

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Monika Jurkovičová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

HUTCHINSONŮV-GILFORDŮV SYNDROM

Monika Jurkovičová

Vedoucí práce: prof. Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.

Bakalářská práce

Pardubice 2023

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Monika Jurkovičová**
Osobní číslo: **C19234**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Hutchinsonův-Gilfordův syndrom**
Téma práce anglicky: **Hutchinson-Gilford Syndrome**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Seznamte se s literárními údaji, které se věnují problematice Hutchinsonova-Gilfordova syndromu. Vypracujte přehlednou práci zabývající se problematikou Hutchinsonova-Gilfordova syndromu, zaměřte se na laboratorní diagnostiku tohoto syndromu a podstatu onemocnění.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2021**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Hutchinsonův-Gilfordův syndrom jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne: 28. 2. 2023

Monika Jurkovičová

Poděkování

Děkuji prof. Mgr. Romanovi Kand'árovi, Ph.D., za odborné vedení a cenné rady při vypracování bakalářské práce.

ANOTACE

Hutchinsonův-Gilfordův syndrom patří do skupiny onemocnění nazývajících se progerie. Jedná se o syndrom předčasného stárnutí, způsobený mutací genu pro lamin A, tzv. laminopatii. Hutchinsonův-Gilfordův syndrom se projevuje u dětí v prvních dvou letech života. S rostoucím věkem se u nich objevují typické znaky a symptomy, jako je zpomalený růst, ztráta vlasů a podkožního tuku, ztuhlost kloubů, defekty kostí nebo jiné abnormality.

KLÍČOVÁ SLOVA

Hutchinsonův-Gilfordův syndrom, progerie, lamin, laminopatie

TITLE

Hutchinson-Gilford syndrome

ANNOTATION

Hutchinson-Gilford syndrome belongs to a group of diseases called progeria. This is a premature aging syndrome caused by a mutation of the lamin A gene, called laminopathy. Hutchinson-Gilford syndrome manifests in children in the first two years of life. With increasing age, they develop typical signs and symptoms such as slow growth, hair, and subcutaneous fat loss, joint stiffness, bone defects, or other abnormalities.

KEYWORDS

Hutchinson-Gilford syndrome, progeria, lamin, laminopathy

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	10
SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	11
ÚVOD.....	12
1 HUTCHINSONŮV-GILFORDŮV SYNDROM.....	13
1.1 Historie Hutchinsonova Gilfordova syndromu.....	13
1.2 Klasifikace Hutchinsonova Gilfordova syndromu	13
1.3 Laminy	14
1.4 Příčina onemocnění.....	15
2 KLINICKÉ PROJEVY HUTCHINSONOVA GILFORDOVA SYNDROMU... 17	
2.1 Osteolýza	17
2.1.1 Okrajové části těla (akra).....	17
2.1.2 Hrudník.....	18
2.1.3 Obličejová část lebky.....	18
2.1.4 Mozková část lebky	18
2.2 Poruchy tukové tkáně.....	19
2.3 Kůže	20
2.4 Vlasy	20
2.5 Pohyblivost	20
2.6 Dosažení pohlavní dospělosti	21
2.7 Kardiovaskulární projevy	21
2.8 Ostatní abnormality.....	22
3 PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKA HUTCHINSON-GILFORDOVA SYNDROMU	
23	
4 DIAGNOSTIKA HUTCHINSON-GILFORDOVA SYNDROMU.....	24
4.1 Testování jednoho genu	25

4.2	Multigenový panel	25
4.3	Stanovení kyseliny hyaluronové v moči	26
4.4	Imunofluorescenční mikroskopie	26
5	MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÁ ANALÝZA	27
5.1	Polymerázová řetězová reakce.....	27
5.2	ASO polymerázová řetězová reakce.....	28
5.3	Real-time polymerázová řetězová reakce (qPCR).....	29
5.4	Polymerázová řetězová reakce dlouhého dosahu	30
5.5	Metoda mnohonásobné amplifikace závislé na ligaci sond.....	30
5.6	Sekvenování nové generace.....	31
5.7	Sangerovo sekvenování	33
6	DIFERENCIÁLNÍ DIAGNÓZA.....	34
6.1	Wernerův syndrom	34
6.2	Cockaynův syndrom	34
6.3	Hallermann-Streiffův syndrom.....	34
6.4	Gottronův syndrom.....	34
6.5	Wiedemannův-Rautenstrauchův syndrom.....	35
6.6	Nestor-Guillermův syndrom	35
7	LÉČBA.....	36
7.1	Léčba inhibitory farnesyltransferázy	36
7.2	Léčba autofagií	37
7.3	Ubikvitin-proteazomový systém.....	37
7.4	Inhibitory isoprenylcysteinkarboxylmethyltransferázy	38
7.5	Technologie CRISPR/Cas9 a editory adeninové báze.....	38
7.6	Budoucí možnosti léčby.....	39

ZÁVĚR	40
POUŽITÁ LITERATURA.....	41

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ASO PCR	PCR s alelově specifickými oligonukleotidy
CAAX	koncový motiv u laminů, C je cystein, A je alifatická aminokyselina, X je variabilní aminokyselina
ddNTP	dideoxyribonukleosidtrifosfát, z angl. dideoxyribonucleotide triphosphate
DNA	deoxyribonukleová kyselina, z angl. deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonukleosidtrifosfát, z angl. deoxyribonucleotide triphosphate
FDA	úřad pro kontrolu potravin a léčiv, z angl. Food and Drug Administration
FTI	inhibitory farnesyltransferázy
HGS	Hutchinsonův-Gilfordův syndrom
ICMT	isoprenylcysteinkarboxylmethyltransferáza, z angl. isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase
MLPA	mnohonásobná amplifikace závislá na ligaci sond, z angl. multiplex ligation-dependent probe amplification
MRA	magnetická rezonance – angiografie
MRI	magnetická rezonance, z angl. magnetic resonance imaging
mRNA	mediátorová RNA, z angl. messenger ribonucleic acid
NGS	sekvenování nové generace, z angl. next-generation sequencing
NLS	jaderný lokalizační signál, z angl. nuclear localization signal
PCR	polymerázová řetězová reakce, z angl. polymerase chain reaction
RNA	ribonukleová kyselina, z angl. ribonucleic acid
RTG	rentgen
Taq DNA	DNA polymeráza izolovaná z bakterie <i>Thermus aquaticus</i>
TSC	tuberózní skleróza, z angl. tuberous sclerosis
ZMPSTE24	gen kódující metalopeptidázu podílející se na zpracování laminu A, z angl. zinc metallopeptidase STE24

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 - Schéma struktury intermediálních filament	14
Obrázek 2 – Posttranslační úprava laminu A.....	15
Obrázek 3 – Vlevo rentgen chodidel zobrazující resorpci kosti v akrálních částech tarzálních kostí, vpravo rentgen chodidel zdravého jedince.....	18
Obrázek 4 – Vlevo 3D projekce lebky pacienta s HGS, vpravo lebka zdravého jedince....	19
Obrázek 5 – Lipodystrofie	19
Obrázek 6 – Sklerodermie a hyperpigmentace u pacienta s HGS	20
Obrázek 7- Schéma polymerázové řetězové reakce	28
Obrázek 8 – Průběh metody polymerázové řetězové reakce využívající alelově specifické oligonukleotidy	29
Obrázek 9: Princip metody mnohonásobné amplifikace závislé na ligaci sond.....	31
Obrázek 10 - Schéma sekvenování nové generace	33
Obrázek 11 Imunofluorescenční barvení buněk kůže.....	37

ÚVOD

Hutchinsonův-Gilfordův syndrom (HGS) patří do skupiny onemocnění známých jako progerie. Jedná se o vzácné genetické onemocnění způsobené mutací genu *LMNA* lokalizovaného na 21. chromozomu. HGPS je charakterizován klinickými rysy stárnutí, které se typicky rozvíjejí v dětství. Většina dětí s progerií se nedožije věku 13 let. Přestože tímto onemocněním trpí přibližně jen 150 dětí na celém světě, je tato choroba intenzivně zkoumána s cílem nalézt odpovídající léčbu pro toto jinak nevyléčitelné onemocnění. Ve Spojených státech byla schválena první léčba pacientů s HGPS, a to v roce 2020. Léčivo, které je pacientům podávané, nevede k úplnému vyléčení, ale zpomalí proces stárnutí a prodlouží jejich život v průměru o 2,5 roku.

Cílem této práce je poukázat na problematiku HGPS, jeho diagnostiku a podstatu tohoto onemocnění.

1 HUTCHINSONŮV-GILFORDŮV SYNDROM

Hutchinsonův-Gilfordův (HGS) neboli progerie je vzácné genetické onemocnění charakterizované předčasným stárnutím, vyskytujícím se u 1 z každých 4-8 milionů živě narozených dětí (*Kieran et al., 2007*). Postižené děti vypadají po narození zcela normálně, typické znaky pro HGS se začnou u pacientů projevovat kolem 1-2 let po narození. Vyvine se u nich charakteristický vzhled obličeje, včetně vystouplých očí, špičatého nosu, tenkých rtů, malé brady a odstávajících uší. Velmi časté je vypadávání vlasů neboli alopecie, stárnutí pleti, abnormality kloubů a úbytek podkožního tuku. Tento stav nijak neovlivňuje intelektuální vývoj nebo rozvoj motorických dovedností, jako je sezení, stání a chůze (*Gordon et al., 2003*). U pacientů s HGS se objevuje i těžké kornatění tepen (ateroskleróza). Průměrná doba života s tímto syndromem je kolem 13 let, pacienti často umírají kvůli dalším komplikacím, jako je třeba mrtvice nebo infarkt myokardu (*Gordon et al., 2007*).

1.1 Historie Hutchinsonova Gilfordova syndromu

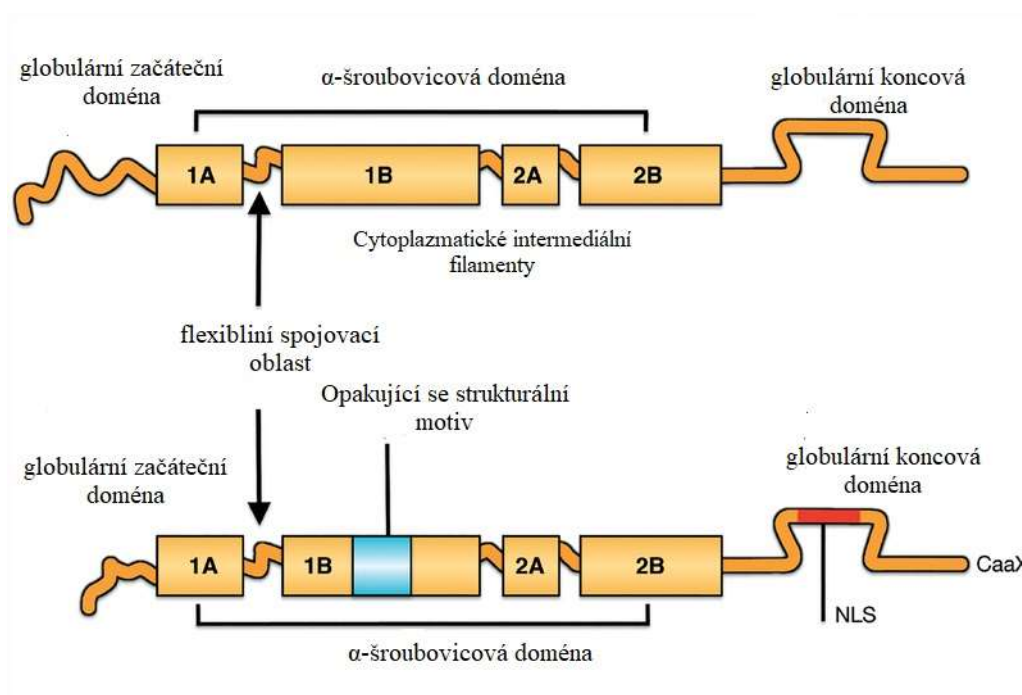
Hutchinsonův-Gilfordův syndrom byl poprvé popsán v roce 1886 britským lékařem Jonathanem Hutchinsonem, který objevil prvního pacienta s touto chorobou. Později, v roce 1904, jej lépe správně pojmenoval britský chirurg Hastings Gilford, čímž vytvořil termín odrážející rysy stárnutí u tohoto syndromu. Název tohoto syndromu pochází z řeckého slova *geras*, které v překladu znamená „předčasně starý“. Mezi další progeroidní syndromy patří například Wernerův syndrom, Cockayneův syndrom a další (*Pollex, 2004*).

