

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2024

Bc. Tatiana Mečiarová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Stanovenie genetických variantov u pacientov s rastovou
reštrikciou**

Diplomová práce

Bc. Tatiana Mečiarová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: Mgr. Zuzana Spurná, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přirodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Tatiana MEČIAROVÁ
Osobní číslo: R220575
Studijní program: N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Stanovení genetických variantů u pacientů s rastovou restrikcí
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Cíle práce:

- Klinický popis pacientů s rastovou restrikcí
- Popis vybraných genů a dráh jejich produktů v kontexte růstu dlouhých kostí
- Literární rešerš možných terapeutických postupů u pacientů s rastovou restrikcí
- Analýza klinických údajů pacientů s rastovou restrikcí
- Analýza zachycených variantů ve vybraném souboru genů u pacientů s rastovou restrikcí

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Jazyk zpracování: Slovenština

Seznam doporučené literatury:

Mastromauro C, Chiarelli F. Novel Insights Into the Genetic Causes of Short Stature in Children. *touchREV Endocrinol.* 2022;18(1):49-57. doi:10.17925/EE.2022.18.1.49

Kaur A, Phadke SR. Analysis of short stature cases referred for genetic evaluation. *Indian J Pediatr.* 2012;79(12):1597-1600. doi:10.1007/s12098-012-0732-x

Child CJ, Quigley CA, Cutler GB Jr, et al. Height Gain and Safety Outcomes in Growth Hormone-Treated Children with Idiopathic Short Stature: Experience from a Prospective Observational Study. *Horm Res Paediatr.* 2019;91(4):241-251. doi:10.1159/000500087

Collett-Solberg PF. Update in growth hormone therapy of children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(3):573-579. doi:10.1210/jc.2010-1131

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Zuzana Spurná
Ústav lékařské genetiky

Datum zadání diplomové práce: 16. října 2022
Termín odevzdání diplomové práce: 31. května 2024

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 4. listopadu 2022

Bibliografické údaje

Meno a priezvisko autora:	Bc. Tatiana Mečiarová
Názov práce:	Stanovenie genetických variantov u pacientov s rastovou reštrikciou
Typ práce:	diplomová
Pracovisko:	Katedra buněčné biologie a genetiky
Vedúci práce:	Mgr. Zuzana Spurná, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2024

Abstrakt:

Rastová reštrikcia je definovaná ako výška presahujúca 2 smerodajné odchýlky pod zodpovedajúcim priemerom pre konkrétny vek, pohlavie a populačnú skupinu. Niektorí pacienti trpia rastovou reštrikciou s neurčitým fenotypom. Takýto typ nízkeho vzrastu nazývame idiopaticky nízky vzrast a predpokladá sa, že jeho príčinou je prítomnosť doposiaľ neznámych genetických variantov, ktorých účinkov vedie k narušeniu fyziologického rastu. V súvislosti s idiopaticky nízkym vzrastom sú sledované gény *ACAN*, *COL2A1*, *FGFR3*, *GHR*, *IGF1*, *IGF1R*, *IGFALS*, *NPR2*, *SHOX*, *STAT5B*. Genetické varianty sú stanovované použitím sekvenačných metód novej generácie.

Táto práca sa zameriavala na záchyt variantov práve vo vyššie zmienenom súbore génov. Na detekciu variantov boli použité platformy Illumina a Ion Torrent. Získané výsledky boli následne potvrdené pomocou Sangerovho sekvenovania a MLPA. Druhou časťou práce bola detekcia variantov v regulačných oblastiach génu *SHOX* – CNE. Ide o málo preskúmanú oblasť, ktorej vplyv na transkripciu *SHOX* je ešte stále predmetom hlbšieho skúmania.

Väčšina variantov sa vyskytovala v intrónovej oblasti génov. Vysoká frekvencia záchytu v testovanom súbore oproti frekvencií záchytu v európskej nefínskej populácii bola pozorovaná u NM_000875.5:c.1247+3A>G (*IGF1R*) a NM_001163213.1:c.740-44T>G (*FGFR3*). V regulačnej oblasti génu *SHOX* bolo detegovaných viacero nových variantov, väčšina z nich sa vyskytovala v „downstream“ oblasti. U väčšiny týchto variantov ide o prvý záchyt, ich význam je teda doposiaľ neznámy.

Kľúčové slová:	rastová reštrikcia, sekvenovanie novej generácie, Sangerovo sekvenovanie, MLPA, regulátory génu <i>SHOX</i>
Počet strán:	52
Počet príloh:	2
Jazyk:	Slovenský

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Bc. Tatiana Mečiarová

Title: Determination of genetic variants in patients with growth restriction

Type of thesis: master

Department: Department of Cell Biology and Genetics

Supervisor: Mgr. Zuzana Spurná, Ph.D.

The year of presentation: 2024

Abstract:

Growth restriction is defined as height 2 standard deviations below the average for a particular age, sex, and population group. Some patients suffer from growth restriction with an unclear phenotype. We call this an idiopathic short stature, and it is assumed that its cause are unknown genetic variants, which negatively effect physiological growth. In connection with idiopathic short stature, the genes *ACAN*, *COL2A1*, *FGFR3*, *GHR*, *IGF1*, *IGF1R*, *IGFALS*, *NPR2*, *SHOX*, *STAT5B* are monitored. Genetic variants are determined using next-generation sequencing methods.

This work focused on the detection of variants in the aforementioned set of genes. Illumina and Ion Torrent platforms were used for variant detection. Detected variants were confirmed using Sanger sequencing and MLPA. The second part of the work was the detection of variants in the regulatory regions of the *SHOX* gene - CNE. This is not a well researched area therefore effects of CNE variants on *SHOX* transcription is still subject for further investigation.

Most of the variants occurred in the intronic region of the genes. A high capture frequency in the test set compared to the frequencies in the European non-Finnish population was observed for NM_000875.5:c.1247+3A>G (*IGF1R*) and NM_001163213.1:c.740-44T>G (*FGFR3*). Several new variants were detected in the regulatory region of the *SHOX* gene, most of them occurring in the "downstream" region. For most of these variants, this is the first capture, so their significance is still uncertain.

Keywords: growth restriction, next generation sequencing, Sanger sequencing, MLPA, *SHOX* regulators

Number of pages: 52

Number of appendices: 2

Language: Slovak

Prehlásenie

Prehlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracovala samostatne pod vedením Mgr. Zuzany Spurnej, Ph.D. s použitím citovaných literárnych zdrojov.

V Olomouci dňa:

Podpis:

Bc. Tatiana Mečiarová

Pod'akovanie

Chcela by som sa pod'akovať vedúcej mojej práce, Mgr. Zuzane Spurnej, Ph.D., za jej rady a pomoc pri vypracovaní tejto práce. Ďakujem aj Ing. Jane Duchoslavovej, Ph.D., Mgr. Márii Janíkovej, Ph.D. a Mgr. Kristýne Kolaříkovej, Ph.D. z Ústavu lékařské genetiky FNOL za pomoc pri vypracovaní praktickej časti mojej diplomovej práce.

Podporené MZ ČR – RVO (FNOL, 00098892).

Obsah

1	Úvod	1
2	Ciele práce	2
4	Literárny prehľad	3
4.1	Rastová reštrikcia	3
4.2	Genetické varianty u človeka.....	4
4.2.1	Nesynonymické varianty.....	4
4.2.2	Synonymické varianty.....	5
4.2.3	Inzercie/delécie	6
4.2.4	Splice site varianty.....	6
4.2.5	Regulačné varianty.....	6
4.2.6	Intrónové varianty	6
4.2.7	Štrukturálne varianty	7
4.3	<i>ACAN</i>	7
4.4	<i>COL2A1</i>	8
4.5	<i>FGFR3</i>	9
4.6	<i>GHR</i>	10
4.7	<i>IGF1, IGF1R, IGFALS</i>	12
4.8	<i>SHOX</i>	13
4.9	<i>NPR2</i>	14
4.10	<i>STAT5B</i>	15
4.11	Molekulárne diagnostické metódy analýzy pacientov s nízkym vzrastom.....	15
4.11.1	Sekvenovanie novej generácie - platforma Illumina	15
4.11.2	Sekvenovanie novej generácie – platforma IonTorrent	16
4.11.3	Stanovenie patogenity	16
4.11.4	Sangerovo sekvenovanie.....	17
4.11.5	Multiplex ligation-dependent probe amplification	17
5	Materiál a metódy	19

5.1	Biologický materiál	19
5.2	Použité chemikálie, súpravy a roztoky	19
5.3	Zoznam použitých prístrojov a zariadení	20
5.4	Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy	21
5.4.1	Postup analýzy pacientov s nízkym vzrastom	21
5.4.2	Illumina sekvenovanie	21
5.4.3	Sangerovo sekvenovanie	27
5.4.4	MLPA	30
5.4.5	Analýza dát z verifikačných metód	32
6	Výsledky	33
6.1	Analýza variantov v kódujúcich oblastiach génov <i>ACAN</i> , <i>COL2A1</i> , <i>FGFR3</i> , <i>GHR</i> , <i>IGF1</i> , <i>IGF1R</i> , <i>IGFALS</i> , <i>SHOX</i> , <i>NPR2</i> , <i>STAT5B</i>	33
6.2	Analýza variantov v regulačných oblastiach génu <i>SHOX</i>	36
7	Diskusia	40
8	Záver	43
9	Literatúra	44
10	Prílohy	52

Zoznam symbolov a skratiek

ACAN	aggrecan core protein
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
ALS	acid-labile subunit
CNE	conserved non-coding elements
CNP	C-type natriuretic peptide
CNV	copy number variant
<i>COL2A1</i>	collagen type II alpha 1 chain
(d)dNTP	(di)deoxyribonukleotidy
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
<i>FGFR3</i>	fibroblast growth factor receptor 3
GH	growth hormone
GHI	growth hormone insensitivity
<i>GHR</i>	growth hormone receptor
GHRH	GH-releasing hormone
<i>IGF1</i>	insulin like growth factor 1
<i>IGF1R</i>	insulin like growth factor 1 receptor
<i>IGFALS</i>	insulin like growth factor binding protein acid labile subunit
ISS	idiopathic short stature
IUGR	intrauterine growth retardation
KHD	kinase homology domain
LM-PCR	ligation mediated polymerase chain reaction
LoF	loss of function
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina

NGS	next generation sequencing
<i>NPR2</i>	natriuretic peptide receptor 2
nt	nukleotid
PAR	pseudoautosomal region
PCR	polymerase chain reaction
rhGH	recombinant human growth hormone
rhIGF1	recombinant human insulin like growth factor-1
SD(S)	standard deviation (score)
<i>SHOX</i>	short stature homeobox-containing gene
SNP	single nucleotide polymorfism
SNV	single nucleotide variant
SRIF	somatotropin release inhibiting factor
<i>STAT5B</i>	signal transducer and activator of transcription 5B
UTR	untranslated region
VEP	Variant Effect Predictor
VUS	variant of uncertain significance
WHO	World Health Organisation

Zoznam obrázkov

Obrázok č.1: Princíp vzniku missense variantu (prevzaté a upravené z MedlinePlus, 2023).	5
Obrázok č. 2: Princíp vzniku nonsense variantu (prevzaté a upravené z MedlinePlus, 2023)	5
Obrázok č. 3: Princíp vzniku indelu (prevzaté a upravené z MedlinePlus, 2023)	6
Obrázok č. 4: Diagram génu <i>ACAN</i> (prevzaté z UCSC Genome Browser on Human, 2023)	7
Obrázok č. 5: Diagram génu <i>COL2A1</i> (prevzaté z UCSC Genome Browser on Human, 2023)	8
Obrázok č. 6: Model štruktúry α -1 reťazca kolagénu typu II (prevzaté z GeneCards: The Human Gene Database, 2023)	8
Obrázok č. 7: Diagram génu <i>FGFR3</i> (prevzaté z UCSC Genome Browser on Human, 2023)	9
Obrázok č. 8: Diagram génu <i>GHR</i> (prevzaté z UCSC Genome Browser on Human, 2023)	10
Obrázok č. 9: Schematické zobrazenie roly vybraných génov v raste kostí (prevzaté a upravené zo Spurná, 2024)	10
Obrázok č. 10: Metabolická dráha GH/IGF1 (prevzaté a upravené z Kaur, 2021)	11
Obrázok č. 11: Diagram génu <i>IGF1</i> (prevzaté z UCSC Genome Browser on Human, 2023)	12
Obrázok č. 12: Diagram génu <i>IGF1R</i> (prevzaté z UCSC Genome Browser on Human, 2023)	12
Obrázok č. 13: Diagram génu <i>IGFALS</i> (prevzaté z UCSC Genome Browser on Human, 2023)	12
Obrázok č. 14: Diagram génu <i>SHOX</i> (prevzaté z UCSC Genome Browser on Human, 2023)	13
Obrázok č. 15: Diagram génu <i>NPR2</i> (prevzaté z UCSC Genome Browser on Human, 2023)	14
Obrázok č. 16: Diagram génu <i>STAT5B</i> (prevzaté z UCSC Genome Browser on Human, 2023)	15
Obrázok č. 17: Stavba prób používaných v metóde MLPA (prevzaté a upravené z MRC Holland, 2023)	18
Obrázok č. 18: Diagram postupu analýzy pacientov s nízkym vzrastom	21

Zoznam tabuliek

Tabuľka č. 1: Teplotný profil LM-PCR reakcie.....	23
Tabuľka č. 2: Teplotný profil hybridizačnej reakcie	24
Tabuľka č. 3: Teplotný profil Post-Captured LM-PCR	26
Tabuľka č. 4: Zloženie reakčnej zmesi pre PCR.....	27
Tabuľka č. 5: Teplotný profil PCR reakcie.....	28
Tabuľka č. 6 Teplotný profil enzymatického prečistenia	28
Tabuľka č. 7: Zloženie zmesi sekvenačnej PCR.....	29
Tabuľka č. 8: Teplotný profil sekvenačnej PCR.....	29
Tabuľka č. 9: Teplotný profil denaturácie DNA.....	30
Tabuľka č. 10: Teplotný profil hybridizačnej reakcie	30
Tabuľka č. 11: Teplotný profil ligačnej reakcie.....	31
Tabuľka č. 12: Teplotný profil SALSA PCR reakcie	31
Tabuľka č. 13: Parametre kapilárnej elektroforézy	32
Tabuľka č. 14: Štatisticky významné varianty detegované v kódujúcich oblastiach génov <i>ACAN</i> , <i>COL2A1</i> , <i>FGFR3</i> , <i>GHR</i> , <i>IGF1</i> , <i>IGF1R</i> , <i>IGFALS</i> , <i>SHOX</i> , <i>NPR2</i> , <i>STAT5B</i>	33
Tabuľka č. 15: Patogénne varianty identifikované v testovanom súbore	36
Tabuľka č. 16: Detegované varianty regulátorov génu <i>SHOX</i> s frekvenciou $< 0,005$ a $p < 0,05$	37

1 Úvod

Rastovou reštrikciou trpia pacienti, ktorých výška je 2 smerodajné odchýlky pod priemerom pre ich vek, pohlavie a populačnú skupinu. Väčšina prípadov nízkeho vzrastu má jasne stanoviteľnú príčinu (konštitučné oneskorenie rastu a puberty, familiárne nízky vzrast) alebo sa vyskytuje ako sekundárny prejav iného systematického ochorenia. V niektorých prípadoch však dochádza k rastovej reštrikcii bez zjavnej príčiny alebo pridružených fenotypových prejavov. Tento typ rastovej reštrikcie nazývame idiopaticky nízky vzrast. Predpokladá sa, že tento stav má genetickú etiológiu.

Táto práca sa zaoberá stanovením variantov génov úzko súvisiacich s rastom dlhých kostí. Sledovaný panel pozostáva z génov kódujúcich komponenty extracelulárnej matrix chondrocytov chrupavky (*ACAN*, *COL2A1*), gény zapojené v metabolickej dráhe GH/IGF1 (*GHR*, *STAT5B*, *IGF1*, *IGFALS*) a gény, ktoré kódujú receptory nevyhnutné pre správnu signalizáciu v tejto metabolickej dráhe (*IGF1R*, *NPR2*).

Okrem variantov v kódujúcich oblastiach, táto práca sleduje aj varianty v regulačných oblastiach génu *SHOX*. Ide o vzdialené konzervované nekódujúce DNA elementy (CNE), ktoré riadia transkripciu génu *SHOX*. Vyskytujú sa v „upstream“ (CNE-5, CNE-3, CNE-2) aj „downstream“ (CNE2, CNE3, CNE4, CNE5, CNE6, CNE7, CNE8 a CNE9) oblasti *SHOX* a kontrolujú génovú expresiu. Táto práca ako jedna z mála sleduje CNE na sekvenačnej úrovni.

Prítomnosť variantov je sledovaná v skupine 153 pacientov trpiacich rastovou reštrikciou. Varianty sú detegované pomocou sekvenovania novej generácie, platformami Illumina a Ion Torrent. Pozitívne a štatisticky významné záchyty sú následne overené pomocou Sangerovho sekvenovania a MLPA. V testovanom paneli génov sledujeme najmä frekvenciu, pozíciu a interpretáciu zachytených variantov. U CNE sú sledované najmä sekvenčné zmeny v novo identifikovaných variantoch.

2 Ciele práce

- a) Klinický popis pacientov s rastovou reštrikciou
- b) Popis vybraných génov a dráh ich produktov v kontexte rastu dlhých kostí
- c) Literárna rešerš možných terapeutických postupov u pacientov s rastovou reštrikciou
- d) Porovnanie klinických údajov nositeľov kandidátnych variantov s publikovanou literatúrou.
- e) Analýza zachytených variantov vo vybranom súbore génov u pacientov s rastovou reštrikciou

4 Literárny prehľad

4.1 Rastová reštrikcia

Rastová reštrikcia je, najmä v pediatrii, častou diagnózou. Nízky vzrast je definovaný ako výška presahujúca 2 smerodajné odchýlky (z angl. standard deviation, SD) pod zodpovedajúci priemer pre daný vek, pohlavie a populačnú skupinu (Andrade et al., 2023). Výpočtom SD-skóre je zodpovedaná otázka, o koľko smerodajných odchýlok je hodnotený parameter väčší, či menší než jeho priemerná hodnota. Z definície SDS vyplýva, že napr. u dieťaťa s priemernou hodnotou telesnej výšky, má SDS jeho výšky hodnotu nula. Dieťa, ktorého výška dosahuje +2,0 je výškou na hornej hranici širšej normy (presne 98. percentilu). Dieťa s SDS výšky rovným -2,0 je na dolnej hranici širšej normy, resp. na druhom percentile. Normalizované dáta sú dostupné s pravidelnou aktualizáciou na webe Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO child growth standards, 2024).

Príčiny nízkeho vzrastu sa delia na fyziologické a patologické. Medzi fyziologické patrí napr. konštitučné oneskorenie rastu a puberty alebo familiárne nízky vzrast, ktoré majú za následok až 80 % všetkých prípadov nízkeho vzrastu. Patologické príčiny zahŕňajú celú škálu ochorení, u ktorých môže byť nízky vzrast primárnym, ale aj sekundárnym prejavom. Rastová reštrikcia je primárnym prejavom skeletálnych dysplázií a dysmorfických syndrómov. Oba tieto stavy sú ovplyvňované genetickou výbavou dieťaťa. Ako sekundárny symptóm sa nízky vzrast vyskytuje u detí so systematickými alebo endokrinologickými ochoreniami. Systematické ochorenia spôsobujúce nízky vzrast sú napr. malnutricia, vrodené srdcové vady, Crohnova choroba, celiakia, cystická fibróza, chronické ochorenie pečene alebo zlyhanie obličiek. Najdôležitejšie endokrinologické ochorenie spájané s malým vzrastom je porucha tvorby rastového hormónu (z angl. growth hormone, GH) alebo insenzitivita organizmu voči tomuto hormónu. Ďalšími endokrinologickými príčinami rastovej reštrikcie sú hypotyreóza, Cushingov syndróm, diabetes mellitus 1. typu alebo rachitída (Patel et al., 2021).

Väčšina príčin nízkeho vzrastu je ľahko identifikovateľná, ale vyskytujú sa prípady, kedy dieťa trpí rastovou reštrikciou bez zjavnej príčiny. Takúto rastovú reštrikciu označujeme ako idiopaticky nízky vzrast (z angl. idiopathic short stature, ISS). Predpokladá sa, že väčšina z týchto prípadov má genetickú etiológiu, pretože rast je ovplyvnený veľkým množstvom génových transkriptov. (Zhou et al., 2021).

Súčasná technológia molekulárnej biológie už uľahčuje aj diagnostiku pacientov s ISS. Analýzu variantov panelu génov súvisiacich s nízkym vzrastom umožnil najmä výrazný pokrok v sekvenčných technikách, ktorými dokážeme identifikovať aj jednonukleotidové polymorfizmy (z angl. single nucleotide polymorphisms, SNPs) (Zhou et al., 2021).

4.2 Genetické varianty u človeka

Získanie referenčnej sekvencie ľudského genómu a objav lacnejších a rýchlejších sekvenačných technológií umožňuje sledovať variácie v exónoch, génoch alebo dokonca celých genómoch na personalizovanej úrovni. Sledovanie genetických variant pomáha nie len diagnostikovať doteraz idiopatické ochorenia, ale aj zacieliť liečbu pre špecifické potreby pacienta (Gonzaga-Jauregui et al., 2012).

Genetický variant je trvalá zmena v sekvencií DNA. Sekvencia variantného génu sa teda nezhoduje s referenčnou sekvenciou danou pre cieľový gén. Variant môže byť definovaný zmenou jedného nukleotidu alebo dlhšej sekvencie. Varianty môžu byť zdedené alebo sa môžu vytvoriť „*de novo*“ (MedlinePlus, 2023).

Dedičné varianty sa prenášajú z rodiča na potomka, *de novo* varianty sú detegované u dieťaťa, ale nie u žiadneho z rodičov. V niektorých prípadoch sa variant vyskytuje v oocyte alebo spermii rodičov, ale nie je prítomný v žiadnej z ich iných buniek (tzv. gonadálny mozaicizmus). V iných prípadoch sa variant vyskytuje v oplodnenom oocyte krátko po splnutí oocyty a spermie (MedlinePlus, 2023).

