MASARYKOVA UNIVERZITA

LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Zkrácení diagnostické odysey a multidisciplinární přístup k dětským pacientům bez diagnózy: od pilotního projektu a translačního výzkumu k systému péče

HABILITAČNÍ PRÁCE

obor Pediatrie

komentovaný soubor prací

Brno 2026 MUDr. Kateřina Slabá, Ph.D.

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji prof. RNDr. Ondřeji Slabému, Ph.D. a celému týmu CEITEC MU, zejména Mgr. Petře Pokorné, Ph.D., Mgr. Kamile Říhové, Ph.D., Mgr. Kateřině Koželkové a Ing. Elišce Hlouškové, za dlouhodobou spolupráci v oblasti pokročilé genomické a funkční diagnostiky. Děkuji doc. MUDr. Petru Jabandžievovi, Ph.D., za podporu a spolupráci při vedení Multioborové indikační komise a doc. MUDr. Regině Demlové, Ph.D., a celému týmu centra CREATIC za spolupráci při hledání nových diagnostických a terapeutických možností pro pacienty se vzácnými onemocněními. Poděkování patří také kolegům z partnerských center projektu Baby Fox a především všem pacientům a jejich rodinám za jejich důvěru a ochotu být součástí této práce. Děkuji také své rodině za podporu, trpělivost a pochopení.

OBSAH

KOMENTÁŘ ... **3**

COMMENTARY ... **4**

1. Vzácná onemocnění a dětští pacienti bez diagnózy – teoretický úvod ... **6**

1.1 Definiční vymezení a klasifikace ... 6

1.2 Prevalence a epidemiologie ... 6

1.3 Diagnostická odysea ... 7

1.4 Mezinárodní a národní sítě pro nediagnostikované pacienty ... 8

1.5 Systém organizace péče o vzácná onemocnění v České republice a EU ... 9

1.6 Komplexní diagnostický proces u dětských pacientů bez diagnózy ... 11

1.6.1 Přehled diagnostických metod ... 11

1.6.2 Klasifikace variant a interpretační rámec ... 13

1.6.3 Přístup u exom-negativních pacientů ... 14

1.7 Přehled klíčových studií ... 16

1.7.1 Studie zaměřené na nediagnostikované pacienty ... 17

1.7.2 Rychlá genomika u kriticky nemocných pacientů ... 18

1.8 Terapeutické přístupy u vzácných onemocnění ... 19

2. Institucionalizace péče o nediagnostikované pacienty ve Fakultní nemocnici Brno ... **22**

2.1 Historie a vznik programu ... 22

2.2 Diagnostický proces a multioborový přístup ... 23

2.3 Charakteristika a vývoj souboru pacientů ... 24

2.4 Publikované výsledky a přehled vybraných kazuistik ... 25

3. Systémový a národní dopad ... **29**

4. Funkční genomika a translace směrem k terapii ... **31**

4.1 Tři základní oblasti translační precizní medicíny u vzácných onemocnění ... 31

4.2 Příklad funkční genomiky, ověření varianty nejasného významu *CYP2U1* ... 31

4.3 Příklad molekulárního modelování, dominantně negativní efekt varianty *ADAR* ... 33

4.4 Matchmaking a mezinárodní sdílení dat ... 34

4.5 Platforma pro repurposing léčiv ... 35

5. Baby Fox, národní program rychlé genomiky u kriticky nemocných dětí ... **38**

5.1 Zdůvodnění a design studie ... 38

5.2 Průběžné výsledky ... 39

5.3 Ilustrativní kazuistiky ... 40

6. Závěr ... **43**

7. Literatura ... **44**

8. Seznam zkratek ... **49**

9. Seznam obrázků ... **51**

10. Seznam kazuistik ... **52**

11. Seznam příloh, plné texty vlastních publikací ... **53**

12. Přílohy ... **54**

KOMENTÁŘ

Vzácná onemocnění představují navzdory své individuálně nízké prevalenci závažný zdravotní a společenský problém. V Evropské unii jsou definována jako život ohrožující nebo závažná chronická onemocnění s prevalencí nižší než 5 osob z 10 000 [1]; obdobná, číselně odlišná vymezení používají USA (Orphan Drug Act, 1983) [2] i Japonsko [3]. Souhrnně postihují přibližně 1 z 16 obyvatel Evropy, tedy 27–36 milionů osob [4,5], a celosvětově stovky milionů pacientů. Přibližně 80 % vzácných onemocnění má genetický podklad, asi 70 % se manifestuje již v dětském věku [1] a až 30 % postižených dětí se nedožije pěti let [6].