1.2 Klasifikace Hutchinsonova Gilfordova syndromu

Většina pacientů s HGS má klasické příznaky této nemoci a pacienti si jsou navzájem velmi podobní. Existuje však skupina pacientů s HGS, u kterých převládají příznaky mandibulo-akrální dysostózy (MAD). Jejich klinický nález se od klasického HGS liší v několika ohledech. Růst je mírně zpomalený, výška pacientů se pohybuje od 130 do 145 centimetrů, zatímco při klasickém HGS zřídka přesahuje 115 centimetrů. Pacienti většinou netrpí alopecií, popřípadě jim vlasy vypadají až v dospělosti. Osteolýza je závažnější u všech postižených kostí (např. žebra, klíční kost), výjimkou jsou kosti obličejové části, kde se osteolýza projevuje pouze mírně, a to většinou v dětství. Pacienti s HGS a příznaky MAD se obvykle dožívají 20 let (*Ackerman, 2002*).

1.3 Laminy

Laminy jsou proteiny nacházející se v buněčném jádru. Vyskytují se především ve vnitřní vrstvě membrány jádra, kde vytvářejí síť proteinů nazývanou jaderná lamina. Ta ovlivňuje děje v buněčném jádře jako je transkripce nebo replikace DNA a také se podílí na organizaci chromatinu (Goldberg, 2008). Stejně jako další intermediální filameny, tak i laminy mají svou typickou strukturu. Obsahují α -šroubovicovou doménu, N-terminální doménu a globulární C-terminální doménu (Fisher, 1986). V blízkosti koncových domén se nachází jaderný lokalizační signál (NLS), který je nezbytný pro jejich aktivní transport v jádře. Většina laminů (u savců, všechny kromě laminu C a laminu C2) obsahuje CAAX motiv, který iniciuje řadu enzymatických reakcí. Na rozdíl od intermediálních filament cytoplazmy, obsahují laminy shodná místa pro proteinkinázy mitoticky aktivních buněk, fosforylací se během mitózy laminy jádra rozpadají (Loewinger, 1988).



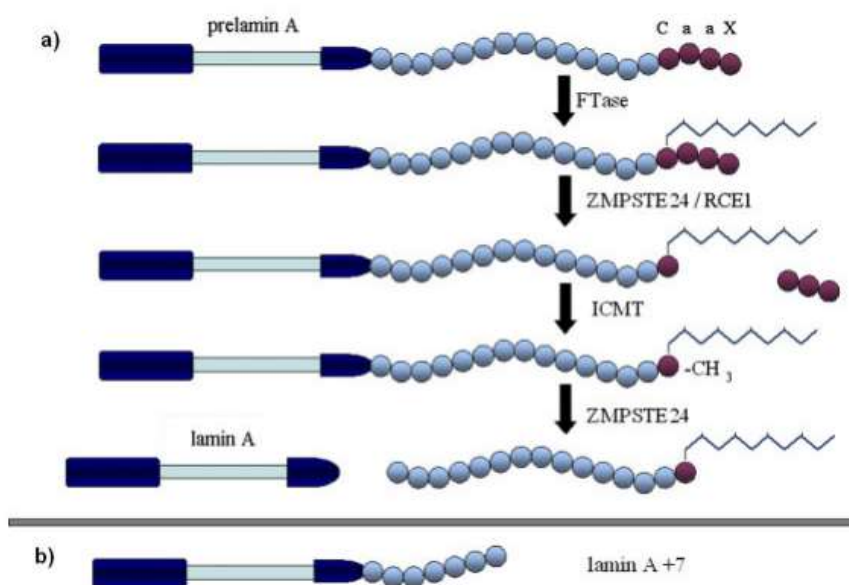
Obrázek 1 - Schéma struktury intermediálních filament

Zdroj: Cambridge University Hospitals, 2021

Obecně se laminy rozdělují na typ A a typ B, v závislosti na jejich strukturní podobnosti a izoelektrických bodech (Stick, 1992).

U savců jsou laminy kódovány třemi geny. U lidí gen *LMNB1* na chromozomu 5 kóduje lamin B1, který je exprimován ve všech nebo ve většině somatických buněk. Gen

LMNB2 na chromozomu 19 kóduje lamin B2, který je také exprimován ve všech nebo většině somatických buněk, a lamin B3, specifickou izoformu zárodečných buněk, která vzniká alternativním sestřihem RNA. Gen *LMNA* na chromozomu 1 kóduje laminy typu A, přičemž lamin A a lamin C jsou hlavní izoformy vznikající alternativním sestřihem RNA, které jsou exprimovány ve většině terminálně diferencovaných buněk (*Lin, 1995*). Laminy A a C jsou identické, přičemž koncová doména laminu C je o 98 aminokyselin kratší než u laminu A. Jelikož lamin C neobsahuje CAAX koncový motiv, nedochází tedy k jeho posttranslační úpravě (*Denecke et al., 2006*).



Obrázek 2 – Posttranslační úprava laminu A

(FTase, farnesyltransferáza; ZMPSTE24, gen kódující zinkovou metalopeptidázu; RCE1, gen kódující integrální membránový protein ze skupiny metaloproteináz; ICMT, isoprenylcysteinkarboxylmethyltransferáza)

Zdroj: <https://citeseerx.ist.psu.edu/>, 2006

1.4 Příčina onemocnění

Hutchinsonův-Gilfordův syndrom je způsoben mutací genu na chromozomu 1, který kóduje lamin A, protein, který je klíčovou složkou jaderné membrány. Abnormální lamin A produkovaný při HGS se nazývá progerin. Gen *LMNA* kóduje čtyři laminy (A, C, CΔ10 a C2) alternativním sestřihem, z nichž lamin A a C jsou nejvíce zastoupené. Lamin A (646 aminokyselin) vzniká z prekurzoru prelaminu A (664 aminokyselin) posttranslační

úpravou. Úprava prelaminu A pro jeho spojení s jadernou membránou spočívá ve farnesylování C-konce, štěpení posledních tří aminokyselinových zbytků a karboxymetylování terminálního cysteinu. Následně endoproteáza ZMPSTE24 katalyzuje odštěpení C-terminálního motivu. K dnešnímu dni bylo identifikováno více než 400 mutací v genu *LMNA*, které jsou spojeny s onemocněním (*Eriksson et al., 2003*).

Ačkoli existuje mnoho mutací, které způsobují HGS, přibližně 90 % případů je způsobeno *de novo* substitucí aminokyselin na pozici c.1824C>T, G608G (záměna glycinu GGC za glycin GGT, označovaný jako G608G) genu *LMNA*. Tato mutace se nachází v exonu 11 genu *LMNA* a vede ke zvýšené aktivaci kryptického místa sestřihu. Mutované mRNA, která je přeložena do proteinu progerin, chybí 50 aminokyselinových zbytků z C-koncové oblasti. Za normálních podmínek je zralý lamin A produkován z prekursoru pre-laminu A, prostřednictvím řady posttranslačních kroků, které začínají v C-koncové oblasti. Nejprve je farnesylován cystein na CAAX koncovém motivu za katalýzy farnesyltransferázy (FTáza), následně jsou poslední tři aminokyseliny (AAX) štěpeny za katalýzy metaloprotézy obsahující v aktivním místě ion zinku. Poté je farnesylován C-terminální konec metylován za katalýzy isoprenylcysteinkarboxylmethyltransferázy (ICMT). V posledním kroku je 15 zbytků aminokyselin proteinu odstraněno za katalýzy metalopeptidázy kódované genem ZMPSTE24, vzniká lamin A. Při onemocnění HGS první tři kroky (tj. farnesylování, štěpení a metylace) probíhají normálně, zatímco čtvrtý krok není dokončen, protože mutace G608G eliminuje druhé místo štěpení pre-laminu A rozpoznané ZMPSTE24, což vede ke vzniku trvale farnesylované formy progerinu. Právě tato forma progerinu je základem onemocnění, protože progerin, na rozdíl od zralého laminu A, má vysokou afinitu k jaderné membráně, což způsobuje narušení integrity membrány (*Moulson et al., 2007, Wentzell et al., 2012*).

2 KLINICKÉ PROJEVY HUTCHINSONOVA GILFORDOVA SYNDROMU

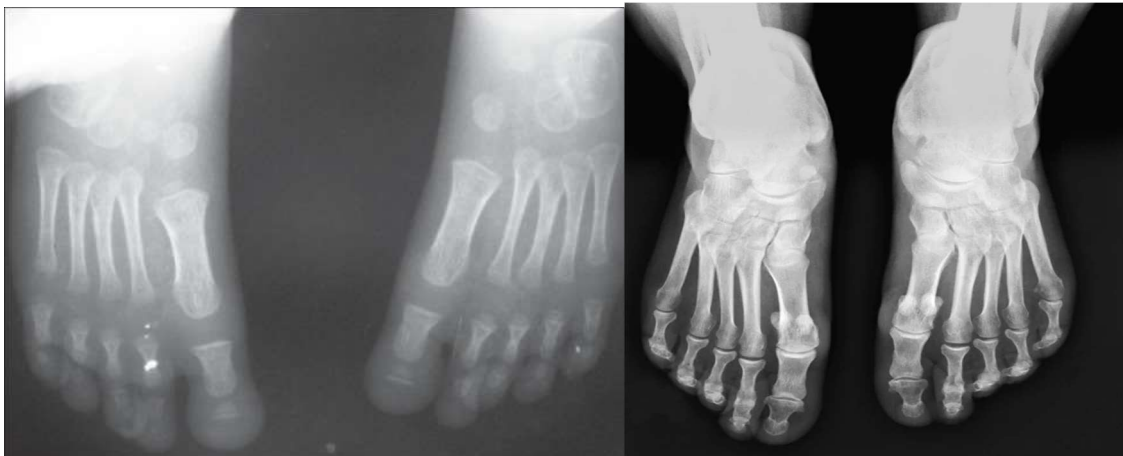
Závažnost HGS je různá a pacienty postihuje celou řadou příznaků. Raným symptomem je obecné neprospívání dítěte, dochází ke zpomalení až zastavení vývoje. Typické znaky zahrnují hypoplazii obličeje, osteoporózu, lipodystrofií, alopecii atd. Všechny projevy uvedené níže byly u pacientů s HGS identifikovány a jsou velmi důležité pro diagnózu (*Hamczyk, 2018*).

2.1 Osteolýza

U každého pacienta s HGS je vždy přítomna určitá forma osteolýzy (úbytek kostní tkáně), a to na distálních člancích prstů, klíční kosti, kosti pažní, dolní čelisti, v oblasti mozkové a obličejové. Ve výjimečných případech ji lze nalézt i v oblasti žeber. Všechny tyto kosti jsou tvořeny membránovou osifikací, včetně střední části distálních článků prstů (*Gordon et al., 2011*). Při klasickém typu HGS je osteolýza především omezena na tyto kosti. Při neklasickém typu HGS je osteolýza mnohem závažnější a postihuje také kosti, které jsou tvořeny enchodrální osifikací, což je osifikace uvnitř chrupavky. Patří sem proximální části distálních článků prstů, střední část klíční kosti a dlouhé kosti horních končetin. Ve vzácných případech se může objevit osteolýza loketní a vřetenní kosti anebo resorpce krčních obratlů. U neklasického typu HGS se zlomeniny objevují kolem 2. roku života a nejčastěji se jedná o zlomeniny žeber a pažní kosti. U klasického typu HGS se zlomeniny vyskytují až v poslední fázi onemocnění, a to většinou v oblasti lebky (*Mandera et al., 2003*).