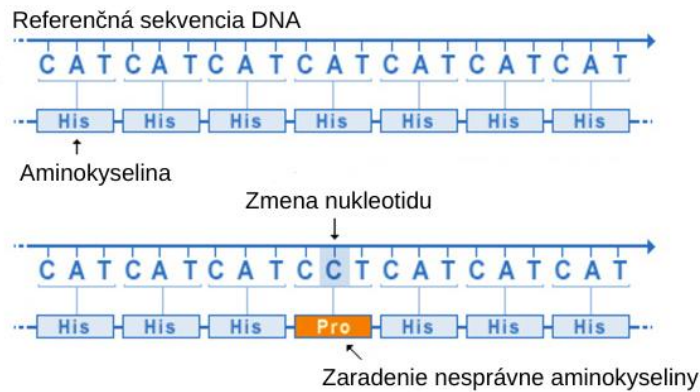
Väčšina variantov nevedie k rozvoju ochorenia a tie, ktoré áno, nie sú v bežnej populácii bežné. Niektoré varianty sa v populácii vyskytujú dostatočne často, aby sa mohli považovať za bežné genetické variácie. Hoci mnohé z týchto bežných variácií v DNA nemajú žiadne negatívne účinky na zdravie človeka, niektoré môžu ovplyvniť riziko vzniku určitých porúch (MedlinePlus, 2023).

Najfrekventovanejšími variantmi sú single nucleotide variants (SNV), pri ktorých sa sledovaná sekvencia líši od referenčného genómu len v jednom nukleotide. Každý genóm obsahuje asi 3,5 milióna SNV. Ďalšími častými variantmi sú indely, pri ktorých dochádza k inzercii alebo delécií jedného alebo viacerých nukleotidov. Najmenej častými variantmi sú štrukturálne varianty (tzv. copy number variants, CNV) (Marian, 2020).

Na základe zmeny v sledovanom gène rozlišujeme inzercie/ delécie, nesynonymické (missense, nonsense), synonymické, splice, regulačné, intronové a štrukturálne varianty (Marian, 2020).

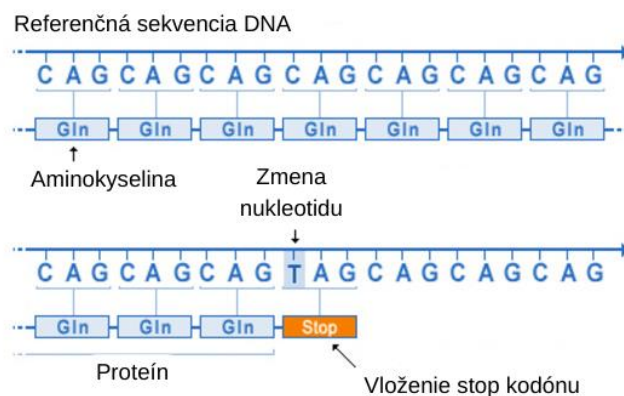
4.2.1 Nesynonymické varianty

Missense varianty sú substitučné varianty, pri ktorých zmena jediného nukleotidu vedie k nahradeniu alebo k zmene kódovanej aminokyseliny inou (viď Obrázok č. 1). Zmena aminokyseliny môže zmeniť funkciu celého kódovaného proteínu (MedlinePlus, 2023). Klinický význam missense variantov sa čiastočne odráža od roly novej aminokyseliny vo výslednom proteínovom produkte, prípadne významu aberovaného proteínu v rozvoji ochorení (Marian, 2020).



Obrázok č. 1: Princíp vzniku missense variantu (prevzaté a upravené z MedlinePlus, 2023).

Nonsense varianty sú substitučné varianty, u ktorých zámena nukleotidu v sekvencií DNA vedie k predčasnému spusteniu stop kodónu (viď Obrázok č. 2). Tento typ variantu vedie k tvorbe skráteného proteínu, ktorý môže fungovať nesprávne alebo úplne stratiť svoju funkciu (MedlinePlus, 2023). Takéto varianty tiež nazývame Loss of Function (LoF). Malá časť nonsense variantov môže viesť k strate stop kodónu, a teda k predĺženiu exprimovaného produktu. Transkripty exprimované z nonsense variantov sú zachytené kontrolnými mechanizmami a následne degradované (Marian, 2020). V nedávnej dobe boli tiež popísané mechanizmy, ktoré v niektorých prípadoch umožňujú pri translácii preskočiť nový stop kodón a dokončiť transláciu polypeptidového reťazca (Antonarakis et al., 2013).



Obrázok č. 2: Princíp vzniku nonsense variantu (prevzaté a upravené z MedlinePlus, 2023).

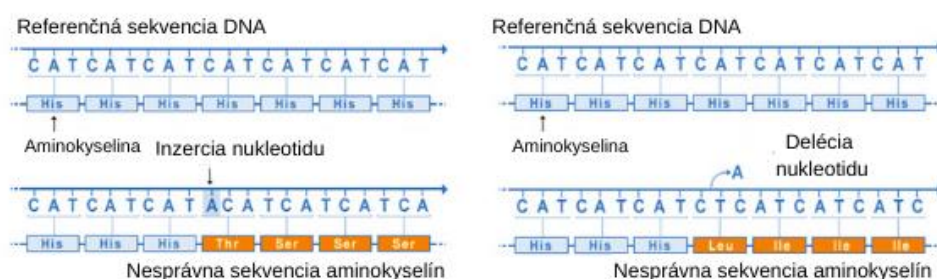
4.2.2 Synonymické varianty

Degradovanosť genetického kodónu umožňuje kódovanie jednej aminokyseliny viacerými tripletmi, preto v prípade synonymických variantov dochádza napriek zámene nukleotidu, k exprimácii pôvodne kódovanej aminokyseliny. Takéto varianty nazývame aj tiché, pretože nemajú žiaden funkčný

význam. Za výnimku považujeme synonymné varianty, ktoré sa nachádzajú blízko hranice exon/intron a môžu ovplyvniť zostrih mRNA molekuly (Marian, 2020).

4.2.3 Inzercie/delécie

Tento typ variantov je tiež známy ako indel a je druhý najčastejší v ľudskom genóme. Indely sú zapríčinené vložením alebo odstránením jedného, či viacerých nukleotidov (viď Obrázok č. 3). V závislosti na počte deletovaných nukleotidov môže, ale nemusí dochádzať k posunu čítacieho rámca. Od tejto skutočnosti sa najčastejšie aj odvíja klinický význam takéhoto variantu (Marian, 2020).



Obrázok č. 3: Princíp vzniku indelu (prevzaté a upravené z MedlinePlus, 2023).

4.2.4 Splice site variants

Väčšina ľudských génov zahŕňa regulačné oblasti, exóny a intróny. Hranice medzi exónmi a intrónmi sú definované špecifickými sekvenciami, ktoré sú rozpoznávané spliceozómom, čo následne vedie k vystrihnutiu intrónov a ligácii po sebe nasledujúcich exónov. Splice site varianty sa nachádzajú práve v sekvenciách rozpoznávaných spliceozómom, a tak narúšajú zostrih primárneho transkriptu. Splice site varianty môžu viesť k preskočeniu exónu, vynechaniu intrónu alebo k posunu v čítacom rámci (Marian, 2020).

4.2.5 Regulačné varianty

Regulačné varianty sa vyskytujú v regulačných oblastiach génu, napr. v promótorových, enhancerových a 3'/5' netranslatovaných (3'/5'UTR) regulačných sekvenciách. SNV lokalizované v 5' regulačných oblastiach ovplyvňujú afinitu transkripčných faktorov, a teda aj samotnú transkripciu mRNA (Marian, 2020). Patogénne varianty uložené v 3'UTR ovplyvňujú reguláciu spracovania, stability, translácie a lokalizácie mRNA (Romo et al., 2024). Následne narušenie enhancerov/silencerov môže viesť k dysregulácii génu, a to najmä v presnej reakcii na bunkové signály a environmentálne podnety (Huang et al., 2022).

4.2.6 Intrónové varianty

Genetické varianty nachádzajúce sa v intrónových oblastiach sú najpočetnejšie SNV s počtom asi 4 milióny na genóm. Biologické účinky intrónových variantov sú minimálne. Najväčšími

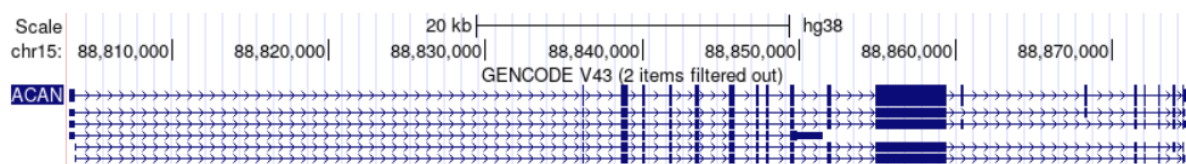
komplikáciami, ktoré môžu spôsobiť intrónové varianty sú napr. vytvorenie nového miesta zostrihu alebo ovplyvnenie regulačnej oblasti génu (Marian, 2020). V súčasnosti je veľkým limitom klinickej interpretácie týchto variantov absencia funkčných štúdií alebo aspoň spoľahlivých predikčných nástrojov, ktoré by odhadli ich význam (Ellingford et al., 2022).

4.2.7 Štrukturálne varianty

Veľké indely, typicky s veľkosťou viac ako 1 kb, a génomové preskupenia sa označujú ako štrukturálne varianty. Existuje široká škála štrukturálnych variantov, vrátane delécie, inzercie, inverzie, translokácie, variabilného počtu tandemových opakovaní alebo duplikácie. Klinická závažnosť štrukturálnych variantov sa odvíja od ich veľkosti a umiestnenia (Marian, 2020).

4.3 *ACAN*

ACAN je gén kódujúci agrekán. Nachádza sa na 15. chromozóme a je veľký 71 912 bp (viď Obrázok č. 4). Celý gén obsahuje 19 exónov a bol identifikovaný v 7 rôznych transkriptoch (NCBI Gene, 2023). K jeho expresii dochádza najmä v mozgu a semenníkoch (Wu et al., 2023).



Obrázok č. 4: Diagram génu *ACAN* (prevzaté z UCSC Genome Browser on Human, 2023).

Agrekán je proteoglykán, ktorý tvorí hlavnú zložku extracelulárnej matrix chrupavky (Lin et al., 2021). Je nevyhnutný pre správny vývoj kostry a funkciu chrupavky. Umožňuje rovnomerné rozloženie tlaku na celý povrch kĺbu. Úplná absencia agrekánu v organizme nie je zlučiteľná so životom, pretože spôsobuje závažnú chondrodyspláziu (Stattin et al., 2022).

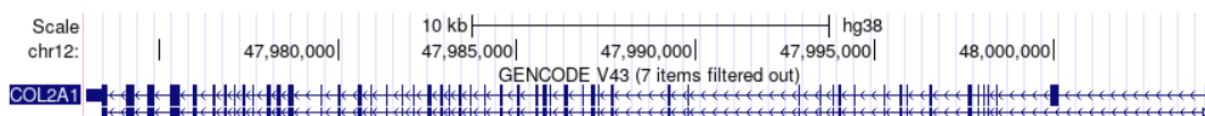
Rôzne varianty *ACAN* sú spojené s dedičnými poruchami rastu kostí, a teda aj s nízkym vzrastom. Prítomnosť patologických variant *ACAN* bola detegovaná u pacientov so spondyloepifyzárnou dyspláziou, typu Kimberley (OMIM 608361, autozómovo dominantná dedičnosť) alebo u pacientov so spondyloepimetafyzárnou dyspláziou agrekánového typu (OMIM 612813, autozómovo recesívna dedičnosť). Varianty neznámeho významu (z angl. variant of uncertain significance, VUS) sú podozrivé z rozvoja miernejších fenotypových prejavov, ako je práve ISS (Stattin et al., 2022).

V súčasnosti je predmetom intenzívneho výskumu najmä možnosť použitia GH na liečbu nízkeho vzrastu vyvolaného rôznymi variantami génu *ACAN*. Aktuálne poznatky naznačujú, že podávanie GH by malo znížiť deficit vo výške pacienta. Metabolické dráhy *ACAN* a *GH* sú úzko

prepojené a patologické varianty *ACAN* negatívne ovplyvňujú odpoveď organizmu na GH produkovaný telom (Wu et al., 2023).

4.4 *COL2A1*

Gén *COL2A1* kóduje α -1 reťazec kolagénu II a nachádza sa na chromozóme 12. Gén pokrýva oblasť o veľkosti 31 538 bp a obsahuje 57 exónov (viď Obrázok č. 5). Najvyššie hladiny expresie dosahuje v semenníkoch, prostate a žalúdku (NCBI Gene, 2023).



Obrázok č. 5: Diagram génu *COL2A1* (prevzaté z UCSC Genome Browser on Human, 2023).

Kolagén typu II má helikálnu štruktúru a je tvorený trojicou α -1 reťazcov zosieťovaných vláknami podobných kolagénovým fibrilám (viď Obrázok č. 6). Kolagén II je syntetizovaný proliferujúcimi chondrocytmi, ktoré plnia funkciu štruktúrálnej matrice chrupavky a regulačnú funkciu prostredníctvom účasti na interakcii a prenose signálu v dráhach BMP-SMAD1, ktoré ovplyvňujú diferenciáciu chondrocytov (Markova et al., 2022).



Obrázok č. 6: Model štruktúry α -1 reťazca kolagénu typu II (prevzaté z GeneCards: The Human Gene Database, 2023).

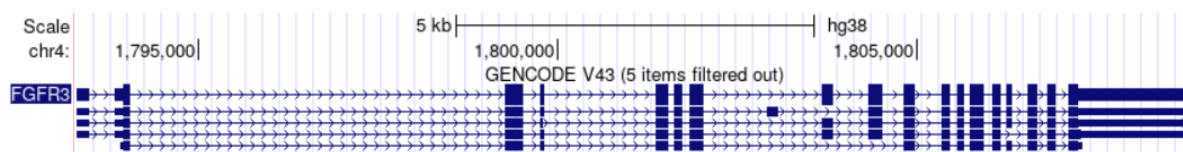
COL2A1 má veľké množstvo popísaných variantov, väčšina z nich sú missense alebo LoF varianty. Väčšina patologických variantov *COL2A1* nesie zmenu v trojhelikálnej oblasti kolagénového reťazca. Missense varianty v tejto oblasti spôsobujú závažné fenotypy, ako sú Kniestova dysplázia (OMIM 156550, autozómovo dominantná dedičnosť) alebo spondyloepifyzárna dysplázia (OMIM 616583, autozómovo dominantná dedičnosť). Varianty so stratou funkcie sa prejavujú

miernejším fenotypom. Príkladom ochorenia spôsobeného takýmto variantom je Sticklerov syndróm (OMIM 108300, autozómovo dominantná dedičnosť). Vo všeobecnosti sú patologické varianty *COL2A1* spojené so skeletálnymi poruchami, očnými anomáliami a sluchovým postihnutím (Demal et al., 2022).

Skeletálne poruchy spôsobené patologickými variantmi *COL2A1* sa často prejavujú aj nízkym vzrastom. Dáta k liečbe nízkeho vzrastu zapríčineného patologickým variantom *COL2A1* pomocou rekombinantného rastového hormónu (rhGH) sú limitované. Súčasne dostupné dáta však indikujú, že terapia pomocou rhGH by mohla byť prospešná (Chen et al., 2022).

4.5 *FGFR3*

FGFR3 je gén kódujúci fibroblast growth factor receptor-3. Ide o vysoko konzervovaný gén, ktorý sa nachádza na chromozóme 4. Má veľkosť 15 561 bp a nesie 19 exónov (vid' Obrázok č. 7). Vyskytuje sa v 4 izoformách a exprimuje sa najmä v koži (NCBI Gene, 2023).



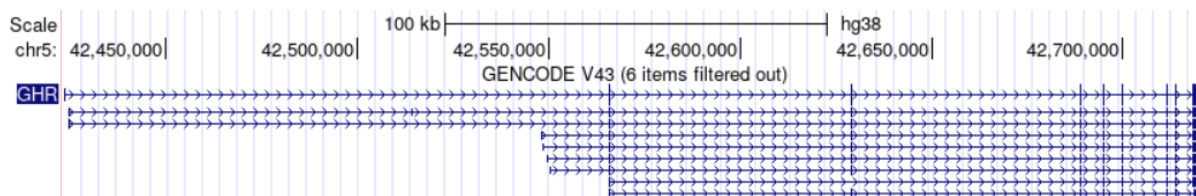
Obrázok č. 7: Diagram génu *FGFR3* (prevzaté z UCSC Genome Browser on Human, 2023).

Fibroblast growth factor receptor-3 je receptorová tyrozínkináza, ktorá patrí do rodiny fibroblastových rastových faktorov. Tieto rastové faktory sú vo všeobecnosti charakteristické extracelulárnou ligand väzobnou doménou zloženou z troch subdomén, transmembránovou doménou a vnútrobunkovou tyrozínkinázovou doménou (Sun et al., 2021). Transkript génu *FGFR3* slúži ako negatívny regulátor chondrogenézy rastových platničiek. Preto rôzne varianty génov ovplyvňujú najmä vzrast pacienta. V prípade vzniku mutácie v tomto gène môže dôjsť k zníženiu proliferácie chondrocytov, zrýchleniu nástupu hypertrofickej diferenciácie, zmenšeniu hypertrofických chondrocytov alebo zníženiu produkcie matrice. Tieto zmeny vedú k inhibícii rastu dlhých kostí, čo vedie k skeletálnym dyspláziam. Najlepšie preskúmanými skeletálnymi dyspláziami spôsobenými variantom génu *FGFR3* sú hypochondroplazia (OMIM 146000, autozómovo dominantná dedičnosť) a achondroplazia (OMIM 100800, autozómovo dominantná dedičnosť) (Kang, 2017).

Liečba pacientov s patogénnymi variantmi *FGFR3* pomocou rhGH sa ukazuje ako úspešná, avšak v asi 3x väčších dávkach ako sú podávané pri bežnej liečbe pomocou rhGH. Dlhodobé podávanie rhGH takýmto pacientom umožňuje v dospelosti dosiahnuť priemernú fyziologickú výšku (Sun et al., 2021).

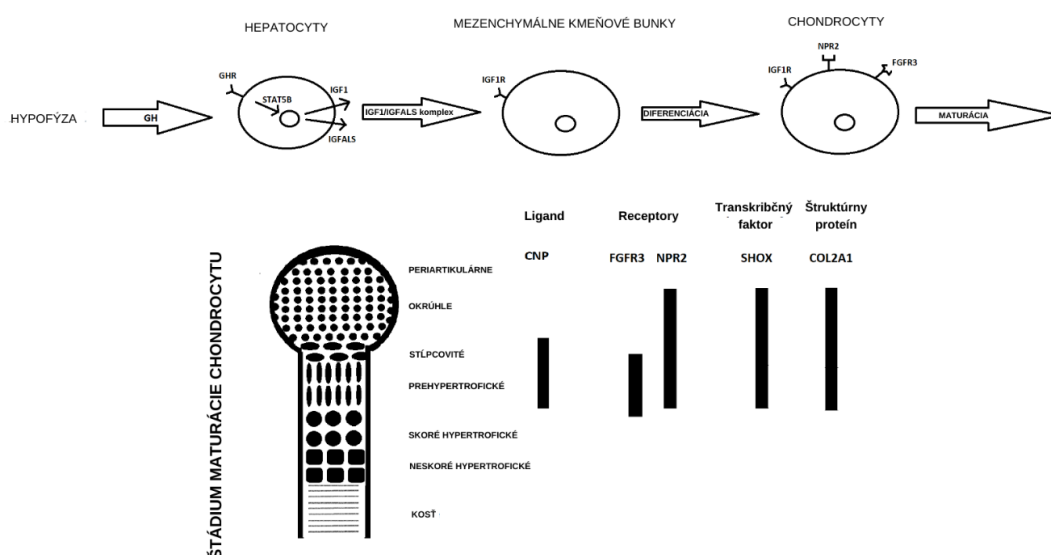
4.6 GHR

Gén *GHR* kóduje transmembránový cytokínový receptor typu I, ktorý viaže GH. Gén sa nachádza na 5. chromozóme a má veľkosť 1 167 bp (viď Obrázok č. 8). *GHR* nesie 18 exónov a exprimuje sa najmä v pečeni a tuku (NCBI Gene, 2023).



Obrázok č. 8: Diagram génu *GHR* (prevzaté z UCSC Genome Browser on Human, 2023).

GHR je kľúčový receptor pre rast pacienta (viď Obrázok č. 9). Správna distribúcia GH je závislá od dostupnosti tohto receptora na povrch cieľových buniek (Dias et al., 2017). GH je produkovaný v hypofýze a naviazaním na *GHR* v pečeni reguluje produkciu IGF1. Po naviazaní na *GHR* je aktivovaná kináza Jak2, ktorá následne aktivuje STAT5 jeho fosforyláciou. STAT5 je transportovaný do jadra bunky, kde aktivuje transkripciu génov *IGF1* a *IGFALS* (Baik et al., 2011). Prítomnosť IGF1 prospieva k chondrogenickej diferenciácii mezenchymálnych kmeňových buniek, syntéze proteoglykánu v chondrocytoch a tiež stimuluje proliferáciu chondrocytov aktiváciou PI3K a MEK/ERK metabolických dráh (Wen et al., 2021). Natriuretický peptid typu C (CNP) a jeho receptory – NPR2 – sú taktiež exprimované vplyvom IGF-1. CNP patria medzi dôležité regulátory rastu a homeostázy dlhých kostí (Shuhaibar et al., 2021).