Jejich diagnostiku komplikuje mimořádná heterogenita klinických obrazů, omezená dostupnost specializované expertizy a u části pacientů i dosud nepoznaný molekulární nebo nozologický podklad. Důsledkem je diagnostická odysea, která podle dat EURORDIS trvá v průměru 4,7–5 let, u čtvrtiny pacientů přesahuje pět let a u poloviny až tří čtvrtin nemocných zahrnuje alespoň jednu chybnou diagnózu [7,8]. Habilitační práce na tento problém nereaguje pouze popisem dostupných metod a přístupů, ale syntetizuje výsledky programu, který pro tyto pacienty budujeme ve FN Brno od roku 2019, a to od klinické indikace a genomické analýzy přes funkční ověření variant až po terapeutické a systémové využití nálezu a multioborovou péči.

Východiskem bylo ověření využitelnosti singleton WES v pilotní kohortě nediagnostikovaných dětských pacientů ve FN Brno. Publikace [29] prokázala diagnostickou výtěžnost srovnatelnou se zahraničními programy a současně doložila proveditelnost multidisciplinárního organizačního modelu pro nediagnostikované dětské pacienty ve FN Brno. Výsledky se staly podkladem pro vznik Multioborové indikační komise, založení první samostatné Ambulance pro dětské pacienty bez diagnózy v ČR v roce 2023 a ustanovení UDP (undiagnosed patients) programu FN Brno. V kohortě 58 pacientů bylo nalezeno 28 relevantních variant u 25 dětí (43 %), přičemž klinická využitelnost nálezu dosáhla 76 %. Navazující publikace rozšířily fenotypové spektrum u kauzálních genů *PMM2* [79], *MYRF* [81] a *DYRK1A* [82] a popsaly první české případy onemocnění asociovaného s *PPP2R5D* [80] a ReNU syndromu [83], přičemž rychlé zachycení ReNU syndromu zároveň ukázalo význam průběžné reanalýzy genomických dat. K dnešnímu dni bylo již do UDP programu FN Brno zařazeno celkem 387 pacientů s diagnostickou výtěžností 38 %.

Další rovinu představuje propojení klinického programu s funkční genomikou a translační precizní medicínou v centru CREATIC LF MU. Jedná se o integrující koordinační platformu, v níž klinická charakterizace určuje směr laboratorního výzkumu a jeho výsledky se vracejí do péče o konkrétního pacienta. Funkční analýzy variant *CYP2U1* kombinující strukturní molekulové modelování, buněčné modelové systémy a enzymatické testy umožnily objasnit jejich patogenitu, podpořily reklasifikaci a otevřely prostor pro úvahy o experimentální genové terapii [84]. Obdobný přístup byl uplatněn u varianty v genu *ADAR* [85]. Součástí rozvíjené platformy je také individualizovaný repurposing léčiv, který není zaměřený na nemoc, ale na konkrétní gen a variantu daného pacienta.

Zkušenosti z UDP programu FN Brno umožnily vznik programu Baby Fox, který je z FN Brno laboratorně i klinicky koordinován jako první celonárodní program rychlého celogenomového sekvenování kriticky nemocných novorozenců a dětí v ČR. K srpnu 2026 dosáhl u 89 pacientů diagnostické výtěžnosti 43,8 %, klinicky relevantního výsledku u 57,3 % a průměrné doby pěti dnů od odběru do vydání protokolu. U 60 % diagnostikovaných pacientů měl nález přímý dopad na péči.

Význam UDP programu navíc přesahuje rámec jednotlivých publikací a projektů a promítá se také do organizace systému. Zkušenosti získané při jeho budování byly využity při přípravě Národní strategie pro vzácná onemocnění 2026–2035, která ve SWOT analýze uvádí UDP program FN Brno jako jednu ze silných stránek systému. UDP program tak ukazuje, že klinicky ukotvený model může účinně propojovat genomickou diagnostiku, specializovanou péči a translační výzkum a současně přispívat k dalšímu rozvoji péče o pacienty se vzácnými a nediagnostikovanými onemocněními i na národní úrovni.