2.1.1 Okrajové části těla (akra)

Osteolýza distálních článků prstů obvykle začíná mezi 1 a 2 roky věku, ale může se projevit již v prvních měsících života. Proces začíná v ukazováčku a malíčku a postupně se rozšiřuje. Prsteníček je obvykle zasažen nejméně. Kůže článků prstů je červená a oteklá, nehty jsou dystrofické, to znamená, že jsou malé, krátké, nepravidelně tvarované, často velmi zesílené. Změny na nehtu mohou být následovány resorpcí kosti v akrálních částech, což může vést až k úplné destrukci prstu (*Gordon et al., 2011*).



Obrázek 3 – Vlevo rentgen chodidel zobrazující resorpci kosti v akrálních částech tarzálních kostí, vpravo rentgen chodidel zdravého jedince

Zdroj: Indian Dermatol Online, 2014

2.1.2 Hrudník

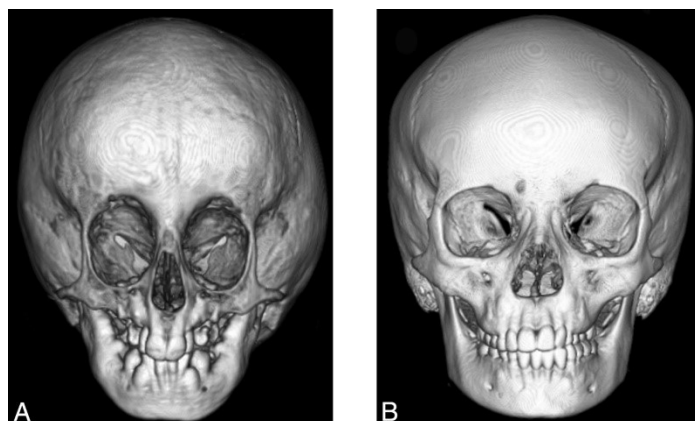
Horní část hrudníku se s postupující osteolýzou klíční kosti a horních žebere zužuje, což způsobuje charakteristická úzká ramena (*Domingo et al., 2009*).

2.1.3 Obličejová část lebky

Obličejová část lebky (splanchnocranium) se s věkem zmenšuje a ztenčuje. Radiologicky lze osteolýzu obličejové části lebky těžko prokázat, ale s rostoucím věkem můžeme u pacientů pozorovat pokles obličejových kostí. Zmenšení velikosti horní a dolní čelisti způsobuje malokluzi (stěsnané zuby) (*Domingo et al., 2009*).

2.1.4 Mozková část lebky

Nedostatečná osifikace mozkové části lebky (neurocranium) způsobuje, že přední fontanela (vazivový lupínek) se neuzavře a zůstává otevřená až do puberty. Lebeční klenba je tenká a v záhlaví jsou vidět intrasuturální kosti. Zmenšení obličejových kostí způsobuje, že se klenba v porovnání s obličejem jeví relativně velká. Obvod lebky často měří asi 25 centimetrů, jen velmi zřídka je obvod lebky větší než 50 centimetrů (*Gonzales, 2011*).



Obrázek 4 – Vlevo 3D projekce lebky pacienta s HGS, vpravo lebka zdravého jedince

Zdroj: American Journal of Neuroradiology, 2012

2.2 Poruchy tukové tkáně

Porucha tukové tkáně (lipodystrofie) se projevuje nejprve v končetinách, následně hrudníku, mozkové části lebky, a nakonec v obličeji. Intraabdominální tuk zůstává nedotčen, což způsobuje téměř u všech dětí charakteristicky výrazné břicho. Vymizení podkožního tuku a ztenčování kůže způsobuje, že jsou cévy a žíly mnohem viditelnější. Nejčasnějším příznakem HGS je právě charakteristicky viditelná žíla přes nosní můstek. Zmizení intra-orbitálního tuku způsobuje, že oči jsou lehce vystouplé, i když se obvykle žádný pravý exoftalmus nediodagnostikuje (*Saint-Marc et al., 2000*).



Obrázek 5 – Lipodystrofie

Zdroj: Indian Dermatol Online, 2014

2.3 Kůže

Sklerodermie je u HGS přechodným příznakem. Obvykle se projevuje kolem druhého měsíce života. Kůže je silná, oteklá, vzniká důlkový edém a na některých místech je mírně erytematózní (začervenalá). Sklerodermie vymizí většinou po 6 měsících až 2 letech, bez ohledu na to, zda se aplikují steroidy, či nikoli. Kůže se pak stává tenkou, suchou, je atrofická, se zmenšeným turgorem, někdy s jemným šupinatěním nebo hyperkeratózou. U obou typů HGS se objevují na kůži malé, světle hnědé skvrny, a to na krku a v horní části hrudníku. Později lze podobné hyperpigmentace pozorovat i na pokožce hlavy a končetinách (Erdem, 1994).



Obrázek 6 – Sklerodermie a hyperpigmentace u pacienta s HGS

Zdroj: Indian Dermatol Online, 2014

2.4 Vlasy

Až na vzácné výjimky se pacienti rodí s normální strukturou a zbarvením vlasů. Přibližně kolem 2. roku života vlasy postupně světlají a vypadávají. Postupně zmizí obočí i řasy, ochlupení těla je řídké anebo zcela chybí (Gillar, 1991).

2.5 Pohyblivost

Pohyblivost kloubů je při narození zcela normální, ale klesá od druhého do třetího roku, zpočátku v kolenu následovaných lokty a prsty. U dětí se rozvine široce pojatá šouravá chůze, způsobená kombinací „*coxa valga*“, což je deformita kyčle a ztuhlosti kloubů. Časem se zmenšuje svalová hmota, mnoha pacientům pak vyčnívají klouby, zejména kolena. Pohyblivost kloubů se zhoršuje a v pozdní fázi onemocnění může dojít až ke ztrátě mobility. Další problémy s pohyblivostí jsou spojené s výskytem akutní artritidy kyčlí, skoliózy a avaskulární nekrózy hlavice femuru, a to většinou v raném dětství (De Paula Rodrigues et al., 2002). Nedávno byl dokonce diagnostikován pacient s klasickým typem HGS, ale příznaky odpovídaly myopatii, a to z důvodu netypické mutace genu *LMNA* (Kirschner et al., 2005).

2.6 Dosažení pohlavní dospělosti

Postižení jedinci pohlavně nedospívají. Ženy dosáhnou dle Tannerovy stupnice, což je stupnice tělesného vývoje, prvního stupně v 78 % případů a druhého stupně ve 22 %, u přibližně 60 % žen proběhne začátek menstruačního cyklu, tzv. menarcha. Ženské vnější a vnitřní genitálie jsou zcela normální, s výjimkou hypoplastických stydkých pysků a cyst na vaječnících s různou velikostí. Prsa jsou nevyvinuta, chybí pubické ochlupení. Všechny ženy s HGS jsou neplodné. Mužské genitálie jsou zcela normální, varlata jsou obvykle sestouplá. U většiny mužů nedochází k spermatogenezi, stejně jako ženy, tak také muži s HGS jsou neplodní (*Greer et al., 2018*).

2.7 Kardiovaskulární projevy

Zpočátku se u pacientů s HGS neobjevují žádné kardiovaskulární problémy, krevní tlak je normální. V raném věku se můžou objevit šelesty a tepová frekvence spolu s krevním tlakem stoupají. Při sonografickém vyšetření je srdce často zvětšené, EKG vykazuje známky zhoršené funkce věnčitých cév a zvětšení levé komory, a to jak v klidu, tak i při námaze. Postupně se u pacientů s HGS může rozvinout těžká ateroskleróza, obvykle bez zjevných abnormalit. Obecně platí, že hladiny celkového cholesterolu, LDL cholesterolu a triacylglycerolů v séru jsou v normě a hladiny HDL cholesterolu mohou s věkem klesat (*Gordon et al., 2005*).

Časnou srdeční abnormalitou je diastolická dysfunkce, která se obvykle projeví v raném věku. Mezi kardiovaskulární projevy dále patří zhoršená relaxace srdečního svalu, následovaná hypertrofií srdeční komory. K tomu může docházet při ztluštění srdeční chlopně a stenózy, nebo spolu s hypertenzí. Abnormality mitrální a aortální chlopně, včetně kalcifikace, stenózy a regurgitace se obvykle objevují v druhé polovině života pacientů. Systolická dysfunkce se obvykle objevuje až v pokročilejší fázi onemocnění, a to i spolu anebo bez identifikované nedostatečné funkce koronárních cév. Pozdními nálezy v průběhu nemoci jsou klinické příznaky *angina pectoris*, dušnost při námaze a zjevné srdeční selhání. Vzácnými projevy jsou ischemické záchvaty, tichá nebo symptomatická mrtvice. Mrtvice může zasáhnout jakoukoliv oblast mozku, a proto může vést k různým fyzickým omezením nebo omezení kognitivních funkcí. U malé skupiny pacientů se může vyskytnout i tzv. Raynaudův fenomén, což je zúžení cév, nejčastěji horních končetin, vlivem stresu nebo chladu (*Silvera et al., 2013*).

Smrt obvykle nastává v důsledku komplikací srdečních nebo cerebrovaskulárních onemocnění. Více než 80 % úmrtí je způsobeno srdečním selháním anebo infarktem myokardu, a to ve věku od 6 do 20 let (*Gordon et al., 2014*).

2.8 Ostatní abnormality

Častým problémem je neschopnost jedince plně zavřít oči během spánku. V důsledku toho může dojít k vysušení a zakalení rohovky. U některých pacientů může docházet k ulceraci rohovky v důsledku keratitidy (*Mantagos et al., 2017*). Dalším častým problémem je opožděné prořezávání mléčných zubů a jejich následná ztráta. Prořezávání sekundárních zubů je velmi vzácné a ve většině případů dochází jen k částečnému prořezání. Rozšířenou abnormalitou je ztráta sluchu, přičemž nízkofrekvenční ztráta sluchu je častější než vysokofrekvenční. Téměř všichni pacienti mají také velmi vysoký hlas (*Guardiani et al., 2011*). Motorický a duševní vývoj je normální. Jiné změny spojené s normálním procesem stárnutí, jako je krátkozrakost nebo dalekozrakost, senilní změny osobnosti nebo Alzheimerova choroba nebyly zdokumentovány. Pacienti s HGS mají normálně vyvinutý imunitní systém. Vzácné jsou opakující se infekce dýchacích cest, které se vyskytují v terminální fázi poruchy a mohou hrát úlohu při srdečním selhání. Funkce jater, ledvin, a gastrointestinálního traktu, stejně jako neurologické a kognitivní funkce jsou zcela normální (*Gordon et al., 2011*).

3 PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKA

HUTCHINSON-GILFORDOVA SYNDROMU

Prenatální diagnostika zahrnuje celou řadu postupů a metod, podle kterých je možné odhalit dědičné nebo spontánní genetické poruchy plodu. Prenatální diagnostika HGS se rutinně neprovádí. V případě, že je u postiženého člena rodiny identifikována alela způsobující toto onemocnění, je nutné prenatální vyšetření podstoupit (*Mazereeuw-Hautier et al., 2007*). DNA pro analýzu je získána z plodové vody aminocentézou. Odběr plodové vody je prováděn v 15.-18. týdnu těhotenství. Další možností je odběr choriových klků v 10.-12. týdnu těhotenství. DNA je extrahována z buněk plodu a analyzována polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) a hybridizací se sondou ASO (*Gray et al., 1997*).

