K. J., Day, I. N., & Gaunt, T. R. (2013): Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models. *Human mutation*, 34(1), 57–65.
- Schrauwen, I., Melegh, B. I., Chakchouk, I., Acharya, A., Nasir, A., Poston, A., Cornejo-Sanchez, D. M., Szabo, Z., Karosi, T., Bene, J., Melegh, B., & Leal, S. M. (2019): Hearing impairment locus heterogeneity and identification of PLS1 as a new autosomal dominant gene in Hungarian Roma. *European journal of human genetics : EJHG*, 27(6), 869–878.
- Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M., & Seelow, D. (2014): MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature methods*, 11(4), 361–362.
- Skorczyk-Werner, A., Niedziela, Z., Stopa, M., & Krawczyński, M. R. (2020): Novel gene variants in Polish patients with Leber congenital amaurosis (LCA). *Orphanet journal of rare diseases*, 15(1), 345.
- Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C. R., Heiner, C., Kent, S. B., & Hood, L. E. (1986): Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321(6071), 674–679.
- Snustad, D. P., Simmons, M. J. (2017): Genetika. Druhé vydání. Masarykova univerzita, Brno.
- Stoilov, I., Akarsu, A. N., Alozie, I., Child, A., Barsoum-Homsy, M., Turacli, M. E., Or, M., Lewis, R. A., Ozdemir, N., Brice, G., Aktan, S. G., Chevrette, L., Coca-Prados, M., & Sarfarazi, M. (1998): Sequence analysis and homology modeling suggest that primary congenital glaucoma on 2p21 results from mutations disrupting either the hinge region or the conserved core structures of cytochrome P4501B1. *American journal of human genetics*, 62(3), 573–584.
- Symptomy – databáze příznaků a indikací častých nemocí (©2009–2023). *Oči*. [online; cit. 19. 7. 2023]. Dostupné z: <https://www.symptomy.cz/anatomic/oci>
- Šafka Brožková, D., Laštůvková, J., Štěpánková, H., Krůtová, M., Trková, M., Myška, P., & Seeman, P. (2012): DFNB49 is an important cause of non-syndromic deafness in Czech Roma patients but not in the general Czech population. *Clinical genetics*, 82(6), 579–582.
- Taliun, D., Harris, D. N., Kessler, M. D., Carlson, J., Szpiech, Z. A., Torres, R., Taliun, S. A. G., Corvelo, A., Gogarten, S. M., Kang, H. M., Pitsillides, A. N., LeFaive, J., Lee, S. B., Tian, X., Browning, B. L., Das, S., Emde, A. K., Clarke, W. E., Loesch, D. P., Shetty, A. C., Abecasis, G. R. (2021): Sequencing of 53,831 diverse genomes from the NHLBI TOPMed Program. *Nature*, 590(7845), 290–299.
- Tampa Bay Hearing & Balance Center (©2023): *Ear education*. [online; 20. 7. 2023]. Dostupné z: <https://www.tampabayhearing.com/ear-education/>
- Thiele, H., & Nürnberg, P. (2005): HaploPainter: a tool for drawing pedigrees with complex haplotypes. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 21(8), 1730–1732.