COMMENTARY

Despite their individually low prevalence, rare diseases represent a major health and societal challenge. In the European Union, they are defined as life-threatening or serious chronic conditions with a prevalence of fewer than 5 in 10,000 people [1]; the United States (Orphan Drug Act, 1983) [2] and Japan [3] use similar definitions with different numerical thresholds. Collectively, rare diseases affect approximately 1 in 16 Europeans, corresponding to 27–36 million people [4,5], and hundreds of millions worldwide. Approximately 80% of rare diseases have a genetic basis, around 70% manifest during childhood [1], and up to 30% of affected children do not survive beyond the age of five [6].

Their diagnosis is complicated by the extraordinary heterogeneity of clinical presentations, limited access to specialized expertise and, in some patients, a molecular or nosological basis that has yet to be identified. The resulting diagnostic odyssey lasts an average of 4.7–5 years according to EURORDIS data, exceeds five years in one quarter of patients, and includes at least one misdiagnosis in one half to three quarters of affected individuals [7,8]. Rather than merely describing the available methods and approaches, this habilitation thesis synthesises the results of a program that we have been developing at University Hospital Brno (UHB) since 2019, encompassing the entire pathway from clinical indication and genomic analysis through functional validation of variants to the therapeutic and systemic application of diagnostic findings.

The program originated from an evaluation of the utility of singleton WES in a pilot cohort of undiagnosed pediatric patients at UHB. The results [29] demonstrated a diagnostic yield comparable to that of international programs and confirmed the feasibility of a multidisciplinary organizational model for undiagnosed pediatric patients at UHB. The results further provided the basis for establishing the Multidisciplinary Indication Committee, the first dedicated Outpatient Clinic for Undiagnosed Pediatric Patients in the Czech Republic in 2023, and the UHB Undiagnosed Patients (UDP) Program. In a cohort of 58 patients, 28 relevant variants were identified in 25 children (43%), with the clinical utility of the findings reaching 76%. Subsequent publications broadened the phenotypic spectrum associated with the causative genes *PMM2* [79], *MYRF* [81] and *DYRK1A* [82] and described the first Czech cases of disorders associated with *PPP2R5D* [80] and ReNU syndrome [83]. The rapid identification of ReNU syndrome also demonstrated the importance of continuous genomic data reanalysis. To date, a total of 387 patients have been enrolled in the UHB UDP Program, with a diagnostic yield of 38%.

A further dimension is the integration of the clinical program with functional genomics and translational precision medicine at the CREATIC. This integrated coordination platform enables clinical characterization to guide the direction of laboratory research and its results to be translated back into the care of the individual patient. Functional analyses of *CYP2U1* variants combining molecular structural modelling, cellular model systems and enzymatic assays clarified their pathogenicity, supported their reclassification and opened the possibility of exploring experimental gene therapy [84]. A similar integrative approach was applied to a variant in the *ADAR* gene [85]. The developing platform also includes individualized drug repurposing focused not on the disease in general, but on the specific gene and variant identified in the individual patient.

Experience gained through the UDP program enabled the establishment of Baby Fox, the first nationwide rapid whole-genome sequencing program for critically ill neonates and children in the Czech Republic, which is coordinated both clinically and at the laboratory level from UHB. By August 2026, the program had enrolled 89 patients and achieved a diagnostic yield of 43.8%, a clinically relevant result in 57.3%, and a mean turnaround time of five days from sample collection to report issuance. In 60% of diagnosed patients, the finding had a direct impact on clinical care.

The significance of the UDP program extends beyond individual publications and projects and is also reflected in the organization of the healthcare system. Experience gained during its development

informed the preparation of the National Strategy for Rare Diseases 2026–2035, whose SWOT analysis identifies the UHB UDP program as one of the strengths of the system. The program therefore demonstrates how a clinically embedded model can effectively integrate genomic diagnostics, specialized care and translational research while contributing to the further development of care for patients with rare and undiagnosed diseases at the national level.