Vzhledem k tomu, že dosud nebylo zjištěno, že by se HGS v rodinách vyskytoval opakovaně, je prenatální testování prováděno pouze kvůli možnosti mozaicismu u jednoho z rodičů. Bohužel většina případů HGS zůstává neodhalena, a to kvůli skutečnosti, že většina je způsobena mutací *de novo*. K dispozici jsou i jiné metody genetické analýzy, například sekvenční analýza nebo cílená mutační analýza, používají se však jen jako potvrzující testy. Kvůli vzácnosti tohoto onemocnění jsou tyto testy prováděny jen několika laboratořemi na světě (*Mazereeuw-Hautier et al., 2007*).

4 DIAGNOSTIKA HUTCHINSON-GILFORDOVA SYNDROMU

Přestože snaha o nalezení účinné léčby HGS pokračuje, stále neexistuje klinicky schválený test pro diagnostiku progerie. Většina případů HGS se objevuje v důsledku *de novo* bodové mutace (Rastogi, 2008). V současné době může být diagnóza stanovena na základě:

- charakteristických klinických rysů,
- tenkého, vysokého hlasu,
- radiografie lebky (kraniofaciální disproporce, abnormální chrup),
- radiografie rukou (radiolucentní články prstů),
- analýzy vzorku moče (nadměrné vylučování glykosaminoglykanu, kyseliny hyaluronové),
- arteriální biopsie (předčasná ateroskleróza a subintimální fibróza).

Pro určení rozsahu samotného onemocnění a potřeb pacienta s diagnózou HGS se doporučuje následující hodnocení:

- hmotnost a výška vykreslená na standardních růstových grafech pro vyhodnocení růstu v průběhu času,
- elektrokardiogram a echokardiogram,
- MRI/MRA mozku a krku,
- RTG vyšetření celé kostry pro vyhodnocení charakteristických nálezů (akroosteolýza, klavikulární resorpce, *coxa valga* a extraskeletální kalcifikace měkkých tkání),
- dvouenergiová rentgenová absorpciometrie (DXA) pro prosouzení hustoty kostí (Cleveland *et al.*, 2012),
- fyzioterapie, včetně šestiminutového testu chůze, goniometrie k posouzení pohyblivosti kloubů a hodnocení činností každodenního života,
- nutriční hodnocení,
- audiologická a oftalmologická vyšetření,
- konzultace s klinickým genetikem (Gordon *et al.*, 2011).

Abychom mohli lépe definovat poruchy související s *LMNA* genem, existuje 5 hlavních kategorií, z toho 1. a 2. kategorie definují HGS a kategorie 3.–5. se nepovažují za HGS, ale

využívají se při diferenciální diagnostice (*Barthélémy et al., 2015*):

1. progerin produkující klasický genotyp HGS;
2. progerin produkující neklasický genotyp HGS;
3. progeroidní laminopatie neprodukující progerin;
 - heterozygotní patogenní varianta *LMNA* genu, která nevede k produkci progerinu,
 - patogenní varianta v jiných genech, např. *ZMPSTE24*;
4. neprogeroidní laminopatie;
5. progeroidní syndromy nesouvisející s laminopatií.

Diagnóza klasického genotypu HGS je určena u probandů s výše uvedenými sugestivními nálezy a heterozygotní *c.1824C>T* patogenní variantou. Diagnóza neklasického genotypu HGS je určena u probandů se sugestivními nálezy podobnými klasickému genotypu HGS a patologickým progerinem, který se tvoří buď v sestřihovém spojení exonu 11, nebo v intronu 11 *LMNA* genu identifikovaném při molekulárně biologických a genetických testech (*Brown, 1985*). K určení diagnózy se využívají molekulárně biologické a genetické testy, které zahrnují kombinaci cíleného testování genu (testování jednoho genu, multigenový panel) a komplexního testování genomu (sekvenování exomů, genomové sekvenování) (*Barthélémy et al., 2015*).

4.1 Testování jednoho genu

Cílená analýza patogenní varianty *LMNA* genu, *c.1824C>T*, identifikované u 90 % pacientů s HGS, může být provedena u pacientů se sugestivními nálezy HGS. Následně lze provést sekvenční analýzu, pokud při cílené analýze není nalezena patogenní varianta. Sekvenční analýza intronu 11 by měla být zahrnuta jen v případě, pokud již nebyla dokončena cílenou analýzou. Delece anebo duplikace *LMNA* genu u pacientů s HGS prozatím nebyly objeveny (*Barthélémy et al., 2015*).

4.2 Multigenový panel

Multigenový panel, který zahrnuje *LMNA*, *ZMPSTE24* a další geny, identifikuje genetickou příčinu stavu za co nejrozumnější cenu a zároveň omezuje identifikaci variant nejistého významu a patogenních variant v genech, které nevysvětlují základní fenotyp (*Barthélémy et al., 2015*). Geny zahrnuté do panelu a citlivost testování použitého pro každý gen se liší

podle laboratoře a je pravděpodobné, že se budou v průběhu času měnit. Metody používané v panelu mohou zahrnovat sekvenční analýzu, deleční/duplikační analýzu anebo jiné testy, které nejsou založeny na sekvenování (Cao, 2003).

4.3 Stanovení kyseliny hyaluronové v moči

U pacientů s HGS můžeme pozorovat zvýšenou hladinu kyseliny hyaluronové (HA) v moči. Hladina HA ve vzorcích moče je stanovena metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). U pacientů s progerií se hladiny HA pohybují od 169 μg HA/g kreatininu do 1440 μg HA/g kreatininu (Tokunaga et al., 1978). Podle novějších studií, kdy byla porovnávána hladina HA v séru a moči, se zjistilo, že hladiny HA u pacientů s HGS se významně nelišily od hladin kontrolní skupiny. Proto se metoda stanovení HA v moči nedoporučuje pro primární diagnostiku, ale spíše jenom pro potvrzení nemoci (Gordon et al., 2007).

4.4 Imunofluorescenční mikroskopie

U všech typů laminopatií byly hlášeny aberace morfologie jádra. U tří buněčných linií fibroblastů byly nalezeny nové mutace *LMNA* genů (AG00989, AG00990, AG04110). Tyto mutované geny vedou k abnormitě jádra a nepravidelně tvarovanému jadernému obalu. Mezi těmito třemi buněčnými liniemi existují rozdíly v závažnosti aberace jádra. Řada fibroblastů AG00989 má mírně nepravidelná jádra, AG00990 má velmi abnormální jádra a poslední řada fibroblastů AG04110 vykazovala nepravidelnosti v jádře. V buněčné linii mělo mnoho buněk abnormální lobulaci jader, připomínající tvar hroznu. Tyto mutace probíhají jak u laminu A, tak i C, a to v N-terminální doméně. Tato metoda není prozatím oficiálně schválena pro klinickou diagnostiku (Csoka et al., 2004).

5 MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÁ ANALÝZA

Molekulárně-biologické metody předchází vyšetření na základě diagnostických kritérií. Pokud je v rodině pacienta detegována alela způsobující onemocnění, popřípadě je pacient diagnostikován na základě charakteristických znaků, pak následuje genetické vyšetření. Mezi nejčastěji používané metody patří polymerázová řetězová reakce (PCR), sekvenování nové generace (NGS) a mnohonásobná amplifikace závislá na ligaci sond (MLPA) (Barthélémy *et al.*, 2015).

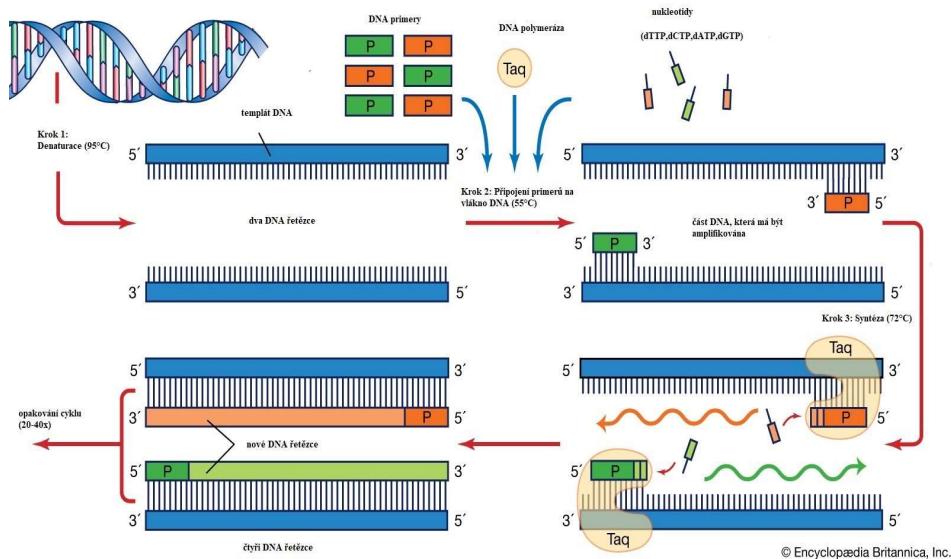
5.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce je metoda, která se používá k amplifikaci neboli pomnožení určitého úseku DNA *in vitro*. Jednotlivé úseky DNA jsou syntetizovány za katalýzy Taq-DNA-polymerázou principem komplementarity bází (Nussbaum *et al.*, 2004).

Klíčovými složkami PCR směsi jsou Taq-DNA-polymeráza, primery, templátová DNA a nukleotidy. Reakce probíhá v zařízení zvaném termocykler, ve kterém je možná rychlá změna teploty podle nastaveného programu. Základní kroky jsou:

1. denaturace (96 °C), vlivem teploty dochází v molekule DNA k rozrušení vodíkových můstků a rozpletení dvoušroubovice na dvě jednovláknové DNA;
2. nasednutí primerů, hybridizace (50-56 °C), musí dojít k ochlazení směsi, aby se primery mohly vázat na cílové sekvence na jednovláknové DNA;
3. syntéza DNA, probíhá za katalýzy Taq-DNA-polymerázy ve směru 5' → 3' konci, ta nasedá na primery a spojuje volné nukleotidy. Teplota využívána v této fázi závisí na použité DNA polymeráze.

Namnožené úseky DNA jsou obvykle separovány gelovou elektroforézou, k vizualizaci se využívá barvivo, které se váže k DNA, jako např. etidiumbromid (Šmarda, 2005).



Obrázek 7- Schéma polymerázové řetězové reakce

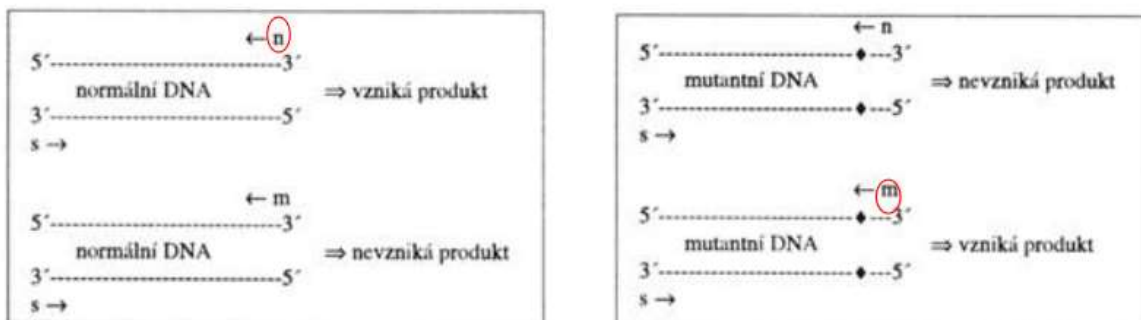
Zdroj: The Editors Of Encyclopedia Britannica, 2019

5.2 ASO polymerázová řetězová reakce

Metoda PCR využívající alelově specifické oligonukleotidy (ASO) je alternativní metoda pro detekci mutací, ve kterých je dokonale sladěný oligonukleotid schopen působit jako primer pro amplifikaci. Výhodou ASO PCR je, že se jedná o rychlou, jednoduchou a neradioaktivní metodu. U této metody jsou oligonukleotidové primery navrženy tak, aby doplňovaly buď normální nebo mutantní sekvenci (Putkonen *et al.*, 2010).