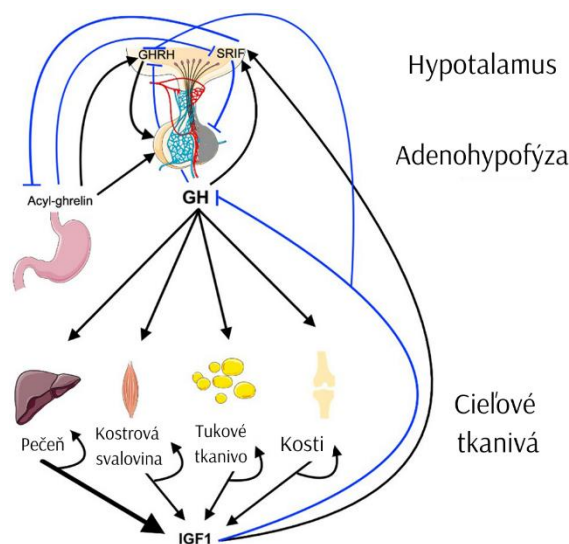


Obrázok č. 9: Schematické zobrazenie roly vybraných génov v raste kostí (prevzaté a upravené zo Spurná et al., 2024).

Prítomnosť dysfunkčného *GHR* teda zapríčiňuje nesprávnu reakciu organizmu na syntetizovaný GH – insenzitivita na rastový hormón (z angl. growth hormone insensitivity, GHI). V závislosti na prítomnom variante môže dochádzať k nízkemu vzrastu, zníženej minerálnej hustote kostí, adipozite, kardiovaskulárnym ochoreniam alebo väčšiemu riziku nástupu osteoporózy (Dias et al., 2017).

GHI (OMIM 604271, autozómovo dominantná dedičnosť) je skupina ochorení, ktoré sú charakterizované aspoň čiastočne dysfunkčnou biologickou reakciou na GH. GHI môže byť zapríčinená primárnymi dôvodmi – defekty v génoch kódujúcich proteíny nevyhnutné pre metabolickú dráhu GH – alebo sekundárnymi dôvodmi, ako sú zápalové ochorenia a nutričné poruchy. Základným prejavom primárnych dôvodov GHI je normálna alebo zvýšená hladina GH, ale znížená hladina IGF-1. GHI spôsobené genetickým defektom vedie k nízkemu vzrastu (Savage et al., 2018). Úplná necitlivosť GHR na rastový hormón sa prejavuje ako Laronov syndróm (OMIM 262500, autozómovo recesívna dedičnosť). Toto ochorenie je svojimi klinickými prejavmi zhodné s prejavmi deficiencie GH. Prejavuje sa nízkym vzrastom, obezitou, hypoglykémiou, dyslipidémiou, oneskoreným nástupom puberty a oneskoreným kostným vekom (Boro et al., 2021).

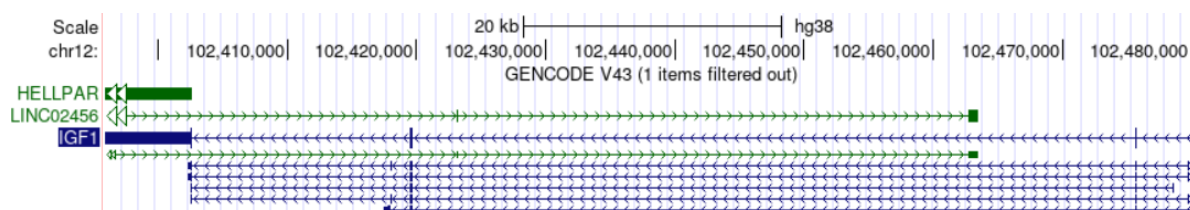
Terapia pomocou rhGH je v prípade negatívnych variant *GHR* prevažne neúčinná. Spôsobené je to najmä tým, že rôzne mutácie v *GHR* môžu viesť k insenzitivite organizmu na GH. Štúdie však ukazujú, že riešením tohto problému by mohol byť rekombinantný ľudský insuline like growth factor-1 (rhIGF1), ktorý je hlavným produktom interakcie *GHR* s rastovým hormónom (viď Obrázok č. 10) (Savage et al., 2021).



Obrázok č. 10: Metabolická dráha GH/IGF1. Sekrécia GH je aktivovaná pomocou GH-releasing hormone (GHRH, čierne šípky), ktorého sekréciu spúšťa acyl-ghrelin, žalúdočný peptid. Acyl-ghrelin tiež potláča aktivitu somatostatínu (SRIF, modré čiary), inhibítora sekrécie GH. Keď sa GH dostane do obehu, pôsobí priamo v niekoľkých orgánoch a tkanivách, vrátane pečene, kde sprostredkováva produkciu IGF1 (prevzaté a upravené z Kaur et al., 2021).

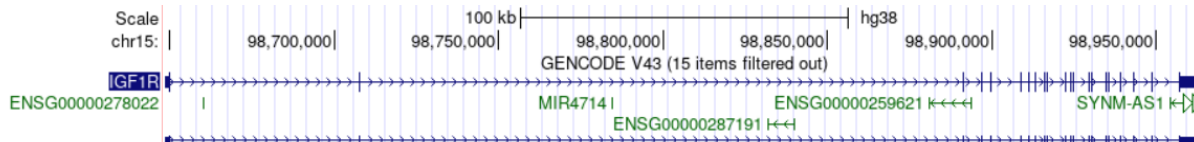
4.7 *IGF1*, *IGF1R*, *IGFALS*

IGF1 je gén kódujúci insulin like growth factor-1, čo je proteín s funkciou a štruktúrou podobnou inzulínu, ktorý má kľúčovú úlohu v raste a vývoji človeka. *IGF1* sa nachádza v chromozóme 12 a má veľkosť 62 925 bp (viď Obrázok č. 11). *IGF1* má 7 exónov a najviac je exprimovaný v tuku, pečeni a prostate (NCBI Gene, 2023).



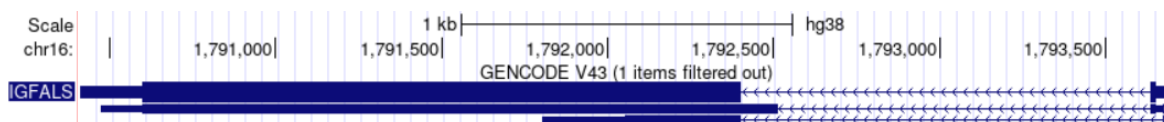
Obrázok č. 11: Diagram génu *IGF1* (prevzaté z UCSC Genome Browser on Human, 2023).

Gén *IGF1R* kóduje insulin like growth factor-1 receptor. Tento receptor má tyrozínkinázovú aktivitu a jeho ligandom je *IGF1*. Nachádza sa na chromozóme 15 a zaberá miesto o veľkosti 314 999 bp (viď Obrázok č. 12). Nesie 25 exónov a jeho exprimácia je najintenzívnejšia v tkanivách obličiek, vaječníkov a prostaty (NCBI Gene, 2023).



Obrázok č. 12: Diagram génu *IGF1R* (prevzaté z UCSC Genome Browser on Human, 2023).

IGFALS kóduje proteín insulin like growth factor binding protein acid-labile subunit, ktorý sa v sére viaže na *IGF1*. *IGFALS* sa nachádza na 16. chromozóme a má veľkosť 3 321 bp (viď Obrázok č. 13). Gén nesie 3 exóny a exprimuje sa najmä v pečeni (NCBI Gene, 2023).



Obrázok č. 13: Diagram génu *IGFALS* (prevzaté z UCSC Genome Browser on Human, 2023).

IGF1, *IGF1R* a *IGFALS* sú úzko späté a spolu zabezpečujú intrauterínny aj postnatálny rast. Najčastejším problémom spojeným s *IGF1* je jeho deficiencia (OMIM 608747, autozómovo recesívna dedičnosť). IGF-1 deficiencia je spôsobená prítomnosťou patogénneho genetického variantu *IGF1*

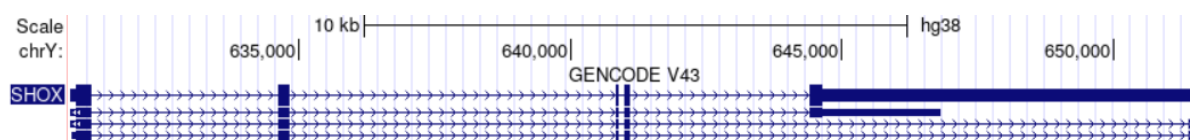
(Domené et al., 2018). V prípade homozygotnej mutácie v *IGF1* dochádza okrem rastovej retardácie aj k mentálnemu postihnutiu, senzorineurálnu hluchote a dysmorfii rôznej severity (Fadel et al., 2021).

Patogénne varianty *IGF1R* spôsobujú IGF-1 rezistenciu (OMIM 270450, autozómovo dominantná aj recesívna dedičnosť). Rezistencia IGF1R k jeho ligandu môže byť vysvetlená receptorovou haploinsuficienciou, zníženou biosyntézou receptora, zníženou afinitou k ligandu alebo narušením transmembránovej signalizácie. Rezistencia *IGF1R* je vždy len čiastočná. Úplná rezistencia na IGF-1 by bola letálna (Domené et al., 2018).

Patogénny variant *IGFALS* sa prejavuje acid-labile subunit deficienciou (OMIM 615961, autozómovo recesívna dedičnosť), čo priamo ovplyvňuje aj hladinu *IGF1* v organizme. Acid-labile subunit (ALS) je kľúčovým proteínom pre cirkuláciu väčšiny IGFs v ľudskom tele. Naviazaním IGF-1 na ALS sa predĺži jeho životnosť v organizme z 10 minút na viac ako 12 hodín (Domené et al., 2018).

4.8 *SHOX*

Gén *SHOX* sa nachádza na pseudoautozomálnej oblasti (PAR1) oboch pohlavných chromozómov a kóduje short stature homeobox. Má veľkosť 22 480 bp a nesie 7 exónov (viď Obrázok č. 14). Najintenzívnejšie dochádza k jeho expresii v tukovom tkanive (NCBI Gene, 2023).



Obrázok č. 14: Diagram génu *SHOX* (prevzaté z UCSC Genome Browser on Human, 2023).

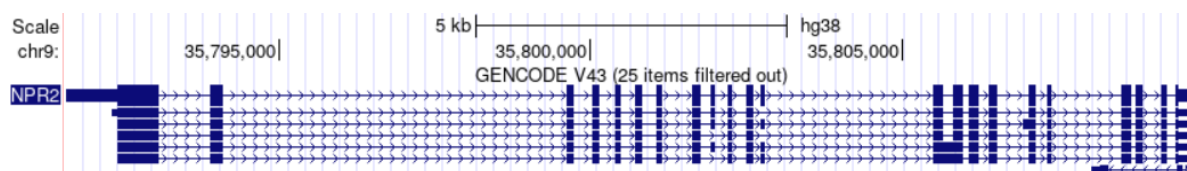
SHOX kóduje jadrový proteín, ktorý je dôležitým transkripčným faktorom pri vývoji končatín. V prípade straty oboch kópií génu *SHOX* dochádza k vývoju Langerovej mezomelickej dysplázie (OMIM 249700, pseudoautozómovo recesívna dedičnosť). Haploinsuficiencia tohto génu vedie k širokému spektru fenotypov, pričom všetky sa spájajú s nízkym vzrastom. Najčastejšími ochoreniami spôsobenými defektom génu *SHOX* sú, Léri-Weill syndróm (OMIM 127300, pseudoautozómovo dominantná dedičnosť) a idiopaticky nízky vzrast (OMIM 300582). Aberácie génu *SHOX* sú často nápadné Madelungovou deformitou (Kozin et al., 2015). V majorite prípadov patologických fenotypov spôsobených génom *SHOX* boli detegované mutácie, nie len v kódujúcej oblasti génu, ale aj v jeho regulačných oblastiach - CNE (z angl. conserved non-coding elements) (Gürsoy et al., 2020).

Transkripcia génu *SHOX* je regulovaná vzdialenými regulačnými prvkami CNE. Ide o vysoko konzervované oblasti nachádzajúce sa v „upstream“ (CNE-2, CNE-3, CNE-5) a „downstream“ (CNE2, CNE3, CNE4, CNE5, CNE6, CNE7, CNE8, CNE9) oblasti génu, ktoré pôsobia ako transkripčné „enhancery“. Regulačné oblasti zabezpečujú správnu funkciu *SHOX*, ktorého fyziologická funkcia je vysoko ovplyvňovaná génovou dávkou (Babu et al., 2021).

Terapia rastovým hormónom u detí s defektným variantom génu *SHOX* bola schválená úradmi a patrí medzi rutinné liečebné postupy. Úspešnosť tejto liečby je rozdielna a závisí na type variantu, ktorý si pacient nesie (Ungureanu et al., 2023). Prípadná prítomnosť Madelungovej deformity je štandardne napravovaná chirurgicky (Kozin et al., 2015).

4.9 *NPR2*

Gén *NPR2* kóduje proteínový produkt natriuretic peptide receptor-2. Nachádza sa na 9. chromozóme, kde zaberá oblasť o veľkosti 17 323 bp (viď Obrázok č. 15). Gén obsahuje 22 exónov a jeho expresia je najintenzívnejšia v sliznici maternice a tukovom tkanive (NCBI Gene, 2023).



Obrázok č. 15: Diagram génu *NPR2* (prevzaté z UCSC Genome Browser on Human, 2023).

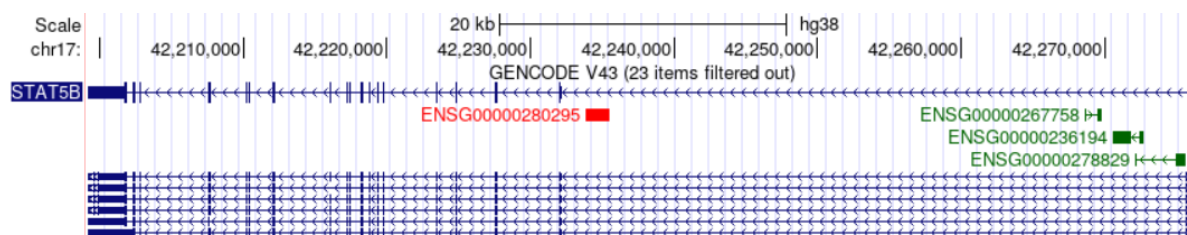
NPR2 má kľúčovú rolu v morfogénéze chrupaviek a kostí. Transkript tohto génu patrí medzi transmembránové receptory natriuretického peptidu typu C (CNP). Receptor je zložený z 5 domén, ktoré majú okrem CNP-väzbovej funkcie aj funkciu tyrozínkinázovú, coil-coil a guanylát cyklázovú funkciu. *NPR2* teda riadi základné bunkové procesy ako je proliferácia a diferenciácia buniek (Li et al., 2022).

Bialelické patogénne varianty v géne *NPR2* spôsobujú akromezomelickú dyspláziu typu Maroteaux (OMIM 602875, autozómovo recesívna dedičnosť), ktorá je charakterizovaná výškou -5 SD pod priemernou výškou typickou pre vek a pohlavie pacienta a kostnými deformáciami. Na druhej strane heterozygotné patogénne varianty *NPR2* vedú k miernejším poruchám rastu, väčšinou klasifikovaným ako ISS, hoci niektorí z postihnutých jedincov môžu vykazovať mierne príznaky kostnej dysplázie (Stavber et al., 2022).

Terapia rhGH v prípade variantov *NPR2* má zmiešané výsledky. Sú štúdie, ktoré účinky tejto liečby spochybňujú a iné, ktoré túto liečbu považujú za úspešnú. Dôvodom je pravdepodobne vek, v ktorom začne byť rhGH podávaný. Väčšina štúdií ukazuje, že ak sa začne rhGH podávať v prepubertálnom veku, vzrast pacienta sa zlepší. V prípade podávania rhGH v pubertálnom veku sú účinky tejto liečby zanedbateľné (Plachy et al., 2020).

4.10 *STAT5B*

STAT5B kóduje proteín signal transducer and activator of transcription 5B. Leží na 17. chromozóme a má 22 exónov (vid' Obrázok č.16). Gén *STAT5B* má veľkosť 77 230 bp a exprimovaný je najmä v tukovom tkanive, vaječníkoch a sliznici maternice (NCBI Gene, 2023).



Obrázok č. 16: Diagram génu *STAT5B* (prevzaté z UCSC Genome Browser on Human, 2023).

STAT5B je jeden zo štyroch STAT (STAT1, 3, 5A a 5B) cytosolických proteínov, ktorého prítomnosť je regulovaná GHR-JAK2 metabolickou dráhou. Tento proteín je zodpovedný za funkciu viacerých rastových faktorov a cytokínov (Hwa, 2021). Je zodpovedný za indukciu exprese niekoľkých génov stimulovaných GHR, ako je *IGF1*, jeho väzbový proteín (*IGFBP-3*) a *IGFALS* (Andrade et al., 2023).

Klinickým fenotypom spájaným s patogenitou *STAT5B* je necitlivosť na GH spájaná s imunitnou dysreguláciou (OMIM 245590, autozómovo recesívna dedičnosť). Pacienti s molekulárnymi defektmi *STAT5B* majú rovnaké klinické prejavy ako pacienti s dysfunkčným *GHR* (Hwa, 2021). Varianty *STAT5B* sú spájané s necitlivosťou k rastovému hormónu (GHI) a k deficienciám IGF-1. Tieto skutočnosti sa fenotypovo prejavujú retardáciou postnatálneho rastu, ale aj imunitnou deficienciou (Storr et al., 2019).

4.11 Molekulárne diagnostické metódy analýzy pacientov s nízkym vzrastom

4.11.1 Sekvenovanie novej generácie - platforma Illumina

V rokoch 2004 až 2006 vznikli technológie sekvenovania novej generácie (z angl. next generation sequencing, NGS), čo viedlo k rapídному zvýšeniu množstva sekvenčných dát. Pre NGS je charakteristické paralelné spracovanie viacerých génov, vysoká rýchlosť analýzy, nízka cena a detekcia výsledkov bez potreby kapilárnej elektroforézy (Hu et al., 2021).

Illumina sekvenovanie patrí medzi NGS metódy a pozostáva z troch hlavných krokov – príprava sekvenačnej knižnice, sekvenovanie a analýza dát. Príprava sekvenačnej knižnice začína fragmentáciou sledovanej vzorky DNA a pridaním adaptérov na oba konce DNA vlákna. Adaptéry obsahujú sekvencie kompatibilné s oligonukleotidmi prítomnými na flow cell, a teda umožňujú naviazanie vzorky na Illumina flow cell. V prípade potreby paralelného sekvenovania

viacerých knižníc, je možné okrem adaptéra, na jednotlivé DNA reťazce naviazať aj indexové sekvencie. Tie slúžia na rozlíšenie jednotlivých knižníc v multiplexovej sekvenačnej reakcii (Illumina, 2023).

V ďalšom kroku dochádza k nanieseniu sekvenačnej knižnice na flow cell a následne k samotnej sekvenácii. DNA je amplifikovaná za vzniku clusterov – miliónov identických kópií jednovláknovej DNA. Samotná sekvenácia prebieha priradovaním nukleotidov k jednovláknovej DNA na základe komplementarity. Nukleotidy sú fluorescenčne značené a nesú reverzibilný terminátor, ktorý sa z vlákna odštiepi po zaznamenaní fluorescencie. Po prečítaní forward vlákna, sú ready odmyté a proces je zopakovaný s reverse vláknami. Na záver softvér priradí k fluorescenčným značkám príslušné nukleotidy (Illumina, 2023).

Najväčšou nevýhodou technológie Illumina je dlhý čas sekvenovania, ktorý môže dosiahnuť až 56 h. Napriek vysokej presnosti sekvenovania týmto systémom, môže dochádzať k chybným identifikáciám jednotlivých nukleotidov v homopolymérnych úsekoch a v koncových úsekoch vlákna DNA, kde dochádza k nízkemu počtu prečítaní (Hu et al., 2021).

4.11.2 Sekvenovanie novej generácie – platforma Ion Torrent

Ion Torrent je sekvenačná technológia, pri ktorej sa nedeteguje fluorescencia ako u väčšiny sekvenačných technológií, ale deteguje sa zmena hodnoty pH. Princíp metódy je založený na mechanizme inkorporácie dusíkatých báz do DNA reťazca. Pri naviazaní novej bázy do reťazca dôjde k odštiepeniu H^+ , čo je pri sekvenovaní zaznamenané ako zmena elektrického napätia (Thermo Fisher, 2024).

Platforma Ion Torrent využíva chip, na ktorom je umiestnená sada mikrojamiiek. Každá jamka na svojom dne obsahuje identické fragmenty denaturovaného templátu DNA. Do mikrojamiiek sú jedna za druhou aplikované všetky štyri bázy. V prípade, že v niektorej z jamiiek dôjde k naviazaniu bázy, odštiepi sa H^+ , čo zmení hodnotu pH v jamke. Zmena pH je zaznamenaná senzorom na dne jamky a prevedená na elektrické napätie. Veľkosť nameraného elektrického napätia je priamo úmerná počtu naviazaných nukleotidov (Kchouk et al., 2017).

Ion Torrent umožňuje čítať sekvencie o dĺžke 200 bp, 400 bp a 600 bp. Hlavnou výhodou tejto technológie je práve možnosť analýzy dlhých sekvencií a vysoká rýchlosť sekvenovania. Nevýhodou platformy Ion Torrent je vysoká chybovosť v homopolymérnych sekvenciách, kde chybný base calling môže spôsobiť falošnú identifikáciu indelov (Kchouk et al., 2017).

4.11.3 Stanovenie patogenity

Patogenita nájdených variantov je klasifikovaná do piatich kategórií – benígne, pravdepodobne benígne, klinicky neznámeho významu, pravdepodobne patogénne a patogénne. Stanovenie kategórie sa vykonáva na základe ACMG kritérií (z angl. American College of Medical Genetics and Genomics), frekvencie varianty, dostupných informácií v genetických databázach (t. j. klinické/funkčné štúdie alebo

predchádzajúce hodnotenie iných laboratórií), dostupných literárnych zdrojov a na základe *in silico* predikčných nástrojov (napr. SIFT, PolyPhen, REVEL, EIGEN, PROVEAN, MutPred a pod.) (Richards et al., 2015).