1. Vzácná onemocnění a dětští pacienti bez diagnózy – teoretický úvod

1.1 Definiční vymezení a klasifikace

Definice vzácného onemocnění se mezinárodně liší. Evropská komise vymezuje vzácné onemocnění prevalencí nižší než 5 : 10 000 [1]; v USA se za vzácné považuje onemocnění postihující méně než 200 tisíc obyvatel (~1 : 1600), definice zavedená Orphan Drug Act z roku 1983 [2]; v Japonsku je hranicí 50 000 postižených osob (~1 : 2500) [3] (přehledně v Tab. 1). Nejčastější skupiny vzácných onemocnění tvoří dědičné metabolické poruchy, systémová autoimunitní a revmatologická onemocnění, nervosvalová onemocnění, vybraná kardiovaskulární a endokrinologická onemocnění, poruchy imunity a autoinflamatorní onemocnění a vzácná nádorová onemocnění. Vzácná onemocnění se mohou manifestovat od narození (infantilní forma spinální muskulární atrofie, osteogenesis imperfecta) přes raný dětský věk (Gaucherova a Niemann-Pickova choroba) až po dospělost (Huntingtonova choroba, amyotrofická laterální skleróza); u některých je klinický obraz přítomen již v dětství, ale diagnóza je stanovena později (Rettův syndrom, syndrom fragilního X). Velice specifickou oblast, a to jak z hlediska diagnostiky, tak péče, potom představují tzv. **ultra-vzácná onemocnění** (ultra-rare diseases, s prevalencí nižší než jeden pacient na 200 tisíc osob, nebo celosvětově počet popsaných případů nižší něž 30) a **pacienti bez diagnózy** (viz kap. 2).

Tabulka 1. Srovnání definic vzácných onemocnění, odhadované postižené populace a legislativního rámce dle regionu.

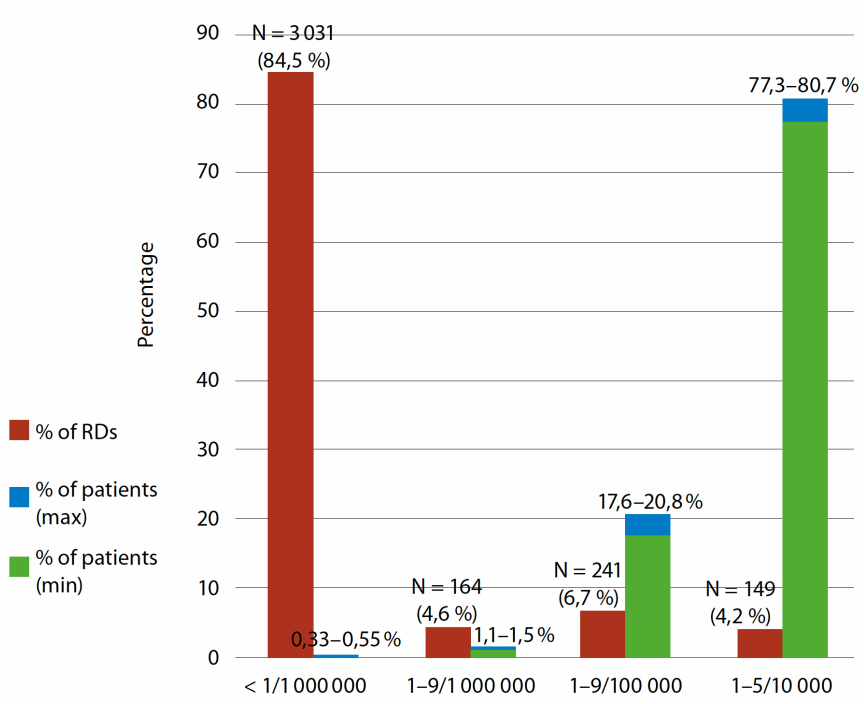
Region / rámec	Definice prevalence	Odhad postižené populace	Klíčový legislativní rámec
Evropská unie	< 5 : 10 000	27–36 milionů (6–8 % populace)	Nařízení (EK) č. 141/2000 o léčivých přípravcích pro vzácná onemocnění
USA	< 200 000 osob (~1 : 1 600)	cca 25–30 milionů	Orphan Drug Act, 1983
Japonsko	< 50 000 osob (~1 : 2 500)	neuvedeno souhrnně	Designated Intractable Diseases
Austrálie	< 2 000 osob na diagnózu	neuvedeno souhrnně	Therapeutic Goods Administration
Čína	specifický seznam diagnóz	neuvedeno souhrnně	First List of Rare Diseases (2018)
Celosvětově	různé národní definice	stovky milionů (řádově 300–400 mil.)	WHO doporučení, ICD-11 kódování vzácných onemocnění

Léčba je dostupná jen u necelých 5 % vzácných onemocnění [11]; v EU je registrováno přes 230 tzv. orphan drugs s cílem rozšířit jejich počet o dalších 1 000 do roku 2027 [12]. Vzhledem k heterogenitě klinických obrazů a chybějícím jednotným léčebným doporučením vznikla **Evropská referenční síť center pro vzácná onemocnění (ERN)**, do níž je zapojeno i několik pracovišť z ČR (viz kap. 1.5).