Alelově specifická PCR umožňuje přímou detekci jakékoli bodové mutace v lidské DNA analýzou produktů PCR na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu obarveném ethidiumbromidem. K reakci je potřebná sada tří primerů ve dvou reakcích PCR, dva primery mají odlišnou sekvenci na 3'-koncích, jeden slouží k detekci standardní alely a druhý primer k detekci mutantní alely. Reakce neproběhne, pokud místo na templátové DNA není komplementární k 3'-konci primeru, protože DNA-polymeráza vyžaduje úplnou hybridizaci primeru na 3'-konci. Produkty PCR reakce se nejprve separují elektroforézou. Dalším krokem je denaturace a dvojité blotování z gelu, který je umístěn mezi dvě nylonové membrány. Denaturační roztok slouží také jako pufr k transferu. Fixace DNA k membráně se provádí UV světlem. Posledním krokem je hybridizace s alelově specifickými oligonukleotidy, které jsou označeny. Za daných podmínek nastane situace, kdy jeden jediný chybný pár bází mezi sondou a DNA zabrání hybridizaci. Naopak komplementární úseky

spolu hybridizují. Nakonec se proužky promyjí a detegují (Pastoráková, Petrovič; 2016).



Obrázek 8 – Průběh metody polymerázové řetězové reakce využívající alelově specifické oligonukleotidy

(*n*, „normální“ primer; *m*, „mutantní“ primer; *s*, „společný primer“)

Zdroj: <http://www.lf2.cuni.cz/projekty/prusa-dna/newlook/defa6.htm>, 2019

5.3 Real-time polymerázová řetězová reakce (qPCR)

Metoda real-time PCR neboli kvantitativní PCR, umožňuje vizualizaci a kvantifikaci amplifikace DNA v reálném čase. Při této reakci se využívají fluorescenční barviva, jejichž emitující záření zaznamenává optický systém. V současné době se využívají dva typy barviv, a to barviva, které se vážou přímo na DNA anebo fluorescenčně značené sondy. Grafický průběh real-time PCR znázorňuje amplifikační křivka, která má 4 fáze:

1. Fáze I – dochází ke zdvojnásobení množství amplikonu po každém cyklu, ale nárůst fluorescence je pod detekčním limitem.
2. Fáze II – nazývá se exponenciální fáze, kdy se fluorescence zvýší na úroveň detekce. Exponenciální fáze je důležitá pro určení kvantity vstupního množství templátové DNA, nazývá se prahový cyklus (*C_t*, z angl. threshold cycle) nebo také cyklus kvantifikace (*C_q*, z angl. quantification cycle). Čím nižší je hodnota *C_t*, tím větší počet kopií templátové DNA bylo v reakci. Fluorescence v této fázi se nazývá prahovou fluorescencí.
3. Fáze III – lineární fáze, dochází k postupnému spotřebovávání komponentů reakce a dochází ke strmému nárůstu fluorescence.
4. Fáze IV – fáze plató, množství templátové DNA se v důsledku vyčerpání složek reakce nezvyšuje (Šmarda, 2005).

5.4 Polymerázová řetězová reakce dlouhého dosahu

Polymerázová řetězová reakce dlouhého dosahu (long range PCR) se provádí se směsí Taq DNA-polymerázy v kombinaci s malým množstvím enzymů mající reparační aktivitu, případně bez nich. Enzymy s reparační aktivitou opravují neshody DNA začleněné na 3' konci rostoucího řetězce, což umožňuje Taq polymeráze pokračovat v elongaci DNA mnohem déle, než by tomu bylo bez možnosti oprav. Výhodou je, že se jedná o flexibilní, rychlou a velmi efektivní metodu (*Šmarda, 2005*).

5.5 Metoda mnohonásobné amplifikace závislé na ligaci sond

Metoda mnohonásobné amplifikace závislé na ligaci sond (MLPA) je schopná v jedné reakci (jedné zkumavce s jedním vzorkem) detekovat změny v počtu až 50 nukleotidových sekvencí. Metodu MLPA je možné využít k diagnostice genetických onemocnění, jejichž patogenita souvisí s duplikací anebo delecí specifického genu nebo jeho části (*Stuppia et al., 2012*).

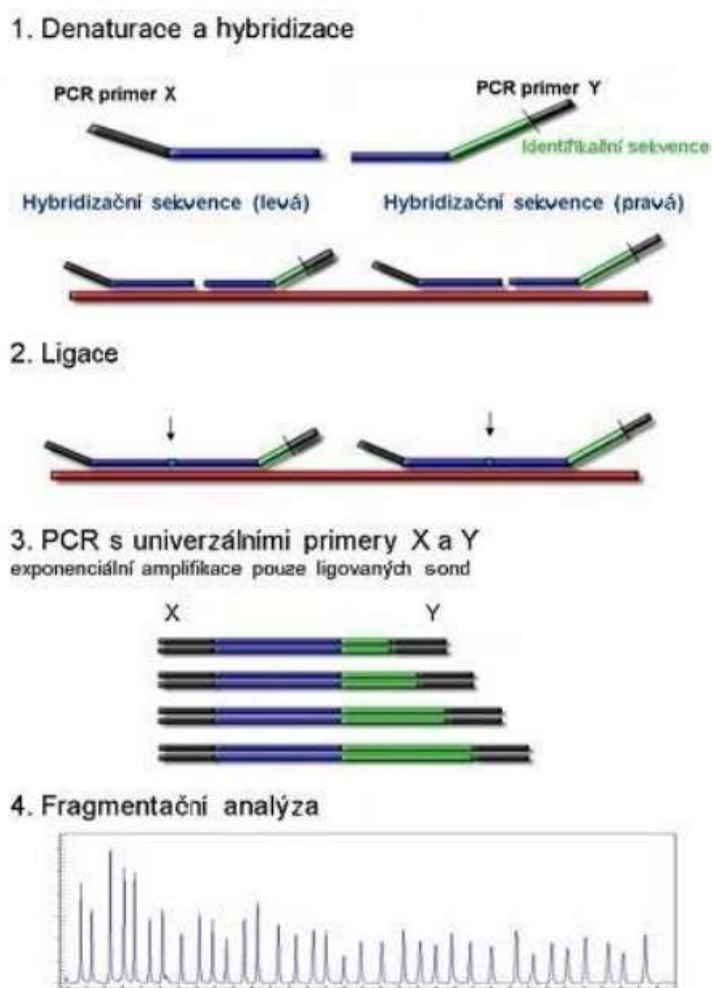
Princip MLPA spočívá v multiplexní amplifikaci 50 specifických nukleotidových sekvencí použitím jednoho páru primerů, přičemž jeden primer je fluorescenčně označen. Výsledné PCR produkty jsou separované kapilární elektroforézou. Jedinečnost této reakce spočívá v tom, že nedochází k amplifikaci sekvence DNA, ale MLPA sond, které jsou přidány ke vzorku. Každá MLPA sonda se skládá ze dvou oligonukleotidů, přičemž každý oligonukleotid obsahuje jednu ze sekvencí rozpoznávanou primerem. Sonda vznikne jedině za předpokladu hybridizace dvou oligonukleotidů k cílové sekvenci a po ligaci za katalýzy ligázou. Pouze ligované sondy jsou exponenciálně amplifikované jedním párem primerů. Množství ligovaných sond závisí na množství cílových sekvencí ve vzorku (*Kozłowski et al., 2008*).

MLPA reakce může být rozdělena do 5 kroků:

1. denaturace DNA a hybridizace MLPA sond,
2. ligace,
3. PCR amplifikace sond párem primerů,
4. separace PCR produktů kapilární elektroforézou a
5. analýza dat.

Při analýze MLPA je důležité kromě amplifikace vzorků provést také amplifikaci

referenčních vzorků. Po separaci produktů kapilární elektroforézou se provede porovnání vzorku pacienta s referenčním vzorkem a určí se relativní počet kopií ve vzorku (*Stuppia et al., 2012*).



Obrázek 9: Princip metody mnohonásobné amplifikace závislé na ligaci sond

Zdroj: <https://bitesizebio.com/41396/mlpa/>, 2018

5.6 Sekvenování nové generace

Technologie sekvenování nové generace (NGS) se používá k určení pořadí nukleotidů v celých genomech nebo cílových oblastech DNA nebo RNA. Metodou NGS může být celý lidský genom sekvenován během jediného dne a s minimálními náklady. (*Yohe et al., 2017*). NGS probíhá ve 4 krocích, izolací nukleových kyselin, přípravou knihovny, klonální amplifikací a sekvenováním a analýzou dat.

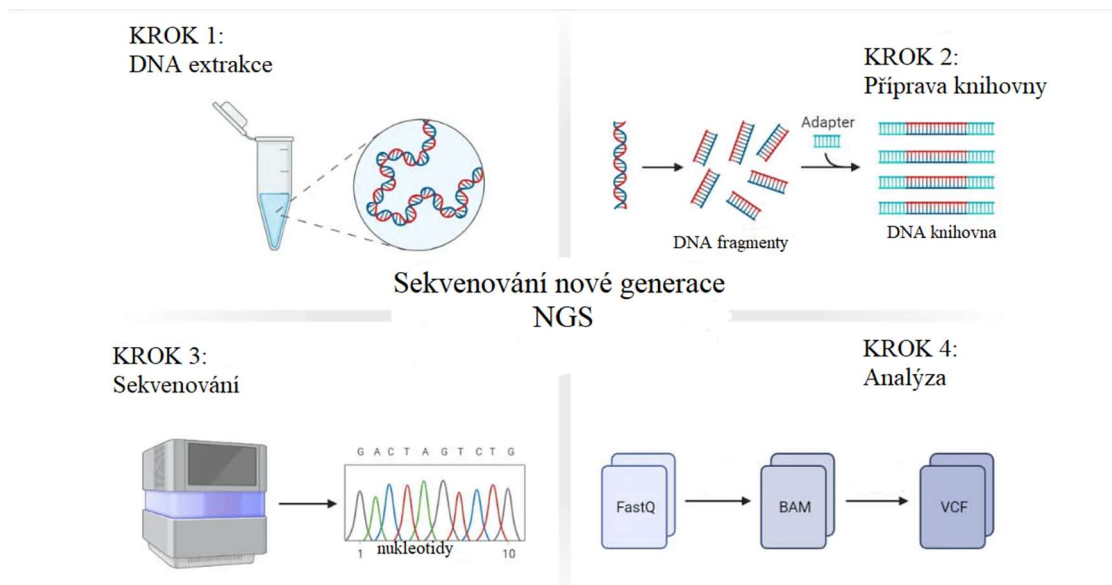
1. Extrakce a izolace nukleových kyselin je prvním krokem v metodě NGS, a to

bez ohledu na to, zda se sekvenuje celková RNA, genomová DNA nebo různé typy RNA. Použitá metoda extrakce závisí na výchozím materiálu. Při tomto kroku je důležité zvolit vhodný protokol extrakce, aby se z příslušného typu vzorku získalo maximální množství nukleové kyseliny o co nejvyšší čistotě. Výtěžnost, kvalita a integrita izolovaných nukleových kyselin jsou rozhodující pro úspěšné sekvenování.

2. Příprava knihovny zahrnuje přípravu vzorků DNA nebo RNA tak, aby mohly být zpracovány a přečteny sekvenátory. Knihovna představuje soubor molekul, které lze sekvenovat. Přesný postup přípravy knihovny se může lišit v závislosti na použitých činidlech a metodách. Bez ohledu na použitý postup musí finální knihovny NGS obsahovat fragmenty DNA požadované délky s adaptéry na obou koncích.
3. Klonální amplifikace zahrnuje amplifikaci fragmentů DNA, které mají být sekvenovány. V tomto kroku je knihovna načtena do sekvenátoru, který pak detekuje nukleotidy jeden po druhém.
4. Poslední krok zahrnuje tři fáze, zpracování, analýzu a interpretaci získaných dat. Použité nástroje, způsob zpracování a analýza dat závisí na aplikacích a cílech testů NGS.