- Toms, M., Pagarkar, W., & Moosajee, M. (2020): Usher syndrome: clinical features, molecular genetics and advancing therapeutics. *Therapeutic advances in ophthalmology*, 12, 2515841420952194.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012): Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40(15), e115.
- U. S. Food & Drug Administration (2017): *FDA approves novel gene therapy to treat patients with a rare form of inherited vision loss*. [online; cit. 4. 8. 2023]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-novel-gene-therapy-treat-patients-rare-form-inherited-vision-loss>
- Vanniya S, P., Srisailapathy, C. R. S., & Kunka Mohanram, R. (2018): The tip link protein Cadherin-23: From Hearing Loss to Cancer. *Pharmacological research*, 130, 25–35.
- Varela, M. D., Wong, S. W., Kiray, G., Schlottmann, P. G., Arno, G., Shams, A. N. A., Mahroo, O. A., Webster, A. R., AlTalbish, A., & Michaelides, M. (2023): Detailed Clinical, Ophthalmic and Genetic Characterization of ADGRV1-Associated Usher syndrome. *American journal of ophthalmology*, S0002-9394(23)00268-4. Advance online publication.
- Varon, R., Gooding, R., Steglich, C., Marns, L., Tang, H., Angelicheva, D., Yong, K. K., Ambrugger, P., Reinhold, A., Morar, B., Baas, F., Kwa, M., Tournev, I., Guerguelcheva, V., Kremensky, I., Lochmüller, H., Müllner-Eidenböck, A., Merlini, L., Neumann, L., Bürger, J., Kalaydjieva, L. (2003): Partial deficiency of the C-terminal-domain phosphatase of RNA polymerase II is associated with congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome. *Nature genetics*, 35(2), 185–189.
- Vláda České republiky. (©2009-2023): *Romská národnostní menšina*. [online; cit. 23. 4. 2023]. Dostupné z: <https://www.vlada.cz/cz/ppov/rnm/mensiny/romska-narodnostni-mensina-16149/#>
- Waters, A. M., & Beales, P. L. (2011): Ciliopathies: an expanding disease spectrum. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 26(7), 1039–1056.
- Weisschuh, N., Stingl, K., Audo, I., Biskup, S., Bocquet, B., Branham, K., Burstedt, M. S., De Baere, E., De Vries, M. J., Golovleva, I., Green, A., Heckenlively, J., Leroy, B. P., Meunier, I., Traboulsi, E., Wissinger, B., & Kohl, S. (2018): Mutations in the gene PDE6C encoding the catalytic subunit of the cone photoreceptor phosphodiesterase in patients with achromatopsia. *Human mutation*, 39(10), 1366–1371.
- Wu, Y., Li, R., Sun, S., Weile, J., & Roth, F. P. (2021): Improved pathogenicity prediction for rare human missense variants. *American journal of human genetics*, 108(10), 1891–1906.
- Yan, D., & Liu, X. Z. (2010): Genetics and pathological mechanisms of Usher syndrome. *Journal of human genetics*, 55(6), 327–335.
- Yusuf, I. H., Garrett, A. M., MacLaren, R. E., & Charbel Issa, P. (2022): Retinal cadherins and the retinal cadherinopathies: Current concepts and future directions. *Progress in retinal and eye research*, 90, 101038.
- Zelante, L., Gasparini, P., Estivill, X., Melchionda, S., D'Agruma, L., Govea, N., Milá, M., Monica, M. D., Lutfi, J., Shohat, M., Mansfield, E., Delgrosso, K., Rappaport, E., Surrey, S., & Fortina, P. (1997): Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Human molecular genetics*, 6(9), 1605–1609.
- Zernant, J., Xie, Y. A., Ayuso, C., Riveiro-Alvarez, R., Lopez-Martinez, M. A., Simonelli, F., Testa, F., Gorin, M. B., Strom, S. P., Bertelsen, M., Rosenberg, T., Boone, P. M., Yuan, B., Ayyagari, R., Nagy, P. L., Tsang, S. H., Gouras, P., Collison, F. T., Lupski, J. R., Fishman, G. A., Allikmets, R. (2014): Analysis of the ABCA4 genomic locus in Stargardt disease. *Human molecular genetics*, 23(25), 6797–6806.

8 Webové zdroje

Název	Odkaz
Franklin	https://franklin.genoox.com/clinical-db/home/
gnomAD v2.1.1	https://gnomad.broadinstitute.org/
Hereditary Hearing Loss Homepage	https://hereditaryhearingloss.org/
MutationTaster	https://www.mutationtaster.org/
Národní centrum lékařské genomiky	https://ncmg.cz
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)	https://www.omim.org
PanelApp	https://panelapp.genomicsengland.co.uk/
RetNet	https://web.sph.uth.edu/RetNet/
SIFT	https://sift.bii.a-star.edu.sg/
VarSome	https://varsome.com/

Přílohy

Příloha 1: Informovaný souhlas

Příloha 2: Návod na odběr slin pomocí soupravy OG-500

Příloha 3: Návod na odběr slin pomocí soupravy OG-675

Příloha 4: Návod na odběr slin pomocí soupravy OC