„Sirotčí“ (orphan) charakter vzácných onemocnění je dán především skutečností, že až do poslední dekády byly tyto nemoci mimo oblast hlavního zájmu klinické medicíny, s výjimkami některých onemocnění z oblasti dědičných poruch metabolismu. Vzácná onemocnění proto představují významný medicínský i společenský problém.

1.2 Prevalence a epidemiologie

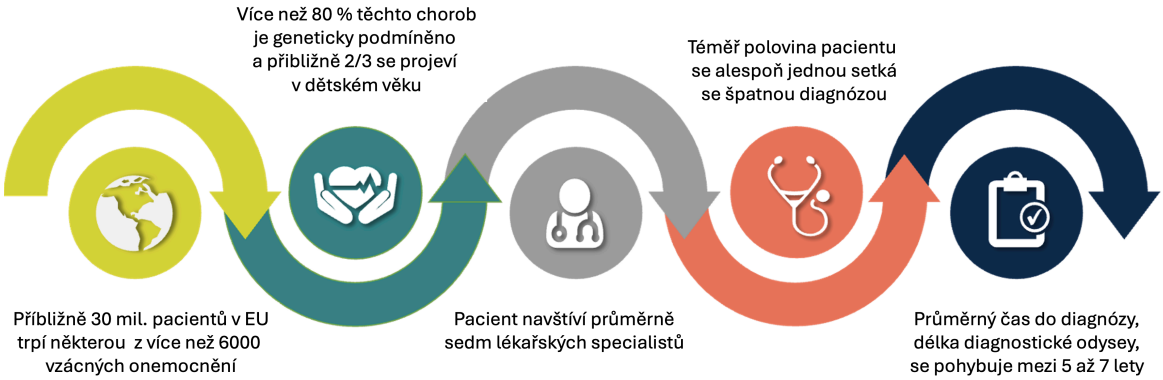
Epidemiologie vzácných onemocnění pracuje spíše s prevalencí než incidencí. V současnosti je popsáno více než 6 000 vzácných onemocnění [4]. Souhrnně postihují 6–8 % populace EU (27–36 milionů lidí) [4], metaanalýza Nguengang Wakap et al. (2020) na základě databáze Orphanet odhaduje kumulativní prevalenci na 3,5–5,9 % populace, přičemž rozložení vzácných onemocnění podle prevalenčních pásem znázorňuje Obr. 1 [5]. V ČR má některé z vzácných onemocnění více než 600 tisíc obyvatel.



Obrázek 1. Rozložení vzácných onemocnění podle prevalenčních pásem a podílu na celkovém počtu postižených pacientů (analýza databáze Orphanet). Upraveno podle Nguengang Wakap et al., 2020 [5].

1.3 Diagnostická odysea

Diagnostická odysea popisuje dlouhou a obtížnou cestu pacientů se vzácným onemocněním k stanovení diagnózy, typicky provázenou opakovanými návštěvami specialistů (průměrně 4–8), zatěžujícími a nákladnými vyšetřeními a často i chybnými diagnózami [7]. Termín má svůj původ v Homérově eposu. Desetiletá cesta Odyssea domů symbolizuje nepředvídatelné překážky, kterým pacienti čelí.



Obrázek 2. Klíčová čísla diagnostické odysey u vzácných onemocnění: cca 30 milionů pacientů v EU, více než 80 % onemocnění geneticky podmíněno, průměrně 7 navštívených specialistů, téměř polovina pacientů se setká s mylnou diagnózou, doba do diagnózy 5–7 let. Upraveno podle dat EURORDIS Rare Barometer [7].