Samotnou analýzu lze rozdělit na primární, sekundární a terciární analýzu.

- Primární analýzou se rozumí zpracování signálu z přístroje do digitální podoby. Tato data jsou shromažďována během každého cyklu sekvenace. Výstupem primární analýzy jsou soubory obsahující základní signály sestavené do FASTQ souborů.
- Sekundární analýza zahrnuje filtrování nukleotidů na základě kvality. Výstupem je soubor, který se označuje jako BAM.
- Terciární analýza je nejnáročnějším krokem, protože zahrnuje interpretaci výsledků a získání smysluplných informací z naměřených dat (*Harris et al., 2013*).



Obrázek 10 - Schéma sekvenování nové generace

Zdroj: <https://microbenotes.com/next-generation-sequencing-ngs/>, 2022

5.7 Sangerovo sekvenování

Sangerovo sekvenování, známé také jako „metoda ukončení řetězce“, je metoda pro určení sekvence nukleotidů DNA. Tuto metodu lze provádět manuálně nebo častěji automatizovaně sekvenátorem. Sangerova metoda využívá proces replikace DNA. Na DNA nasedá radioaktivně značený primer, který je komplementární k začátku sekvenovaného místa. V jedné zkumavce probíhá syntéza DNA v přítomnosti všech čtyř deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTP) a jednoho dideoxyribonukleosidtrifosfátu (ddNTP), proto je reakce prováděna ve čtyřech zkumavkách. Do syntetizovaného řetězce DNA se náhodně začleňují ddNTP místo příslušného dNTP, a jelikož ddNTP postrádají –OH skupinu, syntéza se po jejich začlenění do řetězce zastaví. V reakci tak vzniká směs různě dlouhých fragmentů, které jsou separovány v polyakrylamidovém gelu. Modifikovaná Sangerova metoda využívá fluorescenčně značené ddNTP (každý jinou fluorescenční značkou), proto může být reakce provedena v jediné zkumavce. Produkty jsou separovány kapilární elektroforézou a detegovány fluorescenčním detektorem. (Štípek, 1998).

6 DIFERENCIÁLNÍ DIAGNÓZA

Řada poruch má stejné klinické projevy anebo je způsobena podobnou mutací na *LMNA* genu jako HGS. Patří sem např. Wernerův syndrom, Cockaynův syndrom, Hallermannův-Streiffův syndrom, Gottronův syndrom, Wiedemannův-Rautenstrauchův syndrom anebo Nestor-Guillermův syndrom.

6.1 Wernerův syndrom

Wernerův syndrom, nazývaný také jako progerie, je dědičné onemocnění spojené s předčasným stárnutím a zvýšeným rizikem rakoviny a dalších nemocí. Příznaky Wernerova syndromu jsou obvykle pozorovány v dětství nebo dospívání. Znamky stárnutí, včetně vrásek, šedých vlasů a vypadávání vlasů, se mohou objevit u pacientů ve věku 20 let. Ve věku 30 let se objevují příznaky, jako jsou katarakta, zakalení oční čočky, diabetes typu 2, kožní vředy a osteoporóza. Jedním z nejvýznamnějších zdravotních problémů, kterým čelí pacienti s Wernerovým syndromem, je časný vývoj různých typů rakoviny a aterosklerózy, což může vést k infarktu (*Oshima, 2017*).

6.2 Cockaynův syndrom

Cockaynův syndrom je vzácné onemocnění charakterizované abnormálně malou velikostí hlavy (mikrocefalie), neschopností přibrat na váze, což vede k neprospívání a opožděnému vývoji. Příznaky tohoto onemocnění jsou obvykle patrné od dětství a časem se zhoršují. Většina postižených jedinců má zvýšenou citlivost na sluneční záření, v některých případech i malé množství slunečního záření může způsobit spálení nebo puchýře. Jiné příznaky zahrnují ztrátu sluchu, zraku, abnormality kostí a změny na mozku (*Nance, 1992*).

6.3 Hallermann-Streiffův syndrom

Hallermann-Streiffův syndrom (HSS) je vzácná porucha, která je primárně charakterizována výraznými malformacemi lebky a obličejové oblasti, zubní vadou, degenerativními kožními změnami a poměrně malým vzrůstem. Pacienti mají také zakalenou čočku nebo jiné abnormality oka jako je glaukom nebo odchlípení sítnice. HSS se vyskytuje náhodně a sporadicky (*Cohen, 1991*).

6.4 Gottronův syndrom

Gottronův syndrom neboli akrogerie, je mírná, dědičná forma předčasného stárnutí, charakterizovaná abnormálně malými rukama a nohama s tenkou a jemnou kůží.

Už od raného dětství pacienti s touto poruchou vykazují všechny známky předčasného stárnutí. Kůže je velmi tenká a ruce a nohy zůstávají nedovyvinuté až do dospělosti (*Gordon, 2010*).

6.5 Wiedemannův-Rautenstrauchův syndrom

Wiedemannův-Rautenstrauchův syndrom (WRS), také známý jako neonatální progeroidní syndrom, je velmi vzácné genetické onemocnění charakterizované předčasným stárnutím. Postižení jedinci mají prenatální a postnatální opožděný růst a nepřítomnost vrstvy tuku pod kůží. WRS se řadí mezi autozomálně recesivní onemocnění (*Gordon, 2010*).

6.6 Nestor-Guillermův syndrom

Nestor-Guillermův syndrom je vzácné, genetické onemocnění charakterizované předčasným stárnutím spojeným s těžkou formou osteolýzy a to zejména v oblasti dolní čelisti, klíční kosti, žeber, distální falangy prstů ruky a dlouhých kostí. Mezi další charakteristiky patří zpomalení růstu, ztuhlost kloubů, dysmorfní rysy obličeje, osteoporóza a generalizovaná lipoatrofie. Pacienti s tímto syndromem nemají žádné poruchy kardiovaskulárního systému a metabolismu, což významně prodlužuje průměrnou délku života. Nestor-Guillermův syndrom se řadí mezi autozomálně recesivní onemocnění (*Gordon, 2010*).

7 LÉČBA

Ačkoli příčina HGS byla objevena téměř před 100 lety, zůstává stále nevléčitelnou nemocí. Během lékařské prohlídky se pravidelně kontroluje hmotnost a výška pacienta. Rutinně se vyšetřuje srdce (elektrokardiogram a echokardiogram), pro vyšetření zubů, zraku a sluchu se používají zobrazovací techniky, jako je RTG a MRI. Nedlouho po objevu mutace v genu LMNA jako příčiny HGS byla popsána první možná léčba progerie. Cílem je prodloužit život pacientů s tímto onemocněním. Výsledky základního výzkumu naznačují, že akumulace progerinu může být klíčem k patogenezi HGS. Vzhledem k tomu, že progerin je trvale farnesylován, byla pozornost věnována inhibitorům farnesyltransferázy (FTI), které byly původně vyvinuty pro léčbu rakoviny. V poslední době získala pozornost léčba rapamycinem, což je supresivum schválené FDA pro podávání pacientům po transplantaci

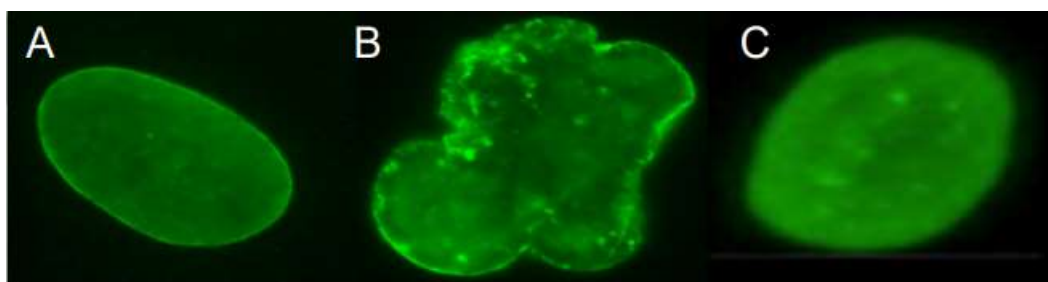
7.1 Léčba inhibitory farnesyltransferázy

Inhibitory farnesyltransferázy se primárně používají při léčbě rakoviny. Farnesylová skupina udržuje progerin trvale ukotvený k jaderné lamině, což vede k abnormalitě tvaru jádra (*Bikkul et al., 2018*).

Tyto deformace mohou změnit prostorovou organizaci chromatinu, a tím vyvolat genetickou a epigenetickou dysfunkci. Dále bylo prokázáno, že FTI způsobují redistribuci progerinu a laminů typu A. Účinnost FTI byla poprvé zaznamenána ve fibroblastech embryí myši a lidí s HGS. Kromě toho bylo prokázáno, že FTI zlepšují prostorové umístění chromozomů, ačkoli nejsou účinné pro snížení poškození DNA. FTI tak inhibují pouze jednu z mnoha změn způsobených progerinem. Bylo také prokázáno, že zlepšují pohyblivost telomer. FTI mají také škodlivé účinky, vedou například ke vzniku dvoujaderných buněk. Dvoujaderné buňky se méně dělí, podobně jako buňky pacientů s HGS (*Toth et al., 2005*).

Bylo provedeno několik dalších studií na myších modelech. Myši léčené FTI neubývaly na váze, zlepšila se u nich integrita kostí a snížil se úbytek svalových buněk cév. Výsledky studií podnítily zahájení několika klinických studií na lidech. První studie se zúčastnilo dvacet pět dětí v průměrném věku sedmi let, které dostávaly léčivo lonafarnib po dobu minimálně dvou let. Výsledky byly povzbudivé, protože přibližně třetina pacientů přibrala na váze a také došlo ke zlepšení kondice kardiovaskulárního systému. V další klinické studii byla myším podávána léčiva lonafarnib, pravastratin a zoledronát. Přidání dvou posledně jmenovaných léčiv vychází z poznatku, že při chybění farnesyltransferázy je

progerin prenylován za katalýzy geranylgeranyltransferázy. Myši s mutací genu pro lamin A-G608G, které byly léčeny těmito třemi léčivy, vykazovaly na rozdíl od léčby pouze lonafarnibem zlepšení parametrů integrity kosti a chrupavky, na druhou stranu však u nich bylo pozorováno zvýšené množství dvoujaderných buněk. V současné době probíhají další klinické studie s kombinovanou léčbou lonafarnibem a everolimem. Everolim cílí na podobné dráhy jako rapamycin. Podávání FTI pacientům s HGS vede k potlačení symptomů a snížení mortality, mohou být ale potenciálně kardiotoxické (*Gordon L.B. et al., 2012*).



Obrázek 11 Imunofluorescenční barvení buněk kůže

A, normální buňka kůže; B, buňka kůže s progerií (zelené tečky laminu); C, buňka kůže s progerií při léčbě inhibitory farnesyltransferázy.

Zdroj: <https://www.intechopen.com/chapters/41856>, 2012

7.2 Léčba autofagií

Autofagie zahrnuje různé cesty, které buňky používají k dopravení nepotřebných nebo nefunkčních proteinů z cytoplazmy do lyzozomů, kde jsou odbourány. Nedostatečná autofagie vede k rychlému stárnutí. Proto je jednou z možností léčby indukce autofagie, která povede ke zvýšenému odbourávání nefunkčních proteinů. Byla identifikována celá řada induktorů autofagie (*Cao et al., 2011*).