4.11.4 Sangerovo sekvenovanie

Sangerovo sekvenovanie je metóda slúžiaca na určenie nukleotidovej sekvencie reťazca DNA. Metódu vyvinul dvojnásobný laureát Nobelovej ceny Frederick Sanger a jeho kolegovia v roku 1977 (MERCK, 2023).

Prvým krokom sekvenovania je amplifikácia cieľového génu pomocou PCR. V reakčnej zmesi sa okrem klasických komponentov (DNA, DNA polymeráza, primery, dNTPs) nachádzajú aj značené dideoxyribonukleotidy (ddNTPs). Tie nemajú na svojom 3' konci -OH skupinu, a tak DNA polymeráza nie je schopná na ne naviazať ďalší nukleotid. DNA reťazec, na ktorý sa naviaže ddNTP sa už teda ďalej nepredlžuje a jeho amplifikácia je terminovaná. Takto vzniknú DNA reťazce o rôznej dĺžke, zakončené fluorescenčne značeným ddNTP (MERCK, 2023).

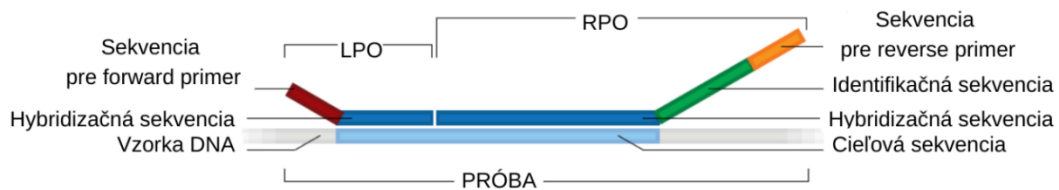
V druhom kroku sú amplikony rozdelené pomocou kapilárnej elektroforézy. Keďže všetky amplikony DNA majú rovnaký náboj, rýchlosť, ktorou sa oligonukleotidy pohybujú, bude ovplyvnená iba ich veľkosťou. Čím je DNA reťazec kratší, tým rýchlejšie sa bude v kapiláre pohybovať. Výsledkom budú teda oligonukleotidy zoradené od najkratšieho po najdlhší (MERCK, 2023).

Posledným krokom je detekcia fluorescenčne značených ddNTPs na základe ktorej je identifikovaný konkrétny ddNTP. Fluorescenčná značka je excitovaná pomocou laseru a detektor deteguje výsledné vyžarované svetlo. Pretože každý zo štyroch ddNTP je označený inou fluorescenčnou značkou, vyžarované svetlo môže byť priamo spojené s identitou koncového ddNTP. Výstupom je chromatogram, ktorý ukazuje fluorescenčný pík každého identifikovaného nukleotidu (MERCK, 2023).

Sangerovo sekvenovanie má hlavnú výhodu vo svojej schopnosti sledovať poradie nukleotidov v konkrétnom mieste DNA s vysokou spoľahlivosťou a robustnosťou. Avšak, táto analýza je obmedzená na úseky DNA s maximálnou dĺžkou 1000 nt. Pre analýzu celých génov je preto potrebné vykonať viacero reakcií, čo zvyšuje cenu a časovú náročnosť metódy. Okrem toho, Sangerovo sekvenovanie nie je vhodné na detekciu väčších zmien, ako napríklad copy number variations (CNV), balansovaných zmien a iné (Hu et al., 2021).

4.11.5 Multiplex ligation-dependent probe amplification

Multiplex ligation-dependent probe amplification, skrátené MLPA, je diagnostická metóda, ktorá umožňuje detegovať zmeny (CNV, target SNP) v sekvenciách DNA. Využíva špecifické próby zložené z dvoch častí (LPO a RPO). MLPA próby sa skladajú z troch druhov sekvencií – hybridizačná sekvencia, primerová sekvencia a identifikačná sekvencia, ktorá má pre každý druh próby jedinečný počet nukleotidov (viď Obrázok č. 17).



Obrázok č. 17: Stavba prôb používaných v metóde MLPA (prevzaté a upravené z MRC Holland, 2023).

Prvým krokom metódy je DNA denaturácia a hybridizácia prôb. Denaturovaná vzorka je hybridizovaná s LPO a RPO, ktoré nasadajú na analyzovanú DNA hybridizačnou sekvenciou na základe komplementarity. Vzdialenosť medzi LPO a RPO je vždy jeden nukleotid (MRC Holland, 2023).

Následne je do reakcie pridaná vysoko špecifická DNA ligáza, ktorá spojí správne nahybridizované LPO s RPO za vzniku jednej sekvencie. V prípade prítomnosti CNV alebo SNP próby nenasadnú na sledovanú sekvenciu správne, a tak k ligácii nedôjde. Ligované sondy sú amplifikované pomocou univerzálneho, fluorescenčne značeného primeru, komplementárneho k primerovej sekvencii prôb. Amplifikované fragmenty sú separované pomocou kapilárnej elektroforézy. Počet kópií je priamo úmerný výške píku. Výsledný elektroferogram je následne porovnaný s referenčnou vzorkou (MRC Holland, 2023).

5 Materiál a metódy

5.1 Biologický materiál

Na účely analýzy boli použité vzorky DNA izolované z periférnej krvi, ktorá bola odobraná pacientom Ústavu lekárskej genetiky vo Fakultnej nemocnici Olomouc. DNA bola z periférnej krvi izolovaná pomocou prístroja QIAcube (Qiagen). Pacienti, ktorých vzorky boli na analýzu použité podpísali informovaný súhlas s genetickým testovaním.

5.2 Použité chemikálie, súpravy a roztoky

Použité chemikálie

- Tris-HCl (Thermo Fisher, katalógové číslo J22638.AP)
- DMSO (Sigma-Aldrich, katalógové číslo W387520)
- Human Cot-1 DNA (Invitrogen, katalógové číslo 15279011)
- Agaróza (VWR Chemicals, katalógové číslo 438795A)
- Primer KAPA hyperchoice MAX 0,5 Mb T2 (Roche, custom)
- Primer CNE-5 F (Sigma-Aldrich, custom)
- Primer CNE-5 R (Sigma-Aldrich, custom)
- Primer CNE-3 F (Sigma-Aldrich, custom)
- Primer CNE-3 R (Sigma-Aldrich, custom)
- Primer CNE-2 F (Sigma-Aldrich, custom)
- Primer CNE-2 R (Sigma-Aldrich, custom)
- Primer CNE2 F (Sigma-Aldrich, custom)
- Primer CNE2 R (Sigma-Aldrich, custom)
- Primer CNE3 F (Sigma-Aldrich, custom)
- Primer CNE3 R (Sigma-Aldrich, custom)
- Primer CNE4 F (Sigma-Aldrich, custom)
- Primer CNE4 R (Sigma-Aldrich, custom)
- Primer CNE5 F (Sigma-Aldrich, custom)
- Primer CNE5 R (Sigma-Aldrich, custom)
- Primer CNE6 F (Sigma-Aldrich, custom)
- Primer CNE6 R (Sigma-Aldrich, custom)
- Primer CNE7 F (Sigma-Aldrich, custom)
- Primer CNE7 R (Sigma-Aldrich, custom)
- Primer CNE8 F (Sigma-Aldrich, custom)
- Primer CNE8 R (Sigma-Aldrich, custom)
- Primer CNE9 F (Sigma-Aldrich, custom)

- Primer CNE9 R (Sigma-Aldrich, custom)
- GelRed (Labmark, katalógové číslo 41003)
- GeneScan™ 500 LIZ™ Size Standard (Applied Biosystems, katalógové číslo 4322682)
- Exonukleáza I (Thermo Fisher, katalógové číslo EN0581)
- Termosenzitívna alkalická fosfatáza (Thermo Fisher, katalógové číslo EF0654)
- Formamid (Thermo Scientific Chemicals, katalógové číslo 205820010)
- Voda v PCR čistote (Top Bio, katalógové číslo P440)

Použité súpravy

- KAPA HyperPlus Kit (Roche, katalógové číslo 07962428001)
- Big Dye® XTerminator™ Purification Kit (Thermo Fisher, katalógové číslo 4376486)
- Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent, katalógové číslo 5067-4626)
- KAPA HyperPure Beads (Roche, katalógové číslo 08963860001)
- Big Dye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher, katalógové číslo 4337454)
- Dynabeads™ Streptavidin Trial Kit (Invitrogen, katalógové číslo 65801D)
- SeqStudio™ Cathode Buffer Container (Thermo Fisher, katalógové číslo A33401)
- MiSeq Reagent Kit (Illumina, katalógové číslo MS-102-2002)
- Combi PPP Master mix (Top-Bio, katalógové číslo C208)
- SALSA MLPA Probemix P018 SHOX (MRC Holland, katalógové číslo P018-100R)
- SALSA MLPA Reagent Kit – FAM (MRC Holland, katalógové číslo EK1-FAM)
- SALSA MLPA Reagent Kit – Cy5 (MRC Holland, katalógové číslo EK1-Cy5)
- 3.1 SeqStudio™ Cartridge (Thermo Fisher, katalógové číslo A33671)

Použité roztoky a ich príprava

- TE pufr: 2,5 ml Tris-HCl ($1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), 0,5 ml EDTA ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), doplniť deionizovanou vodou na objem 250 ml.
- 80% etanol: 12 ml etanolu (96 %), pridať 4 ml Milli-Q vody.
- $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH: 2 μl NaOH ($0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), pridať 8 μl Milli-Q vody.
- 0,5x TBE pufr: 27 g TRIS, 13,75 g kyselina boritá, 1 ml EDTA ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH 8), doplniť deionizovanou vodou na objem 5 l.

5.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení

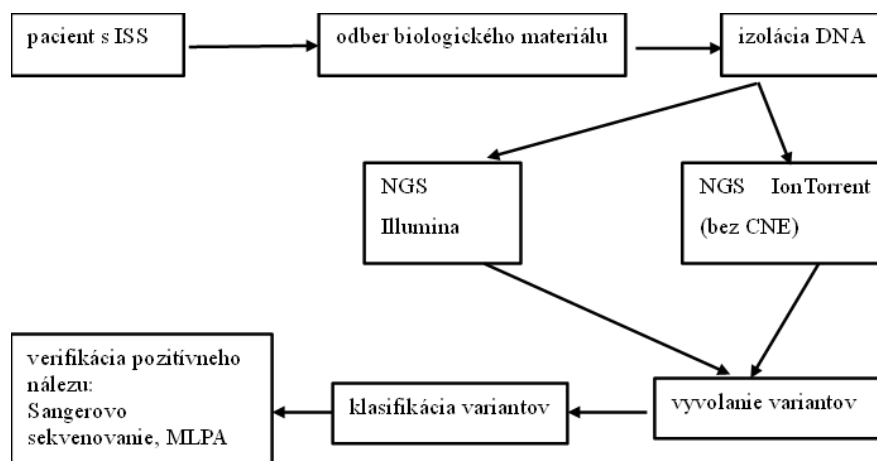
- Analytické váhy BAS 32 plus (Boeco)
- Centrifúga FVL-2400N Combi-Spin (Biosan)
- Centrifúga NF 400 (Nüve)
- Bioanalyzér Agilent Bioanalyser 2100 (Agilent)

- Chladnička (Electrolux)
- Vodný kúpeľ (HandyLab)
- Genetický analyzátor SeqStudio (Thermo Fisher)
- Multifunkčná trepačka MPS-1 (Biosan)
- Termocyklér C1000 (Bio-Rad)
- Sekvenátor Illumina MiSeq (Illumina)
- Transiluminátor MiniBIS Pro (DNR)
- Zdroj napätia GPS 200/400 (Pharmacia)
- Fluorometer Qubit (Thermo Fischer)

5.4 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy

5.4.1 Postup analýzy pacientov s nízkym vzrastom

Všetky sledované vzorky DNA boli sekvenované pomocou NGS. Sekvenovanie pomocou platformy IonTorrent bolo vykonané servisne, pri tomto sekvenovaní neboli sledované regulačné oblasti génu *SHOX*. Vyvolané varianty boli klasifikované pomocou predikčných nástrojov SIFT a PolyPhen. Pozitívne nálezy boli následne verifikované pomocou Sangerovho sekvenovania a MLPA. Postup analýzy pacientov s nízkym vzrastom je uvedený na Obrázku č. 18.



Obrázok č. 18: Diagram postupu analýzy pacientov s nízkym vzrastom

5.4.2 Illumina sekvenovanie

Príprava sekvenačnej knižnice – fragmentácia DNA, úprava koncov a ligácia adaptérov

1. Každá vzorka DNA bola nariedená v $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku Tris-HCl (ph 8,0) s $1\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA na koncentráciu cca $10\text{ ng}\cdot\mu\text{l}$. V reakcii bolo použitých 100 ng DNA v celkovom objeme 30 μl .
2. Conditioning Solution KAPA bol pripravený podľa pokynov výrobcu a množstva vzoriek.
3. Ku vzorke DNA bolo pridaných 5 μl Conditioning Solution KAPA.

4. Podľa pokynov výrobcu a počtu vzoriek bol pripravený Fragmentation mix, End Repair & A-tailing mix a Ligation mix. Pripravené master mixy boli uchovávané na ľade.
5. K 35 μ l vzorky bolo pridaných 15 μ l Fragmentation mixu a zmes bola následne inkubovaná v termocykléri pri teplote 37 °C po dobu 19 minút.
6. Reakcia bola zastavená vložení vzoriek do ľadu. Zo 4 náhodných vzoriek bol odobratý 1 μ l zmesi pre kontrolu veľkosti fragmentov.
7. Ku vzorkám bolo pripipetovaných 10 μ l End Repair & A-tailing mixu a zmes bola následne inkubovaná v termocykléri pri teplote 65 °C po dobu 30 minút.
8. Po inkubácii boli vzorky uchovávané na ľade. Ku každej vzorke bolo pridaných 3,5 μ l roztoku adaptérov.
9. Ku každej vzorke bolo pridaných 46,5 μ l Ligation mixu. Ligácia prebiehala v termocykléri pri teplote 20 °C po dobu 15 minút.

Príprava sekvenačnej knižnice – prečistenie po ligácii

1. Ku každej vzorke bolo pridaných 88 μ l guličiek KAPA HyperPure Beads. Zmes bola inkubovaná pri izbovej teplote 5 minút.
2. Bol pripravený čerstvý roztok 80% etanolu.
3. Vzorky boli po 5 minútach inkubácie premiestnené na magnetický stojan, kde boli až pokiaľ nebola kvapalina v skúmavkách číra (cca 5 minút).
4. Supernatant bol opatrne odstránený a do skúmaviek bolo pridaných 200 μ l 80% etanolu.
5. Asi po 30 sekundovej inkubácii bol etanol opatrne odpipetovaný.
6. Kroky 4 – 5 boli zopakované. Vzorky boli následne centrifugované, aby došlo k úplnému odstráneniu zvyšku etanolu.
7. Guličky boli pri izbovej teplote úplne vysušené a následne resuspendované v 25 μ l elučného pufru (10 mililiter $\cdot$ mol⁻¹ Tris-HCl bez EDTA).
8. Guličky boli v pufri inkubované pri izbovej teplote 2 minúty. Následne boli vzorky prenesené na magnetický stojan až do vyčistenia kvapaliny.
9. Z každej vzorky bolo 23 μ l supernatantu opatrne prenesených do čistých 0,2ml skúmaviek.
10. Zo 4 vzoriek bol odobraný 1 μ l roztoku pre analýzu veľkosti fragmentov. Odoberané bolo z rovnakých 4 vzoriek a po fragmentácii.

Príprava sekvenačnej knižnice – LM-PCR

1. Ku každej vzorke bolo pridaných 25 μ l KAPA HiFi HotStart Ready Mixu a 2 μ l double index mixu.
2. Zmes bola premiešaná pipetou, scentrifugovaná a inkubovaná v termocykléri podľa profilu uvedenom v Tabuľke č. 1.

Tabuľka č. 1: Teplotný profil LM-PCR reakcie

Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
98	45 s	1x
98	15 s	
65	30 s	4x
72	30s	
72	5 min	1x
4	neobmedzene	-

Príprava sekvenačnej knižnice – prečistenie po amplifikácii

1. Do každej skúmavky s LM-PCR produktom bolo pridaných 70 µl KAPA HyperPure Beads a inkubované pri izbovej teplote 5 minút.
2. Vzorky boli po 5 minútach inkubácie premiestnené na magnetický stojan, kde boli až pokiaľ nebola kvapalina v skúmavkách číra (cca 5 minút).
3. Supernatant bol opatrne odstránený a do skúmaviek bolo pridaných 200 µl 80% etanolu.
4. Asi po 30 sekundovej inkubácii bol etanol opatrne odpipetovaný.
5. Kroky 4 – 5 boli zopakované. Vzorky boli následne centrifugované aby došlo k úplnému odstráneniu zvyšku etanolu.
6. Guličky boli pri izbovej teplote úplne vysušené a následne resuspendované v 52 µl Milli-Q vody.
7. Vzorky boli inkubované pri izbovej teplote 2 minúty a následne premiestnené na magnetický stojan, kde zotrvali až do vyčistenia kvapaliny.
8. 50 µl čistého supernatantu bolo odobraných do čistých 0,2ml skúmaviek. Zo 4 vybraných skúmaviek bol opäť odobraný 1 µl vzorky na analýzu veľkosti fragmentov.
9. Pomocou fluorometru Qubit bola zmeraná koncentrácia všetkých vzoriek.

Príprava sekvenačnej knižnice – hybridizácia

1. V 1,5ml Low-bind Eppendorf skúmavke boli spoolované všetky vzorky (každá 50 ng DNA).
2. Bola pridaná PCR Grade voda do celkového objemu 45 µl.
3. Bolo pridaných 20 µl Human Cot-1 DNA (1 mg·ml) a 130 µl KAPA HyperPure Beads guličiek.
4. Roztok bol inkubovaný 10 minút pri izbovej teplote.
5. Skúmavka bola premiestnená na magnet, kde zotrvala až do vyčistenia roztoku.
6. Supernatant bol opatrne odstránený a do skúmavky bolo pridaných 200 µl 80% etanolu.
7. Vzorka bola inkubovaná 30 sekúnd pri izbovej teplote.
8. Po inkubácii bol etanol odpipetovaný, skúmavka scentrifugovaná a guličky boli vysušené pri izbovej teplote.
9. Do skúmavky bolo pridaných 13,4 µl Universal Enhancing Oligos, vzorka bola odstránená z magnetu a zhomogenizovaná.
10. Podľa pokynov výrobcu bol pripravený hybridizačný master mix.

11. Ku guľičkám s Universal Enhancing Oligos bolo pridaných 43 µl hybridizačného master mixu. Zmes bola inkubovaná 2 minúty pri izbovej teplote.
12. Po inkubácii bola skúmavka prenesená do magnetického stojanu, kde zostala až do vyčistenia kvapaliny.
13. Celý objem eluátu bol prenesený do novej skúmavky obsahujúcej 4 µl KAPA Target Enrichment Probe.
14. Zmes bola inkubovaná v termocykléri podľa profilu uvedenom v Tabuľke č. 2.

Tabuľka č. 2: Teplotný profil hybridizačnej reakcie

Teplota [°C]	Čas
95	5 min
55	16 – 20 h

Príprava sekvenačnej knižnice – analýza dĺžky fragmentov

1. Roztoky odobrané zo 4 vzoriek po fragmentácii a oboch čisteniach boli 5x nariedené pridaním 4 µl TE pufru.
2. Meranie bolo vykonané podľa pokynov výrobcu Agilent DNA HS kit.

Príprava sekvenačnej knižnice – príprava Streptavidin Dynabeads a naviazanie knižnice

1. Streptavidin Dynabeads boli temperované na izbovú teplotu minimálne 30 minút pred ich použitím.
2. Do prázdnych 1,5ml low-binding skúmaviek bolo pridaných 50 µl guľičiek.
3. Skúmavky boli premiestnené na magnetický stojan, kde zostali až do vyčistenia tekutiny. Následne bol supernatant odstránený.
4. Guľičky boli premyté 100 µl 1x Bead Wash Buffer s izbovou teplotou.
5. Skúmavky boli opäť premiestnené na magnetický stojan, kde zostali až do vyčistenia tekutiny. Následne bol supernatant odstránený.
6. Ku guľičkám bolo pridaných 100 µl Bead Wash Buffer s izbovou teplotou.
7. Skúmavky boli opäť premiestnené na magnetický stojan, kde zostali až do vyčistenia tekutiny. Následne bol supernatant odstránený.
8. Streptavidin Dynabeads boli resuspendované v 50 µl 1x Bead Wash Buffer pri izbovej teplote.
9. Skúmavky boli opäť premiestnené na magnetický stojan, kde zostali až do vyčistenia tekutiny. Následne bol supernatant odstránený.
10. Skúmavky boli ponechané na magnete. Do skúmavky bolo napipetovaných 60,4 µl hybridizovanej knižnice z termocykléru.
11. Knižnica DNA bola prepipetovaná so Streptavidin Dynabeads a celá zmes bola prepipetovaná naspäť do rovnakej 0,2ml skúmavky.

12. Zmes bola premiestnená na 15 minút do termocykléru pri 55 °C.

Príprava sekvenačnej knižnice – premytie Streptavidin Dynabeads

1. Po inkubácii bolo pridaných 100 µl 1x Wash Buffer I predhriateho na 55 °C.
2. Celý obsah bol následne prenesený do novej 1,5ml skúmavky.
3. Skúmavka bola premiestnená na magnetický stojan a Wash Buffer I bol odstránený.
4. Mimo magnetický stojan bolo pridaných 200 µl 1x Stringent Wash Buffer predhriateho na 55 °C.
5. Zmes bola inkubovaná vo vodnom kúpeli pri teplote 55 °C po dobu 5 minút.
6. Po 5 minútach bola skúmavka premiestnená na magnetický stojan a 1x Stringent Wash Buffer bol odstránený.
7. Mimo magnetický stojan bolo opäť pridaných 200 µl 1x Stringent Wash Buffer predhriateho na 55 °C.
8. Zmes bola inkubovaná vo vodnom kúpeli pri teplote 55 °C po dobu 5 minút.
9. Po 5 minútach bola skúmavka premiestnená na magnetický stojan a 1x Stringent Wash Buffer bol odstránený.
10. Do 1,5ml skúmavky bolo mimo magnetický stojan pridaných 200 µl Wash Buffer I s izbovou teplotou.
11. Po asi 1 minútovej inkubácii bola skúmavka premiestnená na magnetický stojan a Wash Buffer I bol odstránený.
12. Mimo magnetický stojan bolo do skúmavky pridaných 200 µl Wash Buffer II s izbovou teplotou.
13. Zmes bola prenesená do novej 1,5ml skúmavky a inkubovaná asi 1 minútu.
14. Skúmavka bola prenesená na magnetický stojan a Wash Buffer II bol odstránený.
15. Mimo magnetický stojan bolo do skúmavky pridaných 200 µl Wash Buffer III.
16. Po asi 1 minútovej inkubácii bola skúmavka prenesená na magnetický stojan a Wash Buffer III bol odstránený.
17. Mimo magnetický stojan bolo do skúmavky napipetovaných 20 µl PCR vody.

Príprava sekvenačnej knižnice – Post-Captured LM-PCR

1. Podľa pokynov výrobcu bol do 0,2ml skúmavky pripravený LM-PCR master mix.
2. Knižnica s guľičkami v 0,2ml skúmavke bola zvortexovaná a scentrifugovaná a následne bol celý jej objem prenesený do skúmavky s LM-PCR master mixom.
3. Skúmavka bola premiestnená do termocykléru, v ktorom bol nastavený program s teplotným profilom uvedeným v Tabuľke č. 3.

Tabuľka č. 3: Teplotný profil Post-Captured LM-PCR

Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
98	45 s	1x
98	15 s	
60	30 s	12x
72	30s	
72	1 min	1x
4	neobmedzene	-

Príprava sekvenačnej knižnice – prečistenie

1. KAPA Hyper Pure Beads boli temperované na izbovú teplotu aspoň 30 minút pred ich použitím.
2. Skúmavka bola z termocykléru premiestnená na magnetický stojan. Supernatant bol prenesený do novej 1,5ml skúmavky.
3. Ku knižnici bolo pridaných 70 μ l KAPA HyperPureBeads. Zmes bola inkubovaná 5 minút pri izbovej teplote.
4. Skúmavka bola premiestnená na magnetický stojan a supernatant bol odstránený.
5. Na magnetickom stojane bolo pridaných 200 μ l čerstvo pripraveného 80% etanolu. Zmes inkubovala asi 30 sekúnd pri izbovej teplote.
6. Supernatant bol odstránený a stále na magnetickom stojane bolo do skúmavky pridaných 200 μ l 80% etanolu.
7. Po asi 30 sekundovej inkubácii pri izbovej teplote bol supernatant odstránený a KAPA HyperPureBeads boli vysušené pri izbovej teplote.
8. Guličky boli resuspendované v 32 μ l PCR vody a inkubované asi 2 minúty pri izbovej teplote.
9. Skúmavka bola presunutá na magnetický stojan až do vyčistenia kvapaliny.
10. Supernatant bol odobraný do čistej 1,5ml skúmavky a koncentrácia knižnice bola zmeraná pomocou fluorometru Qubit.

Príprava vzorky do Illumina MiSeq

1. Asi hodinu pred použitím bol rozmrazený MiSeq Reagent Kit, bol pripravený 0,2mol·l⁻¹ NaOH a bol nariadený PhiX 10 nm na 1 nmol·l⁻¹.
2. Bol pripravený roztok z 5 μ l knižnice zriedenej na 18 pmol·l⁻¹ a 5 μ l 0,2mol·l⁻¹ NaOH.
3. Knižnica bola inkubovaná 5 minút pri izbovej teplote.
4. Bolo pridaných 990 μ l HT1.
5. Po premiešaní a centrifugácii bolo 600 μ l roztoku aplikovaných na MiSeq reagent cartridge a následne sekvenované v prístroji Illumina MiSeq.

Vyvolávanie variantov

1. Cloudové nástroje IonReporter (ThermoFisher) alebo BaseSpace™ Sequence Hub (BSSH) (Illumina) boli automaticky spustené po sekvenovaní pre demultiplexovanie a generovanie súborov FASTQ, ktoré obsahovali sekvencie jednotlivých čítaní v kombinácii s informáciami o kvalite dát pre každú bázu.
2. Dáta boli porovnané s referenčným ľudským genómom (GRCh37/hg19) a varianty boli vyvolané softvérom NextGene (SoftGenetics), čo viedlo k súborom .BAM a .vcf. Na vyvolávanie variantov boli použité len bázy s Phred skóre vyšším ako 30.
3. Exon 12 v *ACAN* (NM_001135.3) bol z analýzy vylúčený. Táto oblasť nebola analyzovaná, pretože zahŕňala tandemové opakovania a získané výsledky nespĺňali minimálne požiadavky na kvalitu dát.

Sortovanie nálezov a stanovenie patogenity

1. Pomocou online nástroja Variant Effect Predictor (VEP) boli nájdené varianty rozdelené do skupín: varianty nájdené v regulačných oblastiach *SHOX*, varianty v oblastiach kódujúcich gény (exóny), netranslatované oblasti (UTR) a blízke intronové oblasti (+/- 20 nt).
2. Pri identifikovaných variantoch boli použitím databázy UCSC Genome Browser vylúčené varianty nachádzajúce sa v homopolymérnych úsekoch, vzhľadom na popísanú vysokú chybovosť oboch použitých platforiem.
3. Následne bola každému variantu v databázi gnomAD dohľadaná frekvencia výskytu v nefínskej európskej populácii a dopyčovaná frekvencia výskytu v sledovanom súbore pacientov.
4. Predpokladaná a získaná frekvencia bola porovnaná pomocou Fisherovho exaktného testu v online nástroji Easy Fisher Exact Test Calculator s hranicou signifikantnosti 0,05.
5. Patogenita identifikovaných variantov bola stanovená pomocou online nástroja Mobidetails.

5.4.3 Sangerovo sekvenovanie

Príprava templátu

1. Bol pripravený master mix pre PCR reakciu podľa Tabuľky č. 4.

Tabuľka č. 4: Zloženie reakčnej zmesi pre PCR

Použité látky	Pipetovaný objem [μl]
PPP Master Mix Combi	3,75
DMSO	0,75
Voda v PCR čistote	2,10
Primer R + F (1:1)	0,4
Celkový objem reakcie	7,5

2. Do 0,2ml skúmavky s master mixom bolo pridaných 0,5 μl vzorky DNA.

3. Skúmavky so vzorkami boli prenesené do termocykléru, v ktorom bol nastavený program s teplotným profilom uvedeným v Tabuľke č. 5.

Tabuľka č. 5: Teplotný profil PCR reakcie

Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
95	3 min	1x
94	30 s	9x
55	30 s	
72	90 s	
90	30 s	24x
50	30 s	
72	90 s	1x

Elektroforetická kontrola prítomnosti PCR produktov

1. Bolo pripravených 60 ml 1,5% agarózového gélu, do ktorého boli pri teplote asi 70 °C pridané 3 µl farbiaceho roztoku GelRed.
2. Pripravený gél bol vyliaty do vaničky. Do gélu bol vložený hrebienok.
3. Po stuhnutí bol z gélu odstránený hrebienok a gél bol vložený do elektroforetickej vane s 0,5x TBE pufrom.
4. Do každej jamky boli napipetované 3 µl PCR produktu.
5. Bola spustená elektroforéza pri napätí 60 V.
6. Elektroforéza bola zastavená asi po 30 minútach a výsledný gél bol vyhodnotený pomocou transiluminátora.

Enzymatické prečistenie PCR produktu

1. K PCR produktu bolo napipetovaných 0,5 µl exonukleázy I a 1 µl alkalické fosfatázy.
2. PCR produkt bol s enzýmami inkubovaný v termocykléri, v ktorom bol nastavený program s teplotným profilom uvedeným v Tabuľke č. 6.

Tabuľka č. 6: Teplotný profil enzymatického prečistenia

Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
37	15 min	1x
85	15 min	1x
4	neobmedzene	-

Sekvenačná PCR

1. V 0,2ml skúmavke bola pripravená reakcia podľa Tabuľky č. 7.

Tabuľka č. 7: Zloženie zmesi sekvenačnej PCR

Použité látky	Pipetovaný objem [μl]	Celkový objem [μl]
BigDye® Terminator v1.1 & v3.1 5x sekvenačný pufr	0,75	3,50
BDX64 pufr	0,47	
PCR voda	2,75	
Nariedený sekvenačný kit (Big Dye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit)	0,03	0,50
Primer o koncentrácii 10 pmol·μl⁻¹	0,50	
DNA templát	1,00	
Celkový objem reakcie		5,00 μl

2. Skúmavky s pripravenou zmesou boli umiestnené do termocykléru, v ktorom bol spustený program s teplotným profilom uvedeným v Tabuľke č. 8.

Tabuľka č. 8: Teplotný profil sekvenačnej PCR

Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
94	2 min	1x
96	10 s	35x
50 °C/(1 °C/s)	5 s	
60	4 min	
10	neobmedzene	-

Post-sekvenačná purifikácia

1. Skúmavky boli po sekvenačnej PCR odstránené z termocykléru.
2. K produktu bolo pridaných 22,5 μl SAM Solution a 5 μl Xterminator Solution.
3. Skúmavky boli umiestnené na multifunkčnej trepačke po dobu 40 minút pri intenzite otáčok 2700 rpm.
4. Zmes bola následne scentrifugovaná pri nastavení 1000 g/2 minúty.

- Supernatant bol zo skúmaviek prenesený do čistej 96-jamkovej doštičky určenej pre SeqStudio.

Sekvenácia

- Sekvenácia bola vykonávaná v kapilárnej elektroforéze SeqStudio pri nastavení doby nástreku 15 s a doby separácie 3000 s.

5.4.4 MLPA

Denaturácia DNA

- Do označených 0,2ml skúmaviek bolo napipetovaných 5 μ l DNA.
- Skúmavky s DNA boli prenesené do termocykléru. Bol nastavený program s teplotným profilom uvedeným v Tabuľke č. 9.

Tabuľka č. 9: Teplotný profil denaturácie DNA

Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
98	5 min	1x
25	neobmedzene	-

Hybridizačná reakcia

- Pre jednu reakciu bol pripravený hybridizačný master mix zmiešaním 1,5 μ l MLPA pufru a 1,5 μ l roztoku probemix.
- Celý objem hybridizačného master mixu bol prepipetovaný do skúmavky s denaturovanou DNA.
- Skúmavky boli vložené do termocykléru, v ktorom bol nastavený program s teplotným profilom v Tabuľke č. 10.

Tabuľka č. 10: Teplotný profil hybridizačnej reakcie

Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
95	1 min	1x
60	16 – 20 h	1x

Ligačná reakcia

- Na jednu reakciu bol pripravený ligačný master mix napipetovaním 25 μ l PCR vody, 3 μ l Ligase pufru A, 3 μ l Ligase pufru B a 1 μ l Ligase-65 enzýmu.
- Skúmavky so vzorkami boli po hybridizačnej reakcii ponechané v termocykléri pri teplote 54 °C (vid' Tabuľka č. 11).
- Priamo v termocykléri bolo do každej skúmavky napipetovaných 32 μ l ligačného master mixu.

- Po napipetovaní ligačného master mixu bol spustený program termocykléru uvedený v Tabuľke č. 11.

Tabuľka č. 11: Teplotný profil ligačnej reakcie

Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
54	pauza	-
54	15 minút	1x
98	5 minút	1x
20	neobmedzene	-

PCR reakcia

- Na prípravu PCR master mixu bolo pre každú reakciu napipetovaných 7,2 µl PCR vody, 2 µl SALSA PCR primer mixu a 0,5 µl SALSA polymerázy.
- Pri izbovej teplote bolo do každej vzorky napipetovaných 10 µl master mixu.
- Skúmavky boli presunuté do termocykléru, v ktorom bol zapnutý program s teplotným profilom uvedeným v Tabuľke č. 12.

Tabuľka č. 12: Teplotný profil SALSA PCR reakcie

Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
95	30 s	35x
60	30 s	
72	60 s	
72	20 min	-
15	neobmedzene	

Príprava vzorky do kapilárnej elektroforézy

- Do prázdnej 1,5ml skúmavky bolo napipetovaných 1000 µl formamidu a 22,5 µl GeneScan 500 LIZ Size Standard.
- Do pripravenej 96-jamkovej doštičky bolo napipetovaných 14,5 µl roztoku pripraveného v predchádzajúcom kroku a 0,5 µl produktu PCR reakcie.
- Doštička bola prenesená do termocykléru, kde bola inkubovaná pri 92 °C po dobu 3 minút.
- Po odstránení doštičky z termocykléru bola reakcia ukončená ochladením v ľadovom kúpeli.
- Doštička so vzorkami bola následne vložená do kapilárnej elektroforézy SeqStudio, kde bol spustený program s parametrami uvedenými v Tabuľke č. 13.

Tabuľka č. 13: Parametre kapilárnej elektroforézy

Parameter	Nastavená hodnota
Teplota	60 °C
Elektrické napätie nástreku	1,6 kV
Doba nástreku	15 s
Elektrické napätie separácie	15 kV
Čas separácie	28 min

5.4.5 Analýza dát z verifikačných metód

1. Výsledky získané Sangerovým sekvenovaním boli digitalizované pomocou softwaru SeqScanner. Kontrola špecifickosti získaných sekvencií bola vykonaná pomocou online nástroja Blast alignment.
2. Digitalizácia dát získaných pomocou MLPA a porovnanie s kontrolnými vzorkami bolo vykonané pomocou programu Coffalyser.

6 Výsledky

6.1 Analýza variantov v kódujúcich oblastiach génov *ACAN*, *COL2A1*, *FGFR3*, *GHR*, *IGF1*, *IGF1R*, *IGFALS*, *SHOX*, *NPR2*, *STAT5B*

Pomocou platformy Illumina a Ion Torrent boli analyzované vzorky DNA od 153 pacientov. Z toho 79 vzoriek DNA pochádzalo od dievčat a 67 vzoriek pochádzalo od chlapcov. U 7 analyzovaných vzoriek neboli dodané údaje o pohlaví ani ďalšie klinické údaje. Vek dievčat sa pohyboval v rozmedzí 26 mesiacov (2 roky 2 mesiace) až 202 mesiacov (16 rokov 10 mesiacov). Chlapci boli vo veku 25 mesiacov (2 roky 1 mesiac) – 204 mesiacov (17 rokov). Z skóre pacientov bolo vypočítané podľa tabuliek zverejnených na webovej stránke Svetovej zdravotníckej organizácie (z angl. World Health Organization, WHO). Priemerné Z skóre dievčat bolo -1,365 a chlapcov -1,312.

U 63 pacientov neboli detegované žiadne genetické varianty s frekvenciou výskytu v populácii nižšou ako 0,005 (0,5 %). U ostatných testovaných vzoriek DNA bolo detegovaných 108 variantov (viď Príloha 1) s frekvenciou výskytu nižšou ako 0,005 (podľa gnomAD). V Tabuľke č. 14 sú uvedené štatisticky významné varianty s hranicou signifikantnosti Fisherovho exaktného testu $p < 0,05$.

Z významne častejších variantov boli zachytené najmä intrónové varianty (27). V exónovej oblasti bolo zachytených 23 variantov. Najviac variantov bolo zachytených v géne *ACAN* (13) a najmenej v géne *SHOX* (1). Najčastejšie bol zachytený variant NM_001163213.1:c.740-44T>G (*FGFR3*), ktorý sa vyskytoval až u 16 pacientov. Ide o variant v intrónovej oblasti s neznámou interpretáciou. Ďalšími početnými nálezmi boli varianty NM_013227.3:c.454+106C>T v *ACAN* (2); NM_000875.4:c.1194C>T (2), c.1247+3A>G (4) a c.641-14C>T (3) v *IGF1R*; NM_001146006.1:c.179C>T (2) v *IGFALS* a NM_012448.3:c.682-117C>T (2) v *STAT5B*.

Tabuľka č. 14: Štatisticky významné varianty detegované v kódujúcich oblastiach génov *ACAN*, *COL2A1*, *FGFR3*, *GHR*, *IGF1*, *IGF1R*, *IGFALS*, *SHOX*, *NPR2*, *STAT5B*

HGVS	Gén	Pozícia	Počet pacientov	Frekvencia v nefinskej populácii	Frekvencia v testovanom súbore	Fisher exact test
NM_013227.3:c.1869T>C	<i>ACAN</i>	exón	1	0,0000	0,0065	0,0044
NM_013227.3:c.1417C>T	<i>ACAN</i>	exón	1	0,0000	0,0065	0,0048
NM_013227.4:c.4150G>A	<i>ACAN</i>	exón	1	0,0000	0,0065	0,0094
NM_013227.3:c.1527G>A	<i>ACAN</i>	exón	1	0,0001	0,0065	0,0120
NM_013227.4:c.6006A>G	<i>ACAN</i>	exón	1	0,0001	0,0065	0,0130
NM_013227.3:c.820C>T	<i>ACAN</i>	exón	1	0,0001	0,0065	0,0170

NM_013227.3:c.6 486C>T	<i>ACAN</i>	exón	1	0,0001	0,0065	0,0212
NM_013227.4:c.2 037G>A	<i>ACAN</i>	exón	1	0,0002	0,0065	0,0253
NM_013227.3:c.6 142C>G	<i>ACAN</i>	exón	1	0,0002	0,0065	0,0320
NM_013227.3:c.4 54+106C>T	<i>ACAN</i>	intrón	2	0,0002	0,0131	0,0009
NM_013227.3:c.7 189-28C>T	<i>ACAN</i>	intrón	1	0,0000	0,0065	0,0081
NM_013227.3:c.6 30-27C>G	<i>ACAN</i>	intrón	1	0,0001	0,0065	0,0213
NM_013227.3:c.7 189-55G>A	<i>ACAN</i>	intrón	1	0,0001	0,0065	0,0292
NM_001844.4:c.8 46C>T	<i>COL2A1</i>	exón	1	0,0000	0,0065	0,0013
NM_001844.4:c.3 642T>C	<i>COL2A1</i>	exón	1	0,0000	0,0065	0,0048
NM_001844.4:c.4 10G>A	<i>COL2A1</i>	exón	1	0,0001	0,0065	0,0165
NM_001844.5:c.2 679+72_2679+73 dup	<i>COL2A1</i>	intrón	1	0,0000	0,0065	0,0100
NM_001844.4:c.3 273+34C>T	<i>COL2A1</i>	intrón	1	0,0001	0,0065	0,0107
NM_001844.5:c.2 302-109T>C	<i>COL2A1</i>	intrón	1	0,0001	0,0065	0,0196
NM_001844.5:c.1 420-105A>C	<i>COL2A1</i>	intrón	1	0,0002	0,0065	0,0402
NM_000142.4:c.2 005C>G	<i>FGFR3</i>	exón	1	0,0000	0,0065	0,0014
NM_001163213.1 :c.69G>A	<i>FGFR3</i>	exón	1	0,0001	0,0065	0,0158
NM_001163213.1 :c.1663G>A	<i>FGFR3</i>	exón	1	0,0001	0,0065	0,0180
NM_001163213.1 :c.2037-46C>T	<i>FGFR3</i>	intrón	1	0,0000	0,0065	0,0014
NM_001163213.1 :c.1651+23T>G	<i>FGFR3</i>	intrón	1	0,0000	0,0065	0,0014
NM_001163213.1 :c.1966-20G>A	<i>FGFR3</i>	intrón	1	0,0000	0,0065	0,0027
NM_001163213.1 :c.616-18G>C	<i>FGFR3</i>	intrón	1	0,0000	0,0065	0,0027
NM_001163213.1 :c.930+200C>T	<i>FGFR3</i>	intrón	1	0,0001	0,0065	0,0196
NM_000142.4:c.4 45+125G>T	<i>FGFR3</i>	intrón	1	0,0003	0,0065	0,0482
NM_001163213.1 :c.740-44T>G	<i>FGFR3</i>	intrón	16	0,0001	0,1046	< 0,00001
NM_001242399.2 :c.*104C>T	<i>GHR</i>	exón	1	0,0001	0,0065	0,0195
NM_001242399.2 :c.896+22T>C	<i>GHR</i>	intrón	1	0,0000	0,0065	0,0027

NM_000875.4:c.1 194C>T	<i>IGF1R</i>	exón	2	0,0010	0,0131	0,0101
NM_000875.5:c.1 247+3A>G	<i>IGF1R</i>	intrón	4	0,0010	0,0261	0,0000
NM_000875.5:c.6 41-14C>T	<i>IGF1R</i>	intrón	3	0,0011	0,0196	0,0007
NM_000875.5:c.3 458-27G>C	<i>IGF1R</i>	intrón	1	0,0002	0,0065	0,0384
NM_001146006.1 :c.179C>T	<i>IGFALS</i>	exón	3	0,0009	0,0196	0,0004
NM_001146006.2 :c.1319G>A	<i>IGFALS</i>	exón	1	0,0001	0,0065	0,0096
NM_001146006.1 :c.768C>G	<i>IGFALS</i>	exón	1	0,0003	0,0065	0,0460
NM_001146006.1 :c.17-196C>T	<i>IGFALS</i>	intrón	1	0,0001	0,0065	0,0196
NM_001146006.1 :c.16+21G>A	<i>IGFALS</i>	intrón	1	0,0002	0,0065	0,0279
NM_003995.3:c.* 209A>G	<i>NPR2</i>	exón	1	0,0000	0,0065	0,0042
NM_003995.3:c.1 572C>T	<i>NPR2</i>	exón	1	0,0001	0,0065	0,0269
NM_003995.3:c.1 558-18T>C	<i>NPR2</i>	intrón	1	0,0000	0,0065	0,0040
NM_003995.3:c.9 88-45C>T	<i>NPR2</i>	intrón	1	0,0000	0,0065	0,0071
NM_003995.3:c.2 712+49G>A	<i>NPR2</i>	intrón	1	0,0003	0,0065	0,0463
NM_000451.3:c.5 44+9C>T	<i>SHOX</i>	intrón	1	0,0000	0,0065	0,0040
NM_012448.3:c.6 37G>T	<i>STAT5B</i>	exón	1	0,0001	0,0065	0,0207
NM_012448.3:c.6 82-117C>T	<i>STAT5B</i>	intrón	2	0,0000	0,0131	0,0001
NM_012448.3:c.2 85+76C>A	<i>STAT5B</i>	intrón	1	0,0001	0,0065	0,0197

Boli zachytené 4 varianty, ktoré sú podľa ClinVar klasifikované ako patogénne, a to v génoch *COL2A1* (NM_001844.5:c.1636G>A), *FGFR3* (NM_001354809.2:c.943A>G), *GHR* (NM_000163.5:c.440-1G>A) a *SHOX* (NC_000023.11:g.(?780700)_(835572_?)del). Klinické údaje pacientov, u ktorých boli tieto varianty detegované, sú uvedené v Tabuľke č. 15. Varianty NM_001844.5:c.1636G>A a NM_000163.5:c.440-1G>A boli predmetom záujmu mojej bakalárskej práce, preto sa nimi táto práca už nebude ďalej zaoberať.