Rapamycin prostřednictvím autofagické dráhy vede ke zvýšenému odstraňování progerinu z buněk. Rapamycin je léčivo používané u pacientů po transplantaci a u dětí se syndromem TSC. Nicméně při léčbě pacientů s HGS byly pozorovány vedlejší účinky. Rapamycin vede ke gastrointestinálním symptomům, edému, zvýšené náchylnosti k infekcím, zpomalenému hojení ran, vysokým hladinám cholesterolu a triacylglycerolů a anémii. Proto je věnováno značné úsilí vývoji bezpečnějších analogů (*Neff et al., 2013*).

7.3 Ubikvitin-proteazomový systém

Ubikvitin-proteazomový systém (UPS) přispívá k udržení homeostázy v buňkách a kontrole kvality proteinů. Funguje také jako regulátor mnoha buněčných procesů, včetně proliferace, transkripce genů, apoptózy, antioxidantních a imunitních reakcí. Proteazomy jsou komplexy složené z proteolytické (20S) a regulační partikule (19S). Proteolýza je prováděna třemi podjednotkami s aktivitou podobnou kaspáze, trypsinu a chymotrypsinu. Odstraňování defektních proteinů UPS zahrnuje několik kroků, při nichž se řetězec aktivovaných monomerů ubikvitinu kovalentně váže na lyzinové zbytky cílového proteinu. Proces je zahájen působením enzymu E1 (aktivující enzym), který aktivuje ubikvitin. Aktivovaný ubikvitin je přemístěn na thiolovou skupinu konjugačního enzymu E2. V dalším stupni se ubikvitin připojí na ubikvitinligázu (E3), ta již specificky rozpoznává protein určený k degradaci. Na protein se musí napojit další molekuly ubikvitinu, to katalyzuje elongační faktor (E4). Takový protein je již rozpoznán proteazomem. UPS je atraktivním cílem při léčbě rakoviny. Nedostatečnost UPS představuje běžný patologický jev u onemocnění srdce. Aktivita UPS s věkem klesá. Předpokládá se, že pokles funkce UPS koreluje s procesem stárnutí. Byly provedeny studie, které to prokázaly a mohou tak poskytnout nový přístup k prevenci a léčbě nemocí souvisejících s věkem (*Jianping Jin et al., 2007*).

7.4 Inhibitory isoprenylcysteinkarboxylmethyltransferázy

Během posttranslační úpravy prelaminu A katalyzuje isoprenylcysteinkarboxylmethyltransferáza (ICMT) přidání karboxymethylové skupiny na terminální cystein. Cílená inhibice tohoto kroku může vést ke zmírnění symptomů onemocnění. U fibroblastů postižených HGS byla při snížené aktivitě nebo expresi ICMT pozorována zvýšená proliferace buněk s lokalizací progerinu uvnitř jádra bez zlepšení morfologie jádra. Tato studie byla provedena na myších s deficitem ZMPSTE24. Ukázalo se, že u těchto myší došlo ke zvýšení tělesné hmotnosti, ke zlepšení síly úchopu a zlepšil se také poměr svalové hmoty. Tato studie prokázala také pokles exprese progerinu ve více tkáních, včetně oblouku aorty. Ukázalo se, že inhibitory ICMT mají při léčbě HGS mnohostranný účinek. Inhibitory ICMT byly testovány pouze na myších modelech a není známo, jaké výsledky by byly dosaženy u pacientů s HGS (*Chen et al., 2021*).

7.5 Technologie CRISPR/Cas9 a editory adeninové báze

U HGS vede bodová mutace v genu *LMNA* ke vzniku progerinu. Proto je důležité zaměřit se na gen *LMNA* a jeho výchozí produkty, aby se zabránilo expresi progerinu. Za tímto účelem byly na myších modelech a lidských buňkách testovány dvě strategie, a to CRISPR/Cas9 a editory adeninových bází (ABE). Preklinické studie ukázaly, že tyto strategie vedly ke snížení hladiny progerinu se současným snížením defektů jádra. Účinnost této léčby není v porovnání s jinými studiemi nikterak lepší, pokud jde o přírůstek hmotnosti a očekávanou délku života pacientů. (Koblan *et al.*, 2021).

7.6 Budoucí možnosti léčby

Přestože se ukázalo, že výše zmíněné postupy léčby jsou účinné při zmírňování symptomů HGS, stále se však nejedná o kauzální léčbu. V budoucnosti se očekávají studie s kombinovanou léčbou, například kombinace ICMT s FTI, protože ICMT nesnižují defekty jádra a FTI nejsou účinné při snižování míry poškození DNA. Lze kombinovat podávání léčiv s genovou terapií (Squarzoni *et al.*, 2021).

ZÁVĚR

Hutchinsonův-Gilfordův syndrom, také známý jako progerie, je vzácné genetické onemocnění, které se projevuje zrychleným stárnutím. Progerie je způsobena mutací v genu *LMNA*. Gen *LMNA* produkuje protein lamin A, který je součástí strukturálního lešení, které udržuje jádro buňky pohromadě. Abnormální protein lamin A, který způsobuje progerii, se nazývá progerin. Progerin způsobuje nestabilitu buněk, což vede k procesu předčasného stárnutí. Ke konci roku 2022 bylo na celém světě zaznamenáno 140 případů této nemoci. Od svého objevení byl HGS detailně popsán, avšak stále neexistuje kauzální léčba. V roce 1999 byla založena Nadace pro výzkum progerie (PRF) jako reakce na naprostý nedostatek pokroku v léčbě dětí s progerií. Klinické studie podporované touto nadací vedly k objevu léčiva lonafarnib, který je prvním a prozatím jediným léčivem oficiálně schváleným pro léčbu progerie. Bez tohoto léčiva děti umírají na aterosklerózu nebo jiné komplikace. Při léčbě lonafarnibem je průměrný věk dožití prodloužen nejméně o 2,5 roku. Dnes je PRF jedinou organizací na světě, která se zabývá hledáním vhodné léčby progerie.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] **Ackerman J., Gilbert-Barness E.** *Hutchinson–Gilford Progeria syndrome: A pathologic study.* *Pediatr Pathol Molec Med* 21 (2002) 1–13.
- [2] **Barthélémy F., Navarro C., Fayek R., Da Silva N., Roll P., Sigaudy S., Oshima J., Bonne G., Papadopoulou-Legbelou K., Evangeliou A.E., Spilioti M., Lemerrer M., Wevers R.A., Morava E., Robaglia-Schlupp A., Lévy N., Bartoli M., De Sandre-Giovannoli A.** *Truncated prelamin A expression in HGPS-like patients: a transcriptional study.* *Eur J Hum Genet* 23 (2015) 1051–1061. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4795109/>
- [3] **Bikkul M.U., Clements C.S., Goldwin L.S., Goldberg M.W., Kill I.R., Bridger J.M.** *Farnesyltransferase inhibitor and rapamycin correct aberrant genome organisation and decrease DNA damage respectively, in Hutchinson-Gilford progeria syndrome fibroblasts.* *Biogerontology* 19 (2018) 579–602. Dostupné na: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10522-018-9758-4>
- [4] **Brown W.T., Zebrower M., Kieras F.J.** *Progeria, a model disease for the study of accelerated aging.* *Basic Life Sci* 35 (1985) 375–396. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4062819/>
- [5] **Cao H., Hegele R.A.** *LMNA is mutated in Hutchinson-Gilford progeria (MIM 176670) but not in Wiedemann-Rautenstrauch progeroid syndrome (MIM 264090).* *J Hum Genet* 48 (2003) 271–274. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12768443/>
- [6] **Cao K., Graziotto J.J., Blair D.C., Mazzulli R.J., Erdos R.M., Krainc D., Collins S.F.** *Rapamycin reverses cellular phenotypes and enhances mutant protein clearance in Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells.* *Sci Transl Med* 3 (2011) 89-90. Dostupné na: 89ra58, doi:10.1126/scitranslmed.3002346.
- [7] **Chen X., Yao H., Kashif M., Revechon G., Eriksson M., Hu J., Wang T., Liu Y., Tuksammel E., Stromblad S., Ahearn M.I., Philips R.M., Wiel C., Ibrahim X.M., Bergo O.M.** *A small-molecule ICMT inhibitor delays senescence of Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells.* *Elife* 10 (2021) 217-223. Dostupné na: <https://elifesciences.org/articles/63284>
- [8] **Cleveland R.H., Gordon L.B., Kleinman M.E., Miller D.T., Gordon C.M., Snyder B.D., Nazarian A., Giobbie-Hurder A., Neuberger D., Kieran M.W.** *A prospective*

- study of radiographic manifestations in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. Pediatr Radiol* 42 (2012) 1089–1098. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22752073/>
- [9] **Cohen M.M.Jr.** *Hallermann-Streiff syndrome: a review. Am J Med Genet* 41 (1991) 488-499. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1776643/>
- [10] **Csoka A.B., Cao H., Sammak P.J., Constantinescu D., Schatten G.P., Hegele R.A.** *Novel lamin A/C gene (LMNA) mutations in atypical progeroid syndromes. J Med Genet* 41 (2004) 304-308. Dostupné na: <https://jmg.bmj.com/content/jmedgenet/41/4/304.full.pdf>
- [11] **Denecke J., Brune T., Feldhaus T., Robenek H., Kranz Ch., Auchus J.R., Agarwal K.A., Marquardt T.** *A homozygous ZMPSTES24 null mutation in combination with a heterozygous mutation in the LMNA gene causes Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS): insights into the pathophysiology of HGPS. Hum Mutat* 27(6) (2006) 524-531. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16671095/>
- [12] **De Paula Rodrigues G.H., Das Eiras Tamega I., Duque G., Spinola Dias Neto V.** *Severe bone changes in a case of Hutchinson–Gilford syndrome. Ann Genet* 45 (2002) 151– 155. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12381448/>
- [13] **Domingo D.L., Trujillo M.I., Council S.E., Merideth M.A., Gordon L.B., Wu T. Introne W.J., Gahl W.A., Hart T.C.** *Hutchinson-Gilford progeria syndrome: oral and craniofacial phenotypes. Oral Dis* 15 (2009) 187-195. Dostupné na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1601-0825.2009.01521.x>
- [14] **Erdem N., Güneş T.A., Avcı O., Osma E.** *A case of Hutchinson–Gilford progeria syndrome mimicking scleredema in early infancy. Dermatology* 188(4) (1994) 318– 321. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8193408/>
- [15] **Eriksson M., Brown T.W., Gordon B.L., Glynn W.M., Singer J., Scott L., Erdos R.M., Robbins M.Ch., Moses Y.T., Berglund P., Dutra A., Pak E., Durkin S., Csoka B.A., Boehnke M., Glover W.T., Collins S.F.** *Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. Nature* 423 (2003) 293–298. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12714972/>
- [16] **Fisher D.Z., Chaudhary N., Blobel G.** *cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homolgy to intermediate filament proteins. Proc Natl Acad Sci USA* 83(17) (1986) 6450-6454. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3462705/>