Tabuľka č. 15: Patogénne varianty identifikované v testovanom súbore

HGVS	Gén	Pohlavie pacienta	Vek pacienta (mesiace)	Výška pacienta (cm)	Z skóre	Výška matky (cm)	Výška otca (cm)
NM_001844.5:c.1636G>A	<i>COL2A1</i>	Ž	88	111	-2,1	158	160
NM_001354809.2:c.943A>G	<i>FGFR3</i>	M	159	156,8	-0,04	172	180
NM_000163.5:c.440-1G>A	<i>GHR</i>	M	77	111	-1,46	160	184
NC_000023.11:g.(?780700)_(835572_?)del	<i>SHOX</i>	Ž	167	160	-0,96	164	175

6.2 Analýza variantov v regulačných oblastiach génu *SHOX*

Celkovo boli varianty v regulačných oblastiach génu *SHOX* detegované u 134 pacientov. Z toho 65 vzoriek bolo od dievčat a 62 od chlapcov. U 7 pacientov neboli dodané údaje o ich pohlaví a klinických prejavoch. Vek dievčat sa pohyboval od 39 mesiacov (3 roky 3 mesiace) do 202 mesiacov (16 rokov 10 mesiacov). Chlapci mali vek od 25 mesiacov (2 roky 1 mesiac) do 213 mesiacov (17 rokov 9 mesiacov). Z skóre pacientov bolo vypočítané podľa tabuliek WHO. Priemerné Z skóre dievčat bolo -1,40 a priemerné Z skóre chlapcov bolo -1,44. U troch z dievčat a u troch z chlapcov, u ktorých boli identifikované varianty regulátorov génu *SHOX*, boli detegované aj patologické nálezy v kódujúcich oblastiach génov (*SHOX*, *FGFR3*, *COL2A1*, *GHR*).

V Tabuľke č. 16 sú uvedené detegované varianty regulátorov génu *SHOX* s frekvenciou v európskej nefínskej populácii nižšou ako 0,005 (0,5 %). Výsledky boli overené metódami Sangerovho sekvenovania a MLPA. V nami testovanom súbore pacientov sa najčastejšie vyskytoval SNV X:780728-C-A (viď Príloha 2), ktorý sa nachádza v CNE7, a to s frekvenciou 0,8806. Najnižšia detegovaná frekvencia bola 0,0075, a tá sa vyskytovala až v 31 prípadoch detegovaných variantov. V deviatich rôznych prípadoch bol v testovanom súbore pacientov detegovaný variant, ktorý nie je v databáze gnomAD zaznamenaný. Jeden z detegovaných variantov (X:835501-G-A) sa podľa databázy gnomAD v nefínskej populácii nevyskytuje vôbec, ale bol detegovaný v africkej/afroamerickej populácii s frekvenciou 0,0110. Najnižší počet detegovaných SNV bol v regulátore CNE-2 a najvyšší počet detegovaných SNV bol v regulačnej oblasti CNE8.

V Tabuľke č. 16 sú uvedené aj štatisticky významné detegované varianty regulátorov génu *SHOX*. U pacientov boli detegované 3 varianty s výsledkom Fisherovho exaktného testu 0 a 15 variantov so štatistickou významnosťou podľa Fisherovho exaktného testu <0,00001. Ďalšie varianty uvedené v tabuľke majú výslednú hodnotu Fisherovho exaktného testu pod nastavenou hranicou signifikantnosti, $p < 0,05$.

V Prílohe č. 2 je uvedená tabuľka so všetkými detegovanými variantmi regulátorov génu *SHOX*.

Tabuľka č. 16: Detegované varianty regulátorov génu *SHOX* s frekvenciou < 0,005 a $p < 0,05$

Koordináty hg19/GhR37	Regulátor	Zmena	Počet pacientov	Frekvencia v nefínskej populácii	Frekvencia v testovanom súbore	Fisher exact test	S/N*
X:398649	CNE-5	C>T	1	N/A	0,0075	-	-
X:398703	CNE-5	C>T	6	0,0989	0,0448	0,0397	S
X:398814	CNE-5	G>A	40	0,5628	0,2985	<0,00001	S
X:398866	CNE-5	C>T	1	N/A	0,0075	-	-
X:398933	CNE-5	G>A	6	0,0175	0,0448	0,0319	S
X:460339	CNE-3	G>A	23	0,0036	0,1716	<0,00001	S
X:460348	CNE-3	T>A	1	N/A	0,0075	-	-
X:460386	CNE-3	del CCCC	12	0,2438	0,0896	<0,00001	S
X:460522	CNE-3	C>G	1	0,0001	0,0075	0,0178	S
X:460959	CNE-3	G>T	1	0,7748	0,0075	<0,00001	S
X:668403	CNE2	del T	1	0,0013	0,0075	0,1612	N
X:668448	CNE2	C>G	16	0,2132	0,1194	0,0076	S
X:668454	CNE2	A>G	39	0,5817	0,2910	<0,00001	S
X:668583	CNE2	G>A	51	0,8689	0,3806	<0,00001	S
X:694553	CNE3	T>G	1	N/A	0,0075	-	-
X:694762	CNE3	C>A	4	0,0078	0,0299	0,0223	S
X:694994	CNE3	C>A	33	0,4600	0,2463	<0,00001	S
X:714122	CNE4	C>T	1	0,0027	0,0075	0,3137	N
X:714308	CNE4	A>G	1	N/A	0,0075	-	-

X:714359	CNE4	ins A	3	0,0003	0,0224	0,0000	S
X:714359	CNE4	del A	38	0,4263	0,2836	0,0008	S
X:714481	CNE4	G>T	1	0,0013	0,0075	0,1664	N
X:750996	CNE5	C>G	26	0,0179	0,1940	<0,00001	S
X:750998	CNE5	G>C	2	0,0002	0,0149	0,0010	S
X:751002	CNE5	G>C	2	N/A	0,0149	-	-
X:751009	CNE5	T>G	8	0,0203	0,0597	0,0068	S
X:751011	CNE5	G>T	3	0,1803	0,0224	<0,00001	S
X:751267	CNE5	C>T	4	0,0096	0,0299	0,0424	S
X:766320	CNE6	G>C	19	0,2642	0,1418	0,0011	S
X:780642	CNE7	A>C	1	0,4230	0,0075	<0,00001	S
X:780758	CNE7	G>A	24	0,2854	0,1791	0,0068	S
X:780946	CNE7	G>A	1	0,0005	0,0075	0,0690	N
X:780991	CNE7	del T	26	0,3517	0,1940	0,0001	S
X:781031	CNE7	G>A	30	0,3779	0,2239	0,0002	S
X:781139	CNE7	A>T	39	0,4273	0,2910	0,0015	S
X:811554	CNE8	C>T	62	0,0327	0,4627	<0,00001	S
X:811598	CNE8	del 12 nt	22	0,0326	0,1642	<0,00001	S
X:811606	CNE8	C>T	47	0,6371	0,3507	<0,00001	S
X:811632	CNE8	G>T	1	N/A	0,0075	-	-
X:811692	CNE8	C>T	4	0,0010	0,0299	0,1350	N
X:811696	CNE8	G>T	1	0,0008	0,0075	0,1092	N
X:811698	CNE8	T>G	1	0,0006	0,0075	0,0827	N

X:811962	CNE8	A>G	47	0,7013	0,3507	<0,00001	S
X:812287	CNE8	G>T	15	N/A	0,1119	-	-
X:812295	CNE8	A>G	12	N/A	0,0896	-	-
X:835264	CNE9	C>A	1	0,0010	0,0075	0,1347	N
X:835295	CNE9	T>C	57	0,2505	0,4254	0,0000	S
X:835370	CNE9	G>A	1	0,0004	0,0075	0,0609	N
X:835501	CNE9	G>A	1	0,0000	0,0075	0,0087	S
X:835632	CNE9	G>A	1	0,2521	0,0075	<0,00001	S

*S/N – signifikantný/nesignifikantný výsledok

7 Diskusia

Rastová reštrikcia je diagnóza s veľmi heterogénnymi príčinami, avšak u mnohých detí sa predpokladá, že ich ochorenie má genetickú etiológiu. Vďaka moderným metódam molekulárnej biológie je v súčasnosti detekcia jednotlivých genetických zmien jednoduchšia a rýchlejšia. Korelácia genetických nálezov s fenotypom často chýba. Doposiaľ bolo identifikovaných niekoľko génov, ktoré hrajú zásadnú rolu v raste, avšak význam jednotlivých variantov nie je vždy známy (Zhou et al, 2021).

Patogénne varianty v géne *COL2A1* spôsobujú spektrum vzácnych autozómovo dominantných stavov charakterizovaných kostnou dyspláziou, malým vzrastom a senzorickými defektmi (Barat-Houari et al., 2016). V tejto práci bol zachytený heterozygotný variant c.410G>A v exóne 6. Táto substitúcia vedie k zámene arginínu, ktorý je silno hydrofilný, za histidín, ktorý je aromatický a viaže kovalentné kovy (Arg137His). Všetky predikčné *in silico* nástroje vypočítali patogénny dopad variantu na výslednú štruktúru proteínu. Tento nález bol popísaný už v minulosti u detí s nízkym vzrastom v osobnej aj rodinnej anamnéze (Plachý et al., 2019; Plachý et al., 2021; Toni et al., 2024). Dá sa predpokladať, že tento variant vedie k haploinsuficiencii *COL2A1*, čo je jedna z dobre známych príčin oslabenia matrix klbovej chrupavky. Haploinsuficiencia *COL2A1* tiež mierne ovplyvňuje predĺženie kostí a je teda spojená s miernejšími fenotypmi (Barat-Houari et al., 2016). Okrem toho bol nájdený variant c.2679+72_2679+73dup, ktorý doposiaľ nebol popísaný a súčasné *in silico* predikčné nástroje neumožňujú odhad dopadu tejto zmeny na výsledný proteín. Patogénne varianty lokalizované v nekódujúcich oblastiach sú v klinickej praxi opomínané (Qian et al., 2021). V tejto práci bolo zachytených 26 ďalších významne častejších variantov v oblasti intrónov. Niektoré z nich boli interpretované v genetických databázach ako benígne alebo pravdepodobne benígne na základe ACMG kritérií, predikčných *in silico* nástrojov, vzdialenosti od kódujúcich exónov alebo boli jednoducho zachytené náhodou pri analýze iných ochorení (ClinVar, 2024). Obvykle však neexistujú funkčné štúdie, ktoré by význam variantu potvrdili/vysvetlili (Qian et al., 2021). Riziko chybného interpretácie, najmä u hlbokých intrónových variantov, vyplýva z absencie funkčnej mRNA analýzy alebo nepoznaných molekulárnych mechanizmov. Príkladom je variant *SHOX* c.544+9C>T, u ktorého bol preukázaný pokles expresie génu napriek *in silico* predikovanému benígnemu dopadu (Babu et al., 2021).

V tejto práci bol zachytený variant *IGF1R* c.1247+3A>G, u ktorého sa taktiež nepredpokladá klinický význam. Avšak nález bol pozorovaný u štyroch detí s rastovou reštrikciou a štatisticky bolo dokázané, že sa v selektovanom súbore nachádza významne častejšie ($p \gg 0,05$). Splice site varianty môžu narušať existujúce miesta zostrihu alebo regulačné sekvencie splicingu. Ktorá z funkcií bude narušená, je ovplyvnené vzdialenosťou SNV od hranice intrón-exón (Abramowicz et al., 2018). Prítomnosť SNV v intrónových oblastiach teda môže byť rovnako závažná ako SNV v exónových oblastiach (Xiong et al., 2015). Receptor *IGF1R* je zapojený v signálnej dráhe rastového hormónu a zatiaľ čo necitlivosť na GH samotný sa dá ľahko potvrdiť biochemickými testami, narušenie génu

IGF1R je v tejto chvíli odkázané len na genetické testovanie a dokázanie súvislosti jeho patogénnych variantov s rastovou reštrikciou (Tillmann et al., 1997).

Podobná situácia je aj u génu *NPR2*. Jeho heterozygotné varianty so stratou funkcie spôsobujú malý vzrast s nešpecifickými kostrovými abnormalitami a tvoria asi 2 ~ 6 % prípadov idiopaticky nízkeho vzrastu. Bolo dokázané, že väčšina variantov *NPR2* spojených s ISS má za následok abnormálny transport proteínov do plazmatickej membrány, zníženú väzobnú afinitu CNP k ligandom alebo inhibíciu aktivity *NPR2*. Tieto mechanizmy vedú k významnému zníženiu produkcie cGMP. Štúdie ukázali, že väzba ATP v KHD (z angl. kinase homology domain) je nutná pre senzibilizáciu *NPR*, po ktorej nasleduje ligandom indukovaná konformačná zmena a aktivácia enzýmu (Chen et al., 2023). Tieto poznatky sa zameriavali iba na zmeny ovplyvňujúce kódujúce sekvencie génu. Pokiaľ je nám známe, v súčasnosti neexistujú žiadne poznatky o dopade variantov v promotorovej oblasti génu. V tejto práci bol zachytený variant c.*209A>G, ktorý sa nachádza v 5' UTR. Obecne platí, že tieto varianty môžu ovplyvniť expresiu samotného génu (Einarsson et al., 2022).

Rôzne formy nízkeho vzrastu spôsobujú aj patogénne varianty *FGFR3*, u ktorých najmenej závažným fenotypom je hypochondroplázia (OMIM 146000, autozómovo dominantná dedičnosť) (Kant, 2015). Obecne platí, že jeho aberácie udržiavajú receptor *FGFR3* v aktívnom stave, čo vedie k neustálej stimulácii „downstream“ modulátorov a signálnej dráhy, čím abnormálne inhibuje biologické aktivity chondrocytov (Chen et al., 2017).

Variant identifikovaný v géne *FGFR3* NM_001354809.2:c.943A>G sa v databáze ClinVar neuvádza, ale podľa predikčných nástrojov je považovaný za patogénny. Nositeľ tohto variantu je mužského pohlavia. Pacient trpí oneskoreným rastom kostí, oneskoreným rozvojom motorických a rečových schopností a nerovnomerným rastom zubov. Tieto klinické príznaky sú veľmi podobné príznakom LADD syndrómu 2 (OMIM: 620192), čo je autozómovo dominantné ochorenie spôsobené substitúciou kyseliny asparágovej aminokyselinou asparagín (Asp513Asn) v konzervovanej tyrozínkinázovej-1 doméne (Rohmann et al., 2006). Ďalej boli v tomto géne nájdené varianty c.2005C>G a c. 1663G>A (alias c.1657G>A). Obe sa nachádzajú v proteínkinázovej doméne. Bola vyslovená hypotéza, že aberácie tejto oblasti stabilizujú dimérny stav receptora v neprítomnosti ligandu. Následne dochádza k vyššej fosforylácii než u jedincov s wild type variantami (Sarabipour et al., 2013). Okrem toho bol v súbore pacientov s vysokou frekvenciou zachytený aj ďalší variant génu *FGFR3* (NM_001163213.1:c.740-44T>G), ktorý bol zachytený až u 16 pacientov. Ide o variant, ktorý sa v databáze ClinVar nenachádza, jeho interpretácia je teda neznáma.

Značná časť tejto práce sa venovala oblastiam génu *SHOX*. Tento lokus je náchylný k deléciám/duplikáciám, kvôli vysokému výskytu opakovaných sekvencií v PAR1 (z angl. pseudoautosomal region 1). Táto situácia predisponuje k nealelickej homologickej rekombinácii, vedúcej k vysokému percentu rekombinantných frakcií (Fukami et al., 2015). Samotný gén je obklopený

hlboko evolučne konzervovanými oblasťami. Regulačné funkcie transkripcie génu boli popísané u CNE-5, CNE-3, CNE-2, CNE4, CNE5 a CNE8. Zatiaľ čo CNE2, CNE3, CNE6, CNE7 a CNE9 neprejavujú žiadne regulačné funkcie pri transkripcii génu *SHOX* (Gherlan, 2023). Avšak vo všetkých týchto oblastiach boli popísané patogénne CNV, ktoré viedli k abnormálnemu fenotypu (Capone et al., 2010; Hirschfeldova et al., 2017; Spurná et al., 2022; Čapková et al., 2020).

Detegovaný patogénny variant génu *SHOX* (NC_000023.11:g.(?780700)_(835572_?)del) bol u pacientky vo veku 13 rokov a 11 mesiacov. U pacientky bola prítomná Madelungova deformácia, ktorá je príznačná pre prítomnosť patogénnych variantov *SHOX*. Variant NC_000023.11:g.(?780700)_(835572_?)del sa nachádza v regulačnej oblasti génu *SHOX* a zasahuje oblasti regulátorov CNE7, CNE8 a CNE9. CNV, ktoré narušajú CNE, by mohli mať potenciálne fenotypové účinky podobné tým, ktoré majú zmeny v samotnom géne (Spurná et al., 2022). Fukami et al. (2015) dokázali, že CNE9 je potenciálne väzobné miesto pre proteíny HOXA9, HOXB9, PBX1, MEIS1 a pre komplexy ako PBX1-HOXA9 a MEIS1-HOXA9. Tieto komplexy sú nevyhnutné pre vývoj kostry.

Ďalej bolo popísaných deväť úplne nových variantov – tri v CNE8, dve v CNE-5 a po jednej v CNE-3, CNE3, CNE4 a v CNE5. Štatisticky významné varianty boli najčastejšie zachytené v oblastiach CNE5 a CNE-7. Naopak v CNE-2 sa žiadne varianty nevyskytovali významne častejšie než v európskej nefínskej populácii. Táto práca je prvá, ktorá zmapovala SNV v oblastiach regulačných elementov v skupine jedincov s rastovou reštrikciou. Ukazuje sa, že sledovanie variantov vo vysoko konzervovaných regulačných oblastiach je rovnako dôležité ako sledovanie variantov v kódujúcich oblastiach. Regulátory génu *SHOX* sú stále málo preskúmané a publikované práce sa venujú najmä monitorovaniu CNV v týchto oblastiach (Verdin et al., 2016; Gherlan et al., 2023).

Odhalenie významu jednotlivých variantov je obmedzené chýbajúcimi funkčnými a klinickými štúdiami. Genetické testovanie však stále patrí k metódam prvej voľby pri diagnostike ISS a napomáha s výberom vhodného liečebného postupu (Dauber et al., 2014; Zhou et al., 2021).

8 Záver

V sledovanom paneli génov súvisiacich s fyziologickým rastom dieťaťa bolo detegovaných viacero štatisticky významných variantov klasifikovaných ako VUS. Táto práca teda podčiarkuje dôležitosť nových informácií o týchto variantoch, ako aj potrebu sledovania korelácie medzi fenotypom a prítomným variantom. Ďalším prínosom práce je záchyt nových variantov v regulačných oblastiach génu *SHOX*. Detegované varianty poskytujú námet na ďalšie klinické štúdie.

9 Literatúra

ABRAMOWICZ, Anna a Monika GOS, 2018. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *Journal of Applied Genetics* [online]. **59**(3), 253-268 [cit. 2024-03-10]. ISSN 1234-1983. Dostupné z: doi:10.1007/s13353-018-0444-7

ANDRADE, Nathalia Liberatoscioli Menezes, Laurana Polli CELLIN, Raissa Carneiro REZENDE, Gabriela Andrade VASQUES a Alexander Augusto Lima JORGE, 2023. Idiopathic Short Stature: What to Expect from Genomic Investigations. *Endocrines* [online]. **4**(1), 1-17 [cit. 2023-06-27]. ISSN 2673396X. Dostupné z: doi:10.3390/endocrines4010001

ANTONARAKIS, Stylianos E. a David N. COOPER, 2013. Human Gene Mutation in Inherited Disease. In: Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics [online]. Elsevier, s. 1-48 [cit. 2024-04-07]. ISBN 9780123838346. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-383834-6.00007-0

BABU, Deepak, Silvia VANNELLI, Antonella FANELLI, et al., 2021. Variants in the 5'UTR reduce SHOX expression and contribute to SHOX haploinsufficiency. *European Journal of Human Genetics* [online]. **29**(1), 110-121 [cit. 2023-06-29]. ISSN 1018-4813. Dostupné z: doi:10.1038/s41431-020-0676-y

BAIK, Myunggi, Ji Hoon YU a Lothar HENNIGHAUSEN, 2011. Growth hormone–STAT5 regulation of growth, hepatocellular carcinoma, and liver metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. **1229**(1), 29-37 [cit. 2024-02-27]. ISSN 0077-8923. Dostupné z: doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06100.x

BARAT-HOUARI, Mouna, Guillaume SARRABAY, Vincent GATINOIS, Aurélie FABRE, Bruno DUMONT, David GENEVIEVE a Isabelle TOUITOU, 2016. Mutation Update for COL2A1 Gene Variants Associated with Type II Collagenopathies. *Human Mutation* [online]. **37**(1), 7-15 [cit. 2024-04-07]. ISSN 10597794. Dostupné z: doi:10.1002/humu.22915

BORO, Hiya, Sk Hammadur RAHMAN, Saurav KHATIWADA, Sarah ALAM a Rajesh KHADGAWAT, 2021. Laron syndrome: An experience of treatment of two cases. *Journal of Clinical and Translational Endocrinology: Case Reports* [online]. **19** [cit. 2024-01-21]. ISSN 22146245. Dostupné z: doi:10.1016/j.jecr.2020.100076

CAPKOVA, Pavlina, Zuzana CAPKOVA, Peter ROHON, Katerina ADAMOVÁ a Jirina ZAPLETALOVA, 2020. Short stature and SHOX (Short stature homeobox) variants—efficacy of screening using various strategies. *PeerJ* [online]. **8** [cit. 2024-04-07]. ISSN 2167-8359. Dostupné z: doi:10.7717/peerj.10236

CAPONE, L, L IUGHETTI, S SABATINI, A BACCIAGLIA a A FORABOSCO, 2010. The SHOX region and its mutations. *J Endocrinol Invest* [online]. **33**(6), 11-4 [cit. 2024-04-07]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21057179/>

DAUBER, Andrew, Ron G. ROSENFELD a Joel N. HIRSCHHORN, 2014. Genetic Evaluation of Short Stature. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2014-09-01, **99**(9), 3080-3092 [cit. 2024-03-10]. ISSN 0021-972X. Dostupné z: doi:10.1210/jc.2014-1506

DEMAL, Till Joscha, Tasja SCHOLZ, Helke SCHÜLER, et al., 2022. Expanding the clinical spectrum of COL2A1 related disorders by a mass like phenotype. *Scientific Reports* [online]. **12**(1) [cit. 2023-06-28]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-022-08476-7

DIAS, Christel, Mara GIORDANO, Rosalie FRECHETTE, Simonetta BELLONE, Constantin POLYCHRONAKOS, Laurent LEGAULT, Cheri L DEAL a Cynthia Gates GOODYER, 2017. Genetic variations at the human growth hormone receptor (GHR) gene locus are associated with idiopathic short stature. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [online]. **21**(11), 2985-2999 [cit. 2023-06-29]. ISSN 15821838. Dostupné z: doi:10.1111/jcmm.13210

DOMENÉ, Horacio M. a Gustavo FIERRO-CARRIÓN, 2018. Genetic disorders of GH action pathway. *Growth Hormone & IGF Research* [online]. **38**, 19-23 [cit. 2024-01-21]. ISSN 10966374. Dostupné z: doi:10.1016/j.ghir.2017.12.004

EINARSSON, Hjörleifur, Marco SALVATORE, Christian VAAGENSØ, Nicolas ALCARAZ, Jette BORNHOLDT, Sarah RENNIE a Robin ANDERSSON, 2022. Promoter sequence and architecture determine expression variability and confer robustness to genetic variants. *ELife* [online]. 2022-11-15, **11** [cit. 2024-04-07]. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.80943

ELLINGFORD, Jamie M., Joo Wook AHN, Richard D. BAGNALL, et al., 2022. Recommendations for clinical interpretation of variants found in non-coding regions of the genome. *Genome Medicine* [online]. 14(1) [cit. 2024-04-07]. ISSN 1756-994X. Dostupné z: doi:10.1186/s13073-022-01073-3

FADEL, Islam M., Moustafa H. RAGAB, Ola M. EID, Nivine A. HELMY, Hala T. EL-BASSYOUNI a Inas MAZEN, 2021. IGF1R, IGFALS, and IGFBP3 gene copy number variations in a group of non-syndromic Egyptian short children. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* [online]. **19**(1) [cit. 2023-06-29]. ISSN 2090-5920. Dostupné z: doi:10.1186/s43141-021-00202-6

FUKAMI, Maki, Yasuhiro NAIKI, Koji MUROYA, et al., 2015. Rare pseudoautosomal copy-number variations involving SHOX and/or its flanking regions in individuals with and without short stature. *Journal of Human Genetics* [online]. **60**(9), 553-556 [cit. 2024-04-07]. ISSN 1434-5161. Dostupné z: doi:10.1038/jhg.2015.53

GENECARDS HUMAN GENE DATABASE. COL2A1 Gene - Collagen Type II Alpha 1 Chain. *CO2A1 Antibody* [online]. [cit. 2024-04-07]. Dostupné z: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=COL2A1>

GHERLAN, I, 2023. Rare Dosage Abnormalities – Copy Number Variations Flanking the SHOX Gene. *Acta Endocrinologica (Bucharest)* [online]. **19**(1), 115-124 [cit. 2024-02-29]. ISSN 18410987. Dostupné z: doi:10.4183/aeb.2023.115

GONZAGA-JAUREGUI, Claudia, James R. LUPSKI a Richard A. GIBBS, 2012. Human Genome Sequencing in Health and Disease. *Annual Review of Medicine* [online]. 2012-02-18, **63**(1), 35-61 [cit. 2023-08-24]. ISSN 0066-4219. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-med-051010-162644

GÜRSOY, Semra, Filiz HAZAN, Ayça AYKUT, Özlem NALBANTOĞLU, Hüseyin Anıl KORKMAZ, Korcan DEMİR, Behzat ÖZKAN a Özgür ÇOĞULU, 2020. Detection of iSHOX/i Gene Variations in Patients with Skeletal Abnormalities with or without Short Stature. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology* [online]. 2020-11-25, **12**(4), 358-365 [cit. 2023-06-29]. ISSN 1308-5727. Dostupné z: doi:10.4274/jcrpe.galenos.2020.2019.0001

HIRSCHFELDOVA, Katerina a Roman SOLC, 2017. Comparison of SHOX and associated elements duplications distribution between patients (Léri-Weill dyschondrosteosis/idiopathic short stature) and population sample. *Gene* [online]. **627**, 164-168 [cit. 2024-04-07]. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/j.gene.2017.06.034

HUANG, Di a Ivan OVCHARENKO, 2022. Corrigendum: Enhancer–silencer transitions in the human genome. *Genome Research* [online]. 2022-06-24, **32**(6), 1228_2-1228_2 [cit. 2024-03-19]. ISSN 1088-9051. Dostupné z: doi:10.1101/gr.276950.122

HU, Taishan, Nilesh CHITNIS, Dimitri MONOS a Anh DINH, 2021. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology* [online]. **82**(11), 801-811 [cit. 2023-06-30]. ISSN 01988859. Dostupné z: doi:10.1016/j.humimm.2021.02.012

HWA, Vivian, 2021. Human growth disorders associated with impaired GH action: Defects in STAT5B and JAK2. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. **519** [cit. 2023-06-30]. ISSN 03037207. Dostupné z: doi:10.1016/j.mce.2020.111063

CHEN, Hong, Suping ZHANG, Yunteng SUN, et al., 2023. Novel pathogenic NPR2 variants in short stature patients and the therapeutic response to rhGH. *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. **18**(1) [cit. 2024-04-07]. ISSN 1750-1172. Dostupné z: doi:10.1186/s13023-023-02757-8

CHEN, Jing, Xiaomin MA, Yulin ZHOU, Guimei LI a Qiwei GUO, 2017. Recurrent c.G1636A (p.G546S) mutation of COL2A1 in a Chinese family with skeletal dysplasia and different metaphyseal

changes: a case report. *BMC Pediatrics* [online]. **17**(1) [cit. 2024-02-28]. ISSN 1471-2431. Dostupné z: doi:10.1186/s12887-017-0930-9

CHEN, Meiping, Hui MIAO, Hanting LIANG, et al., 2022. Clinical Characteristics of Short-Stature Patients With Collagen Gene Mutation and the Therapeutic Response to rhGH. *Frontiers in Endocrinology* [online]. 2022-2-16, **13** [cit. 2023-06-28]. ISSN 1664-2392. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2022.820001

KANG, Min Jae, 2017. Novel genetic cause of idiopathic short stature. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism* [online]. **22**(3), 153-157 [cit. 2023-06-28]. ISSN 2287-1012. Dostupné z: doi:10.6065/apem.2017.22.3.153

KANT, Sarina G, Iveta CERVENKOVA, Lukas BALEK, et al., 2015. A novel variant of FGFR3 causes proportionate short stature. *European Journal of Endocrinology* [online]. **172**(6), 763-770 [cit. 2024-04-07]. ISSN 0804-4643. Dostupné z: doi:10.1530/EJE-14-0945

KAUR, Harleen, Beverly S MUHLHAUSLER, Claire T ROBERTS a Kathryn L GATFORD, 2021. The growth hormone–insulin-like growth factor axis in pregnancy. *Journal of Endocrinology* [online]. 2021-12-01, **251**(3), R23-R39 [cit. 2023-08-23]. ISSN 0022-0795. Dostupné z: doi:10.1530/JOE-21-0087

KCHOUK, Mehdi, Jean Francois GIBRAT a Mourad ELLOUMI, 2017. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Biology and Medicine* [online]. **09**(03) [cit. 2024-01-21]. ISSN 09748369. Dostupné z: doi:10.4172/0974-8369.1000395

KOZIN, Scott H. a Dan A. ZLOTOLOW, 2015. Madelung Deformity. *The Journal of Hand Surgery* [online]. **40**(10), 2090-2098 [cit. 2024-03-19]. ISSN 03635023. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhsa.2015.03.033

LIN, Li, Mengting LI, Jingsi LUO, et al., 2021. A High Proportion of Novel ACAN Mutations and Their Prevalence in a Large Cohort of Chinese Short Stature Children. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2021-07-01, **106**(7), e2711-e2719 [cit. 2023-06-28]. ISSN 0021-972X. Dostupné z: doi:10.1210/clinem/dgab088

LI, Qiuyue, Xin FAN, Wei LU, et al., 2022. Novel NPR2 Gene Mutations Affect Chondrocytes Function via ER Stress in Short Stature. *Cells* [online]. **11**(8) [cit. 2023-06-30]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells11081265

MARIAN, Ali J., 2020. Clinical Interpretation and Management of Genetic Variants. *JACC: Basic to Translational Science* [online]. **5**(10), 1029-1042 [cit. 2023-08-24]. ISSN 2452302X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jacbts.2020.05.013

- MARKOVA, Tatyana, Vladimir KENIS, Evgeniy MELCHENKO, et al., 2022. Clinical and Genetic Characteristics of COL2A1-Associated Skeletal Dysplasias in 60 Russian Patients: Part I. *Genes* [online]. **13**(1) [cit. 2023-06-28]. ISSN 2073-4425. Dostupné z: doi:10.3390/genes13010137
- PATEL, Riddhi a Anurag BAJPAI, 2021. Evaluation of Short Stature in Children and Adolescents. *Indian Journal of Pediatrics* [online]. **88**(12), 1196-1202 [cit. 2023-06-27]. ISSN 0019-5456. Dostupné z: doi:10.1007/s12098-021-03880-9
- PLACHY, Lukas, Petra DUSATKOVA, Klara MARATOVA, et al., 2020. NPR2 Variants Are Frequent among Children with Familial Short Stature and Respond Well to Growth Hormone Therapy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2020-03-01, **105**(3), e746-e752 [cit. 2023-06-30]. ISSN 0021-972X. Dostupné z: doi:10.1210/clinem/dgaa037
- PLACHY, Lukas, Petra DUSATKOVA, Klara MARATOVA, et al., 2021. Familial Short Stature—A Novel Phenotype of Growth Plate Collagenopathies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2021-06-01, **106**(6), 1742-1749 [cit. 2024-04-07]. ISSN 0021-972X. Dostupné z: doi:10.1210/clinem/dgab084
- PLACHY, Lukas, Veronika STRAKOVA, Lenka ELBLOVA, et al., 2019. High Prevalence of Growth Plate Gene Variants in Children With Familial Short Stature Treated With GH. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2019-10-01, **104**(10), 4273-4281 [cit. 2024-04-07]. ISSN 0021-972X. Dostupné z: doi:10.1210/jc.2018-02288
- QIAN, Xinye, Jun WANG, Meng WANG, et al., 2021. Identification of Deep-Intronic Splice Mutations in a Large Cohort of Patients With Inherited Retinal Diseases. *Frontiers in Genetics* [online]. 2021-3-2, **12** [cit. 2024-04-07]. ISSN 1664-8021. Dostupné z: doi:10.3389/fgene.2021.647400
- RICHARDS, Sue, Nazneen AZIZ, Sherri BALE, et al., 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* [online]. **17**(5), 405-424 [cit. 2024-01-21]. ISSN 10983600. Dostupné z: doi:10.1038/gim.2015.30
- ROHMANN, Edyta, Han G BRUNNER, Hülya KAYSERILI, et al., 2006. Mutations in different components of FGF signaling in LADD syndrome. *Nature Genetics* [online]. 2006-04-01, **38**(4), 414-417 [cit. 2024-02-29]. ISSN 1061-4036. Dostupné z: doi:10.1038/ng1757
- ROMO, Lindsay, Scott D. FINDLAY a Christopher B. BURGE, 2024. Regulatory features aid interpretation of 3'UTR variants. *The American Journal of Human Genetics* [online]. **111**(2), 350-363 [cit. 2024-03-19]. ISSN 00029297. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajhg.2023.12.017

- SARABIPOUR, Sarvenaz a Kalina HRISTOVA, 2013. FGFR3 Transmembrane Domain Interactions Persist in the Presence of Its Extracellular Domain. *Biophysical Journal* [online]. **105**(1), 165-171 [cit. 2024-04-07]. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2013.05.053
- SAVAGE, Martin O., Sumana CHATTERJEE, Vivian HWA a Helen L. STORR, 2018. Growth Hormone Insensitivity. In: *Encyclopedia of Endocrine Diseases* [online]. Elsevier, s. 81-93 [cit. 2024-01-21]. ISBN 9780128122006. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.04123-4
- SAVAGE, Martin O. a Helen L. STORR, 2021. GH Resistance Is a Component of Idiopathic Short Stature: Implications for rhGH Therapy. *Frontiers in Endocrinology* [online]. 2021-12-10, **12** [cit. 2023-06-29]. ISSN 1664-2392. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2021.781044
- SHUHAIBAR, Leia C., Nabil KACI, Jeremy R. EGBERT, et al., 2021. Phosphatase inhibition by LB-100 enhances BMN-111 stimulation of bone growth. *JCI Insight* [online]. 2021-5-10, **6**(9) [cit. 2024-02-27]. ISSN 2379-3708. Dostupné z: doi:10.1172/jci.insight.141426
- SPURNÁ, Z, P ČAPKOVÁ, L PUNOVÁ, et al., 2024. Clinical-genetic analysis of selected genes involved in the development of the human skeleton in 128 Czech patients with suspected congenital skeletal abnormalities. *Gene* [online]. **892** [cit. 2024-01-21]. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/j.gene.2023.147881
- SPURNA, Zuzana, Pavlina CAPKOVA, Josef SROVNAL, Jana DUCHOSLAVOVA, Lucia PUNOVA, Darina ALEKSIJEVIC a Radek VRTEL, 2022. Clinical impact of variants in non-coding regions of SHOX – Current knowledge. *Gene* [online]. **818** [cit. 2024-02-29]. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/j.gene.2022.146238
- STATTIN, Eva-Lena, Karin LINDBLOM, André STRUGLICS, et al., 2022. Novel missense ACAN gene variants linked to familial osteochondritis dissecans cluster in the C-terminal globular domain of aggrecan. *Scientific Reports* [online]. **12**(1) [cit. 2023-06-28]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-022-09211-y
- STAVBER, Lana, Maria Joao GAIA, Tinka HOVNIK, et al., 2022. Heterozygous NPR2 Variants in Idiopathic Short Stature. *Genes* [online]. **13**(6) [cit. 2023-06-30]. ISSN 2073-4425. Dostupné z: doi:10.3390/genes13061065
- STORR, Helen L, Sumana CHATTERJEE, Louise A METHERELL, et al., 2019. Nonclassical GH Insensitivity: Characterization of Mild Abnormalities of GH Action. *Endocrine Reviews* [online]. 2019-04-01, **40**(2), 476-505 [cit. 2023-06-30]. ISSN 0163-769X. Dostupné z: doi:10.1210/er.2018-00146
- SUN, Huihui, Na LI a Naijun WAN, 2021. Molecular genetic analysis and growth hormone response in patients with syndromic short stature. *BMC Medical Genomics* [online]. **14**(1) [cit. 2023-06-29]. ISSN 1755-8794. Dostupné z: doi:10.1186/s12920-021-01113-8

TILLMANN, Vallo, John M. H. BUCKLER, Mohammed S. KIBIRIGE, et al., 1997. Biochemical Tests in the Diagnosis of Childhood Growth Hormone Deficiency*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 1997-02-01, **82**(2), 531-535 [cit. 2024-04-07]. ISSN 0021-972X. Dostupné z: doi:10.1210/jcem.82.2.3750

TONI, Ledjona, Lukas PLACHY, Petra DUSATKOVA, et al., 2024. The Genetic Landscape of Children Born Small for Gestational Age with Persistent Short Stature. *Hormone Research in Paediatrics* [online]. 2024-1-26, **97**(1), 40-52 [cit. 2024-04-07]. ISSN 1663-2818. Dostupné z: doi:10.1159/000530521

UNGUREANU, Maria-Christina, Anamaria HRISCA, Lavinia CABA, Laura TEODORIU, Stefana BILHA, Cristina PREDA a Letitia LEUSTEAN, 2023. SHOX Deletion and Idiopathic Short Stature: What Does the Clinician Need to Know? Case Series Report. *Diagnostics* [online]. **13**(1) [cit. 2023-06-29]. ISSN 2075-4418. Dostupné z: doi:10.3390/diagnostics13010105

VERDIN, Hannah, Ana FERNÁNDEZ-MIÑÁN, Sara BENITO-SANZ, et al., 2016. Profiling of conserved non-coding elements upstream of SHOX and functional characterisation of the SHOX cis-regulatory landscape. *Scientific Reports* [online]. 2016-11-22, **5**(1) [cit. 2024-03-11]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep17667

WEN, Caining, Limei XU, Xiao XU, Daping WANG, Yujie LIANG a Li DUAN, 2021. Insulin-like growth factor-1 in articular cartilage repair for osteoarthritis treatment. *Arthritis Research & Therapy* [online]. **23**(1) [cit. 2024-02-27]. ISSN 1478-6362. Dostupné z: doi:10.1186/s13075-021-02662-0

WU, Huiping, Chaoban WANG, Shiwen YU, Xiaojun YE, Yalan JIANG, Pingping HE a Xiaou SHAN, 2023. Downregulation of ACAN is Associated with the Growth hormone pathway and Induces short stature. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* [online]. **37**(2) [cit. 2023-06-28]. ISSN 0887-8013. Dostupné z: doi:10.1002/jcla.24830

XIONG, Hui Y., Babak ALIPANAHI, Leo J. LEE, et al., 2015. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. *Science* [online]. 2015-01-09, **347**(6218) [cit. 2024-03-10]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1254806

ZHOU, Elaine, Benjamin Roland HAUSER a Youn Hee JEE, 2021. Genetic evaluation in children with short stature. *Current Opinion in Pediatrics* [online]. **33**(4), 458-463 [cit. 2023-06-27]. ISSN 1040-8703. Dostupné z: doi:10.1097/MOP.0000000000001033

What kinds of gene variants are possible? *MedlinePlus* [online]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US) [cit. 2023-08-24]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/mutationsanddisorders/possiblemutations/>

WHO child growth standards: length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age. *Vydavateľ nenájdený* [online]. [cit. 2024-01-19]. Dostupné z: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/924154693X>

Ion Torrent Next-Generation Sequencing Technology. *Thermo Fisher Scientific - CZ* [online]. [cit. 2024-01-21]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-technology.html>

Human hg19 chrX: 811962-811962 UCSC Genome Browser v459 [online]. [cit. 2024-01-23]. Dostupné z: https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chrX%3A811962%2D811962&hgside=1885979208_ZIaQMIdLNAi5WAsPO72ZQKcM7Anf

Genome Aggregation Database [online]. [cit. 2024-01-23]. Dostupné z: <https://gnomad.broadinstitute.org/>

Ensembl Variant Effect Predictor (VEP) [online]. [cit. 2024-01-23]. Dostupné z: <https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html>

OMIM®. *OMIM* [online]. [cit. 2024-04-07]. Dostupné z: <https://www.omim.org/>

ClinVar [online]. [cit. 2024-04-07]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>

MERCK, 2023. *Sanger Sequencing Steps & Method* [online]. [cit. 2023-06-30]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/protocol/genomics/sequencing/sanger-sequencing>

NCBI Gene, 2023. *National Library of Medicine* [online]. [cit. 2023-06-30]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>

Illumina, 2023. *NGS Workflow Steps* [online]. [cit. 2023-06-30]. Dostupné z: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/beginners/ngs-workflow.html>

MRC Holland, 2023. *Principle of MLPA* [online]. [cit. 2023-06-30]. Dostupné z: <https://www.mrcholland.com/technology/mlpa/technique>

What is a gene variant and how do variants occur? *MedlinePlus* [online]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US) [cit. 2023-08-24]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/mutationsanddisorders/genemutation/>

10 Prílohy

Príloha 1: Tabuľka detegovaných variantov génov *ACAN*, *COL2A1*, *FGFR3*, *GHR*, *IGF1*, *IGF1R*, *IGFALS*, *SHOX*, *NPR2*, *STAT5B* s frekvenciou v populácií nižšou ako 0,005.

Príloha 2: Tabuľka detegovaných variantov v regulátoroch génu *SHOX*.

Príloha 1: Tabuľka detegovaných variantov génov *ACAN*, *COL2A1*, *FGFR3*, *GHR*, *IGF1*, *IGF1R*, *IGFALS*, *SHOX*, *NPR2*, *STAT5B* s frekvenciou v populácii nižšou ako 0,005.