- [17] **Gillar J.P., Kaye I.C., McCourt W.J.** *Progressive early dermatologic changes in Hutchinson–Gilford progeria syndrome.* *Pediatr Dermatol* 8 (1991) 199–206. Dostupné na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1525-1470.1991.tb00859.x>
- [18] **Goldberg W.M., Huttenlauch I., Hutchinson J.Ch., Stick R.** *Filaments made from A- and B-type lamins differ in structure and organization.* *J Cell Sci* 121(Pt2) (2008) 215-225. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18187453/>
- [19] **Gonzales M.J., Pla D., Perez-Sala D., Andres V.** *A-type lamins and Hutchinson-Gilford progeria syndrome: pathogenesis and therapy.* *Front Biosci (Schol Ed)* 3 (2011) 1133-1146. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21622261/>
- [20] **Gordon M.C., Gordon B.L., Snyder D.B., Nazarian A., Quinn N., Huh S., Giobbie-Hurder A., Neuberger D., Cleveland R., Kleinman M., Miller T.D., Kieran W.M.** *Hutchinson-Gilford progeria is a skeletal dysplasia.* *J Bone Miner Res* 26 (2011) 1670–1679. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5650062/>
- [21] **Gordon L.B.** *The premature aging syndrome Hutchinson-Gilford progeria: insights into normal aging.* *Brocklehurst’s Textbook of Geriatric Medicine and Gerontology* Seventh Edition (2010) 66-72. Dostupné na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B978141606231810011X?via%3Dihub>
- [22] **Gordon L.B., Harten I.A., Patti E.M., Lichtenstein A.H.** *Reduced adiponectin and HDL cholesterol without elevated C-reactive protein: clues to the biology of premature atherosclerosis in Hutchinson-Gilford progeria syndrome.* *J Pediatr* 146(3) (2005) 336–341. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15756215/>
- [23] **Gordon L.B., Massaro J., D’Agostino R.B., Campbell C.E., Brazier J., Brown W.T., Kleinman M.E., Kieran M.W.** *Impact of farnesylation inhibitors on survival in Hutchinson-Gilford progeria syndrome.* *Circulation* 130 (2014) 27–34. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4082404/>
- [24] **Gordon L.B., Kleinman M.E., Miller D.T., Neuberger D.S., Giobbie-Hurder A., Gerhard-Herman M., Smoot L.B., Gordon C.M., Cleveland R., Snyder B.D., Fligor B., Bishop W.R., Statkevich P., Regen A., Sonis A., Riley S., Ploski Ch., Correia A., Quinn N., Ullrich N.J., Nazarian A., Liang M.G., Huh S.Y., Schwartzman A., Kieran M.W.** *Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with*

- Hutchinson-Gilford progeria syndrome*. Proc Natl Acad Sci USA 109 (2012) 16666–16671. Dostupné na: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1202529109>
- [25] **Gordon L.B., McCarten K.M., Giobbie-Hurder A., Machan J.T., Campbell C.E., Berns S.D., Kieran M.W.** *Disease progression in Hutchinson-Gilford progeria syndrome: impact on growth and development*. Pediatrics 120 (2007) 824-833. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17908770/>
- [26] **Gordon L.B., Brown W.T., Collins F.S.** *Hutchinson-Gilford progeria syndrome*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle (2003) 1993-2022. Dostupné na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1121/>
- [27] **Gray M.D., Shen J.C., Kamath-Loeb A.S., Blank A., Sopher B.L., Martin G.M.** *The Werner syndrome protein is DNA helicase*. Nat Genet 17 (1997) 100-103. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9288107/>
- [28] **Greer M.M., Kleinman M.E., Gordon L.B., Massaro J., D'Agostino R.B.Sr., Baltrusaitis K., Kieran M.W., Gordon C.M.** *Gordon pubertal progression in adolescent females with progeria*. J Pediatr Adolesc Gynecol 31 (2018) 238–241. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29258958/>
- [29] **Guardiani E., Zalewski C., Brewer C., Merideth M., Introne W., Smith A.C., Gordon L., Gahl W., Kim H.J.** *Otologic and audiology manifestations of Hutchinson-Gilford progeria syndrome*. Laryngoscope 121 (2011) 2250–2255. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3688450/>
- [30] **Hamczyk M.R., del Campo L., Andres V.** *Aging in the cardiovascular system: lessons from Hutchinson-Gilford progeria syndrome*. Annu Rev Physiol 80 (2018) 27-48. Dostupné na: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-physiol-021317-121454>
- [31] **Harris S.R., Cartwright E.J., Török M.E.** *Whole-genome sequencing for analysis of an outbreak of meticillin-resistant Staphylococcus aureus: a descriptive study*. Lancet Infect Dis 13 (2013) 130–136. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3556525/>
- [32] **Jianping J., Xue L., Steven P.G., Harper J.W.** *Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging*. Nature vol. 447, no. 7148 (2007) 1135-1138. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17597759>

- [33] **Kieran M.W., Gordon L., Kleinman M.** *New approaches to progeria.* *Pediatrics* 120(4) (2007) 834-841. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17908771/>
- [34] **Kirschner J., Brune T., Wehnert M., Denecke J., Wasner C., Feuer A., Marquardt T., Ketelsen U.P., Wieacker P., Bonnemann C.G., Korinthenberg R.** *p.S143F mutation in lamin A/C: A new phenotype combining myopathy and progeria.* *Ann Neurol* 57 (2005) 148–151. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15622532/>
- [35] **Koblan L.W., Erdos M.R., Wilson C., Cabral W.A., Levy J.M., Xiong Z.M., Tavaréz E.L., Davison L.M., Gete Y.G., Mao X.** *In vivo base editing rescues Hutchinson-Gilford progeria syndrome in mice.* *Nature* 589 (2021) 608–614. Dostupné na: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-03086-7>
- [36] **Kozłowski P., Jasinska A.J., Kwiatkowski D.J.** *New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification.* *Electrophoresis* 29 (2008) 4627–4636. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19053154/>
- [37] **Lin F., Worman H.J.** *Structural organization of the human gene (LMNB1) encoding nuclear lamin B1.* *Genomics* 27 (1995) 230-236. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7557986/>
- [38] **Loewinger L., McKeon F.** *Mutations in the nuclear lamin proteins resulting in their aberrant assembly in the cytoplasm.* *EMBO J* 7(8) (1988) 2301-2309. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3056713/>
- [39] **Mandera M., Larysz D., Pajak J., Klimczak A.** *Epidural hematomas in a child with Hutchinson–Gilford syndrome.* *Childs Nerv Syst* 19 (2003) 63–65. Dostupné na: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00381-002-0679-8>
- [40] **Mantagos I.S., Kleinman M.E., Kieran M.W., Gordon L.B.** *Ophthalmologic features of progeria.* *Am J Ophthalmol* 182 (2017) 126–132. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28756152/>
- [41] **Mazereeuw-Hautier J., Wilson L.C., Mohammed S., Smallwood D., Shackleton S., Atherton D.J., Harper J.I.** *Hutchinson-Gilford progeria syndrome: clinical findings in three patients carrying the G608G mutation in LMNA and review of the literature.* *Br J Dermatol* 156 (2007) 1308-1314. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17459035/>

- [42] **Moulson C.L., Fong L.G., Gardner J.M., Farber E.A., Go G., Passariello A., Grange D.K., Young S.G., Miner J.H.** *Increased progerin expression associated with unusual LMNA mutations causes severe progeroid syndromes.* Hum Mutat 28(9) (2007) 882–889. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17469202/>
- [43] **Nance M.A., Berry S.A.** *Cockayne syndrome: review od 140 cases.* Am J Med Genet 42(1) (1992) 68-84. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1308368/>
- [44] **Neff F., Flores-Dominguez D., Ryan D.P., Horsch M., Schröder S., Adler T., Fonso L.C., Aguilar-Pimentel J.A., Becker L., Garrett L., Hans W., Hettich M.M., Holtmeier R., Hölter S.M., Moreth K., Prehn C., Puk O., Rácz I., Rathkolb B., Rozman J., naton B., Ordemann R., Adamski J., Beckers J., Bekerdjian R., Busch D.H., Ehniger G., Graw J., Höfler H., Klingenspor M., Klopstosck T., Ollert M., Stypmann J., Wolf E., Wurst W., Zimmer A., Fuchs H., Gailus-Durner V., Hrabe de Angelis M., Ehniger D.** *Rapamycin extends murine lifespan but has limited effects on aging.* J Clin Invest 123 (2013) 3272-3291. Dostupné na: doi:10.1172/JCI67674
- [45] **Nussbaum R.L.** *Klinická genetika: Thompson & Thompson.* Triton 6. vydání (2004) 75-76. ISBN 80-7254-475-6
- [46] **Pollex R.L., Hegele R.A.** *Hutchinson-Gilford progeria syndrome.* Clin Genet 66(5) (2004) 375-381. Dostupné na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1399-0004.2004.00315.x>
- [47] **Oshima J., Sidorova J.M., Monnat R.J.Jr.** *Werner syndrome: clinical features, pathogenesis and potential therapeutic interventions.* Ageing Res Rev 33 (2017) 105-114. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5025328/>
- [48] **Pastoráková A., Petrovič R.** *Molekulárne metódy aktuálne používané v klinickej genetike.* Univerzita Komenského, Lekárska fakulta (2016) 50-90. ISBN 978-80-223-4231-5
- [49] **Putkonen M., Kairisto V., Juvonen V., Pelliniemi T.T., Rauhala A., Itälä-Remes M., Remes K.** *Depth of response assessed by quantitative ASO-PCR predicts the outcome after stem cell transplantation in multiple myeloma.* Eur J Haematol 85(5) (2010) 416-423. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20722702/>
- [50] **Rastogi R., Chander Mohan S.M.** *Progeria syndrome: a casereport.* Indian J Orthop 42 (2008) 97-99. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2759591/>

- [51] **Saint-Marc T., Partisani M., Poizot-Martin I., Rouviere O., Bruno F., Avellaneda R., Lang J.M., Gastaut J.A., Touraine J.L.** *Fat distribution evaluated by computed tomography and metabolic abnormalities in patients undergoing antiretroviral therapy: preliminary results of the LIPOCO study.* *AIDS* 14(1) (2000) 37–49. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10714566/>
- [52] **Scaffidi P., Misteli T.** *Lamin A-dependent nuclear defects in human aging.* *Science* vol. 312, no. 5776 (2006) 1059–1063. Dostupné na: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1127168>
- [53] **Silvera V.M. Gordon L.B., Orbach D.B., Campbell S.E., Machan J.T., Ullrich N.J.** *Imaging characteristics of cerebrovascular arteriopathy and stroke in Hutchinson-Gilford progeria syndrome.* *AJNR Am J Neuroradiol* 34(5) (2013) 1091–1097. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7964639/>
- [54] **Squarzone S., Schena E., Sabatelli P., Mattioli E., Capanni C., Cenni V., D'Apice M.R., Andrenacci D., Sarli G., Pellegrino V.** *Interleukin-6 neutralization ameliorates symptoms in prematurely aged mice.* *Aging Cell* 20 (2021) 26–31. Dostupné na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/accel.13285>
- [55] **Stick R.** *The gene structure of Xenopus nuclear lamin A: a model for the evolution of A-type from B-type lamins by exon shuffling.* *Chromosoma* 101(9) (1992) 566–74. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1521501/>
- [56] **Stuppia L., Antonucci I., Palka G., Gatta V.** *Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases.* *Int J Mol Sci* 13(3) (2012) 3245–3276. Dostupné z: doi:10.3390/ijms13033245
- [57] **Šmarda J.** *Metody molekulární biologie.* Brno: Masarykova univerzita 1. vydání (2005) 76–98. ISBN 80-210-3841-1
- [58] **Štípek S.** *Stručná biochemie: uchování a exprese genetické informace.* Medprint 1. vydání (1998) 13–14. ISBN 80-902036-2-0
- [59] **Tokunaga M., Wakamatsu E., Sato K., Satake S., Aoyama K., Saito K., Sugawara M., Yosizawa Z.** *Hyaluronia in a case of progeria (Hutchinson-Gilford Syndrome).* *J Am Geriatr Soc* 26 (1978) 296–302. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/659773/>
- [60] **Toth J.I., Yang S.H., Qiao X., Beigneux A.P., Gelb M.H., Moulson C.L., Miner J.H., Young S.G., Fong L.G.** *Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear*

shape in fibroblasts from humans with progeroid syndromes. Proc Natl Acad Sci USA 102(36) (2005) 12873–12878. Dostupné na: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0505767102>

[61] **Wentzell R., Walter M., Jakubiczka S., Zenker M., Brune T., Rust S., Marquardt T.** *Neonatal progeria: increased ratio of progerin to lamin A leads to progeria of the newborn.* Eur J Hum Genet 20(9) (2012) 933–937. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22419169/>

[62] **Yohe S., Thyagarajan B.** *Review of Clinical Next-Generation Sequencing.* Arch Pathol Lab Med 141(11) (2017) 1544-1557. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28782984/>