HGVS	Gén	Pozícia	Interpretácia variantu	Typ variantu	Aminokyselina	Počet pacientov	Frekvencia v nefínskej populácii	Frekvencia v testovanom súbore	Fisher exact test
negatívny	-	-	-	-	-	63	-	-	-
NM_013227.3:c.454+106 C>T	ACAN	intrón	neznáma	-	-	2	0,0002	0,0131	0,0009
NM_013227.3:c.1869T>C	ACAN	exón	benígna	synonymný	p.Tyr623=	1	0,0000	0,0065	0,0044
NM_013227.3:c.1417C>T	ACAN	exón	neznáma	missense	p.His473Tyr	1	0,0000	0,0065	0,0048
NM_013227.3:c.7189-28C>T	ACAN	intrón	neznáma	-	-	1	0,0000	0,0065	0,0081
NM_013227.4:c.4150G>A	ACAN	exón	neznáma	missense	p.Ala1384Thr	1	0,0000	0,0065	0,0094
NM_013227.3:c.1527G>A	ACAN	exón	neznáma	synonymný	p.Ser509=	1	0,0001	0,0065	0,0120
NM_013227.4:c.6006A>G	ACAN	exón	neznáma	synonymný	p.Pro2002=	1	0,0001	0,0065	0,0130
NM_013227.3:c.820C>T	ACAN	exón	neznáma	missense	p.Arg274Trp	1	0,0001	0,0065	0,0170
NM_013227.3:c.6486C>T	ACAN	exón	neznáma	synonymný	p.Ser2162=	1	0,0001	0,0065	0,0212
NM_013227.3:c.630-27C>G	ACAN	intrón	neznáma	-	-	1	0,0001	0,0065	0,0213
NM_013227.4:c.2037G>A	ACAN	exón	benígna	synonymný	p.Ala679=	1	0,0002	0,0065	0,0253
NM_013227.3:c.7189-55G>A	ACAN	intrón	neznáma	-	-	1	0,0001	0,0065	0,0292
NM_013227.3:c.6142C>G	ACAN	exón	neznáma	missense	p.Pro2048Ala	1	0,0002	0,0065	0,0320
NM_013227.3:c.3751G>A	ACAN	exón	neznáma	missense	p.Ala1251Thr	1	0,0000	0,0065	0,1136
NM_013227.3:c.2027-65G>A	ACAN	intrón	neznáma	-	-	1	0,0014	0,0065	0,1953
NM_013227.3:c.230G>A	ACAN	exón	neznáma	missense	p.Arg77His	1	0,0019	0,0065	0,2586
NM_013227.3:c.4525C>T	ACAN	exón	neznáma	missense	p.Leu1509Phe	1	0,0033	0,0065	0,3955
NM_001135.3:c.4264A>G	ACAN	exón	neznáma	missense	p.Thr1422Ala	1	0,0039	0,0065	0,4528

NM_001844.4:c.3436-40C>T	ACAN	intrón	neznáma	-	-	1	N/A ¹⁾	0,0065	-
NM_013227.3:c.206T>A	ACAN	exón	neznáma	missense	p.Leu69Gln	1	N/A ¹⁾	0,0065	-
NM_013227.3:c.3771C>G	ACAN	exón	neznáma	missense	p.Asp1257Glu	1	N/A ¹⁾	0,0065	-
NM_013227.3:c.7105+44T>G	ACAN	intrón	neznáma	-	-	5	N/A ¹⁾	0,0327	-
NM_013227.3:c.71-189_71-187delinsGA	ACAN	intrón	neznáma	-	-	1	N/A ¹⁾	0,0065	-
NM_001844.4:c.846C>T	COL2A1	exón	neznáma	synonymný	p.Gly282=	1	0,0000	0,0065	0,0013
NM_001844.4:c.3642T>C	COL2A1	exón	neznáma	synonymný	p.Pro1214=	1	0,0000	0,0065	0,0048
NM_001844.5:c.2679+72_2679+73dup	COL2A1	intrón	neznáma	-	-	1	0,0000	0,0065	0,0100
NM_001844.4:c.3273+34C>T	COL2A1	intrón	neznáma	-	-	1	0,0001	0,0065	0,0107
NM_001844.4:c.410G>A	COL2A1	exón	neznáma	missense	p.Arg137His	1	0,0001	0,0065	0,0165
NM_001844.5:c.2302-109T>C	COL2A1	intrón	neznáma	-	-	1	0,0001	0,0065	0,0196
NM_001844.5:c.1420-105A>C	COL2A1	intrón	neznáma	-	-	1	0,0002	0,0065	0,0402
NM_001844.4:c.1527+72G>A	COL2A1	intrón	neznáma	-	-	1	0,0004	0,0065	0,0668
NM_001844.4:c.3887-44G>A	COL2A1	intrón	neznáma	-	-	1	0,0033	0,0065	0,3939
NM_001844.4:c.*111C>T	COL2A1	exón	neznáma	-	-	1	N/A ¹⁾	0,0065	-
NM_001844.4:c.*231C>A	COL2A1	exón	neznáma	-	-	1	N/A ¹⁾	0,0065	-
NM_001844.4:c.1221+11C>T	COL2A1	intrón	neznáma	-	-	1	N/A ¹⁾	0,0065	-
NM_001844.4:c.2518-69_2518-68invTG	COL2A1	intrón	neznáma	-	-	1	N/A ¹⁾	0,0065	-
NM_001844.4:c.3328-24A>T	COL2A1	intrón	neznáma	-	-	1	N/A ¹⁾	0,0065	-
NM_001844.4:c.4136G>T	COL2A1	exón	neznáma	missense	p.Arg1379Leu	1	N/A ¹⁾	0,0065	-
NM_001844.5:c.1636G>A	COL2A1	exón	patogénna	missense	p.Gly546Ser	1	N/A ¹⁾	0,0065	-

NM_001844.5:c.1680+8_1680+9delGCinsTA	COL2A1	intrón	neznáma	-	-	1	N/A ¹⁾	0,0065	-
NM_001163213.1:c.2037-46C>T	FGFR3	intrón	neznáma	-	-	1	0,0000	0,0065	0,0014
NM_000142.4:c.2005C>G	FGFR3	exón	neznáma	missense	p.Arg669Gly	1	0,0000	0,0065	0,0014
NM_001163213.1:c.1651+23T>G	FGFR3	intrón	neznáma	-	-	1	0,0000	0,0065	0,0014
NM_001163213.1:c.1966-20G>A	FGFR3	intrón	neznáma	-	-	1	0,0000	0,0065	0,0027
NM_001163213.1:c.616-18G>C	FGFR3	intrón	neznáma	-	-	1	0,0000	0,0065	0,0027
NM_001163213.1:c.69G>A	FGFR3	exón	benígna	synonymný	p.Glu23=	1	0,0001	0,0065	0,0158
NM_001163213.1:c.1663G>A	FGFR3	exón	neznáma	missense	p.Val555Met	1	0,0001	0,0065	0,0180
NM_001163213.1:c.930+200C>T	FGFR3	intrón	neznáma	-	-	1	0,0001	0,0065	0,0196
NM_000142.4:c.445+125G>T	FGFR3	intrón	neznáma	-	-	1	0,0003	0,0065	0,0482
NM_001163213.1:c.2278G>A	FGFR3	exón	neznáma	missense	p.Asp760Asn	1	0,0004	0,0065	0,0614
NM_001163213.1:c.1273-85C>A	FGFR3	intrón	neznáma	-	-	1	0,0008	0,0065	0,1205
NM_000142.4:c.678C>T	FGFR3	exón	benígna	synonymný	p.Tyr226=	1	0,0021	0,0065	0,2703
NM_001163213.1:c.615+16T>G	FGFR3	intrón	neznáma	-	-	1	0.003867	0,0065	0,4482
NM_000142.5:c.931-31G>A	FGFR3	intrón	neznáma	-	-	1	0,0070	0,0065	1,0000
NM_001354809.2:c.943A>G	FGFR3	exón	patogénna	missense	p.Asn315Asp	1	N/A ¹⁾	0,0065	-
NM_001163213.1:c.740-44T>G	FGFR3	intrón	neznáma	-	-	16	0,0001	0,1046	< 0,00001
NM_001242399.2:c.896+22T>C	GHR	intrón	neznáma	-	-	1	0,0000	0,0065	0,0027

NM_000163.5:c.440-1G>A	<i>GHR</i>	intrón	patogénna	-	-	1	0,0000	0,0065	0,0040
NM_001242399.2:c.*104C>T	<i>GHR</i>	exón	neznáma	-	-	1	0,0001	0,0065	0,0195
NM_001242399.2:c.707G>A	<i>GHR</i>	exón	neznáma	missense	p.Arg236His	1	0,0010	0,0065	0,1448
NM_001242399.2:c.294T>A	<i>GHR</i>	exón	neznáma	synonymný	p.Thr98=	1	0,0014	0,0065	0,1888
NM_001242399.2:c.288-214T>C	<i>GHR</i>	intrón	neznáma	-	-	1	0,0022	0,0065	0,2923
NM_001242399.2:c.432T>G	<i>GHR</i>	exón	neznáma	missense	p.Asp144Glu	1	N/A ¹⁾	0,0065	-
NM_001111283.3:c.45C>G	<i>IGF1</i>	exón	neznáma	missense	p.Cys15Trp	1	0,0005	0,0065	0,0743
NM_000875.5:c.1247+3A>G	<i>IGF1R</i>	intrón	neznáma	-	-	4	0,0010	0,0261	0,0000
NM_000875.5:c.641-14C>T	<i>IGF1R</i>	intrón	neznáma	-	-	3	0,0011	0,0196	0,0007
NM_000875.4:c.1194C>T	<i>IGF1R</i>	exón	neznáma	synonymný	p.Ser398=	2	0,0010	0,0131	0,0101
NM_000875.5:c.3458-27G>C	<i>IGF1R</i>	intrón	neznáma	-	-	1	0,0002	0,0065	0,0384
NM_000875.5:c.2956+36_2956+37insGGC	<i>IGF1R</i>	intrón	neznáma	-	-	1	0,0005	0,0065	0,0692
NM_000875.5:c.3588-31C>G	<i>IGF1R</i>	intrón	neznáma	-	-	2	0,0043	0,0131	0,1392
NM_000875.4:c.1462+15C>G	<i>IGF1R</i>	intrón	neznáma	-	-	1	0,0020	0,0065	0,2659
NM_000875.5:c.1532G>A	<i>IGF1R</i>	exón	neznáma	missense	p.Arg511Gln	1	0,0029	0,0065	0,3627
NM_000875.4:c.2783-53_2783-52invTG	<i>IGF1R</i>	intrón	neznáma	-	-	2	N/A ¹⁾	0,0131	-
NM_000875.5:c.-57C>T	<i>IGF1R</i>	exón	neznáma	-	-	1	N/A ¹⁾	0,0065	-
NM_001146006.1:c.179C>T	<i>IGFALS</i>	exón	neznáma	missense	p.Pro60Leu	3	0,0009	0,0196	0,0004

NM_001146006.2:c.1319 G>A	IGFALS	exón	neznáma	missense	p.Arg440His	1	0,0001	0,0065	0,0096
NM_001146006.1:c.17- 196C>T	IGFALS	intrón	neznáma	-	-	1	0,0001	0,0065	0,0196
NM_001146006.1:c.16+21 G>A	IGFALS	intrón	neznáma	-	-	1	0,0002	0,0065	0,0279
NM_001146006.1:c.768C >G	IGFALS	exón	neznáma	synonymný	p.Ala256=	1	0,0003	0,0065	0,0460
NM_001146006.1:c.1822 G>A	IGFALS	exón	neznáma	missense	p.Asp608Asn	1	0,0014	0,0065	0,1913
NM_001146006.1:c.1471 C>G	IGFALS	exón	neznáma	missense	p.Leu491Val	1	0,0017	0,0065	0,2256
NM_001146006.2:c.1817 G>T	IGFALS	exón	neznáma	missense	p.Gly606Val	1	N/A ¹⁾	0,0065	-
NG_011778.1:g.3807C>T	IGFALS	5'UTR	neznáma	-	-	1	N/A ¹⁾	0,0065	-
NM_003995.3:c.1558- 18T>C	NPR2	intrón	neznáma	-	-	1	0,0000	0,0065	0,0040
NM_003995.3:c.*209A>G	NPR2	exón	neznáma	-	-	1	0,0000	0,0065	0,0042
NM_003995.3:c.988- 45C>T	NPR2	intrón	neznáma	-	-	1	0,0000	0,0065	0,0071
NM_003995.3:c.1572C>T	NPR2	exón	neznáma	synonymný	p.Tyr524=	1	0,0001	0,0065	0,0269
NM_003995.3:c.2712+49 G>A	NPR2	intrón	neznáma	-	-	1	0,0003	0,0065	0,0463
NM_003995.3:c.2643+39 T>G	NPR2	intrón	neznáma	-	-	2	0,0037	0,0131	0,1134
NM_003995.4:c.2372+18 G>A	NPR2	intrón	neznáma	-	-	1	0,0009	0,0065	0,1338
NM_003995.3:c.1711- 8delT	NPR2	intrón	neznáma	-	-	1	N/A ¹⁾	0,0065	-
NM_003995.3:c.2372+45 T>C	NPR2	intrón	neznáma	-	-	1	N/A ¹⁾	0,0065	-
NM_003995.3:c.667+109 G>A	NPR2	intrón	neznáma	-	-	1	N/A ¹⁾	0,0065	-

NM_003995.3:c.987+37G>A	NPR2	intrón	neznáma	-	-	1	N/A ¹⁾	0,0065	-
NM_003995.3:c.988-66C>A	NPR2	intrón	neznáma	-	-	1	N/A ¹⁾	0,0065	-
NM_000451.3:c.544+9C>T	SHOX	intrón	neznáma	-	-	1	0,0000	0,0065	0,0040
NM_000451.3:c.-9delG	SHOX	exón	neznáma	-	-	1	0,0009	0,0065	0,1287
NM_006883.2:c.676T>C	SHOX	exón	neznáma	stop loss	p.Ter226Argext Ter22	1	0,0024	0,0065	0,3132
NM_006883.2:c.*554G>C	SHOX	exón	neznáma	-	-	1	0,0053	0,0065	0,5608
NC_000023.11:g.(?780700) (835572_?)del ²⁾	SHOX	intrón	patogénna	CNV	-	1	0,0028	0,0065	2,3x
NC_000023.11:g.(?_850581) (1029698_?)del ²⁾	SHOX	intrón	neznáma	CNV	-	1	-	0,0065	-
NM_012448.3:c.682-117C>T	STAT5B	intrón	neznáma	-	-	2	0,0000	0,0131	0,0001
NM_012448.3:c.285+76C>A	STAT5B	intrón	neznáma	-	-	1	0,0001	0,0065	0,0197
NM_012448.3:c.637G>T	STAT5B	exón	neznáma	missense	p.Ala213Ser	1	0,0001	0,0065	0,0207
NM_012448.3:c.2077+93C>T	STAT5B	intrón	neznáma	-	-	2	0,0024	0,0131	0,0551
NM_012448.3:c.285+24A>C	STAT5B	intrón	neznáma	-	-	1	N/A ¹⁾	0,0065	-
NM_012448.3:c.990-73A>C	STAT5B	intrón	neznáma	-	-	1	N/A ¹⁾	0,0065	-
NM_012448.4:c.1169+38C>G	STAT5B	intrón	neznáma	-	-	1	N/A ¹⁾	0,0065	-

¹⁾ N/A – frekvencia variantu v nefinskej populácii nie je dostupná (prvý záchyt), a tak nebol vyhodnocovaný Fisher Exact Test.

²⁾ Ide o CNV variant, ktorých frekvencia je pre ich rozličnú veľkosť ťažko určiteľná. Uvedená frekvencia bola získaná z Database of Genomic Variants (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>) a zachytáva celkovú frekvenciu v populácii. Pre absenciu potrebných údajov nebol počítaný Fisher Exact Test.

Príloha 2: Tabuľka detegovaných variantov v regulátoroch génu *SHOX*.

Koordináty hg19/GhR37	Regulátor	Zmena	Počet pacientov	Frekvencia v nefínskej populácii	Frekvencia v testovanom súbore	Fisher exact test
X:398649	CNE-5	C>T	1	N/A ¹⁾	0,0075	-
X:398703	CNE-5	C>T	6	0,0989	0,0448	0,0397
X:398814	CNE-5	G>A	40	0,5628	0,2985	< 0,00001
X:398826	CNE-5	G>T	14	0,1358	0,1045	0,3737
X:398866	CNE-5	C>T	1	N/A ¹⁾	0,0075	-
X:398875	CNE-5	G>A	6	0,0437	0,0448	0,8324
X:398933	CNE-5	G>A	6	0,0175	0,0448	0,0319
X:460339	CNE-3	G>A	23	0,0036	0,1716	< 0,00001
X:460348	CNE-3	T>A	1	N/A ¹⁾	0,0075	-
X:460386	CNE-3	del CCCC	12	0,2438	0,0896	< 0,00001
X:460522	CNE-3	C>G	1	0,0001	0,0075	0,0178
X:460959	CNE-3	G>T	1	0,7748	0,0075	< 0,00001
X:516751	CNE-2	G>C	11	0,0451	0,0821	0,0558
X:517106	CNE-2	ins G	5	0,0274	0,0373	0,4214
X:517191	CNE-2	del T	1	0,0067	0,0075	0,5946
X:668403	CNE2	del T	1	0,0013	0,0075	0,1612
X:668448	CNE2	C>G	16	0,2132	0,1194	0,0076
X:668454	CNE2	A>G	39	0,5817	0,2910	< 0,00001
X:668469	CNE2	ins C	18	0,1111	0,1343	0,4062
X:668583	CNE2	G>A	51	0,8689	0,3806	< 0,00001
X:694553	CNE3	T>G	1	N/A ¹⁾	0,0075	-
X:694614	CNE3	ins A	2	0,0240	0,0149	0,7738
X:694762	CNE3	C>A	4	0,0078	0,0299	0,0223
X:694994	CNE3	C>A	33	0,4600	0,2463	< 0,00001
X:714104	CNE4	del A	5	0,0315	0,0373	0,6169
X:714115	CNE4	ins T	20	0,1256	0,1493	0,4308

X:714122	CNE4	C>T	1	0,0027	0,0075	0,3137
X:714167	CNE4	T>C	8	0,0837	0,0597	0,4306
X:714285	CNE4	del A	6	0,0229	0,0448	0,1332
X:714308	CNE4	A>G	1	N/A ¹⁾	0,0075	-
X:714359	CNE4	ins A	3	0,0003	0,0224	0,0000
X:714359	CNE4	del A	38	0,4263	0,2836	0,0008
X:714481	CNE4	G>T	1	0,0013	0,0075	0,1664
X:750834	CNE5	G>A	2	0,0365	0,0149	0,2454
X:750899	CNE5	G>C	2	0,0061	0,0149	0,2018
X:750996	CNE5	C>G	26	0,0179	0,1940	< 0,00001
X:750998	CNE5	G>C	2	0,0002	0,0149	0,0010
X:751002	CNE5	G>C	2	N/A ¹⁾	0,0149	-
X:751009	CNE5	T>G	8	0,0203	0,0597	0,0068
X:751011	CNE5	G>T	3	0,1803	0,0224	< 0,00001
X:751096	CNE5	C>G	2	0,0104	0,0149	0,4400
X:751132	CNE5	C>T	1	0,0064	0,0075	0,5772
X:751205	CNE5	C>T	1	0,0084	0,0075	1,0000
X:751267	CNE5	C>T	4	0,0096	0,0299	0,0424
X:751678	CNE5	G>C	1	0,0065	0,0075	0,5873
X:765723	CNE6	A>T	1	0,0355	0,0075	0,0944
X:766190	CNE6	G>A	3	0,0070	0,0224	0,0710
X:766263	CNE6	C>A	1	0,0082	0,0075	1,0000
X:766320	CNE6	G>C	19	0,2642	0,1418	0,0011
X:780642	CNE7	A>C	1	0,4230	0,0075	< 0,00001
X:780728	CNE7	A>C	118	0,7311	0,8806	0,0000
X:780758	CNE7	G>A	24	0,2854	0,1791	0,0068
X:780832	CNE7	A>C	13	0,1592	0,0970	0,0564
X:780946	CNE7	G>A	1	0,0005	0,0075	0,0690
X:780959	CNE7	del GG	26	0,2042	0,1940	0,8302
X:780991	CNE7	del T	26	0,3517	0,1940	0,0001

X:781031	CNE7	G>A	30	0,3779	0,2239	0,0002
X:781139	CNE7	A>T	39	0,4273	0,2910	0,0015
X:781162	CNE7	G>A	3	0,0133	0,0224	0,2668
X:811516	CNE8	C>T	1	0,0124	0,0075	1,0000
X:811554	CNE8	C>T	62	0,0327	0,4627	< 0,00001
X:811598	CNE8	del 12 nt	22	0,0326	0,1642	< 0,00001
X:811606	CNE8	C>T	47	0,6371	0,3507	< 0,00001
X:811630	CNE8	T>C	1	0,0104	0,0075	1,0000
X:811631	CNE8	G>A	1	0,0101	0,0075	1,0000
X:811632	CNE8	G>T	1	N/A ¹⁾	0,0075	-
X:811633	CNE8	G>A	1	0,0224	0,0075	0,3753
X:811653	CNE8	C>T	1	0,0110	0,0075	1,0000
X:811692	CNE8	C>T	4	0,0010	0,0299	0,1350
X:811696	CNE8	G>T	1	0,0008	0,0075	0,1092
X:811698	CNE8	T>G	1	0,0006	0,0075	0,0827
X:811957	CNE8	T>C	1	0,0379	0,0075	0,0660
X:811962	CNE8	A>G	47	0,7013	0,3507	< 0,00001
X:811972	CNE8	C>T	3	0,0304	0,0224	0,8009
X:812287	CNE8	G>T	15	N/A ¹⁾	0,1119	-
X:812295	CNE8	A>G	12	N/A ¹⁾	0,0896	-
X:835264	CNE9	C>A	1	0,0010	0,0075	0,1347
X:835295	CNE9	T>C	57	0,2505	0,4254	0,0000
X:835370	CNE9	G>A	1	0,0004	0,0075	0,0609
X:835501	CNE9	G>A	1	0,0000	0,0075	0,0087
X:835551	CNE9	G>T	11	0,0807	0,0821	0,8738
X:835632	CNE9	G>A	1	0,2521	0,0075	< 0,00001

¹⁾ N/A – frekvencia variantu v neľinskej populácii nie je dostupná (prvý záchyt), a tak nebol vyhodnocovaný Fisher Exact Test.