Dle dat **EURORDIS Rare Barometer** trvá diagnostická odysea v EU průměrně 4,7–5 let, u čtvrtiny pacientů déle než 5 let; přibližně 50–73 % pacientů obdrží v jejím průběhu alespoň jednu nesprávnou diagnózu [7,8]. Americká studie Delayed Diagnosis Study odhaduje délku odysey na 6 let s ekonomickým dopadem až 500 tisíc USD na pacienta v nákladech, kterým lze zkrácením diagnostiky předejít [13]. Zkrácení diagnostické odysey přináší prospěch ve třech rovinách: (i) umožňuje dřívější přístup k podpůrným terapiím a léčbě, (ii) oddaluje nebo předchází komplikacím a tělesnému postižení, (iii) eliminuje další nákladná, zatěžující a zbytečná vyšetření [13].

V České republice nejsou k dispozici žádná systematická data o délce diagnostické odysey ani o prevalenci nediagnostikovaných dětských pacientů, což je jedna z mezer, kterou má řešit připravovaný registr pro dětské pacienty bez diagnózy ROADS (Registry fOr PAtients Without DiagnoSis, viz kap. 2 a 5), který připravujeme v rámci **programu pro dětské pacienty bez diagnózy FN Brno (UDP program FN Brno)** společně s centrem excelence **CREATIC** (Central European Advanced Therapy and Immunotherapy Center) Lékařské fakulty Masarykovy univerzity.

Klinické nástroje pro rozpoznání pravděpodobně geneticky podmíněného stavu

Mnemotechnická pomůcka „Family GENES“ (pracovní skupina Genetics in Primary Care) shrnuje klíčové varovné signály:

- F (Family), pozitivní rodinná anamnéza
- G (Group of anomalies), skupina vrozených anomálií; dvě a více anomálií výrazně zvyšuje pravděpodobnost genetického podkladu
- E (Extreme presentations), extrémní/výjimečné projevy běžných stavů (časný nástup kardiovaskulárního onemocnění, nádorů, renálního selhání)
- N (Neurodevelopmental), opoždění neurologického vývoje nebo degenerace
- E (Extreme pathology), extrémní nebo výjimečné patologické nálezy
- S (Surprising labs), překvapivé laboratorní hodnoty [14]

V souvislosti se vzácnými onemocněními, a především s **povědomím (awareness**) o jejich existenci napříč lékaři různých odborností, zvláště pak praktických lékařů, se často hovoří o tzv. **konceptu „5P“**, zahrnujícímu postupně pět následujících kroků: pomyslet – poslat – poznat – pomoci – profinancovat [1].

1.4 Mezinárodní a národní sítě pro nediagnostikované pacienty

Programy pro nediagnostikované pacienty (Undiagnosed Diseases Programs, UDP) vznikly v posledních 15 letech ve většině vyspělých zdravotních systémů. Průkopnický je americký **Undiagnosed Diseases Program NIH** (od 2008) a jeho národní rozšíření Undiagnosed Diseases Network (UDN) [15,16,17]. Mezinárodně však přesto zůstávaly potřeby těchto nediagnostikovaných pacientů neuspokojeny. Aby se tento problém začal řešit, sponzoroval Společný fond v rámci Úřadu ředitele NIH spolu se švédskou Wilhelmovou nadací dvě mezinárodní konference (Řím, 29.–30. září 2014, a Budapešť, 26.–27. června 2015). Zúčastnili se jich zástupci 16 zemí ze 4 kontinentů. Následně byla vytvořena mezinárodní síť **Undiagnosed Diseases Network International – UDNI** [18].

Kromě mezinárodní sítě UDNI vznikaly v posledních deseti letech také národní programy a sítě pro pacienty bez diagnózy, například v Kanadě, Velké Británii, Japonsku, Itálii a dalších. V rámci těchto programů probíhají v daném čase kohortové studie, do kterých jsou průběžně zařazováni pacienti bez diagnózy. V tomto kontextu vznikl i monocentrický **UDP program FN Brno**. Přehled těchto programů a studií je v Tabulce 2 včetně počtu doposud zařazených pacientů/rodin.

Tabulka 2. Přehled mezinárodních programů pro nediagnostikované pacienty.

Program / země	Rok založení	Rozsah / počet pacientů	Klíčová charakteristika
UDP/UDN, USA [15,16,17]	2008 / 2015 (síť)	12 klinických center, tisíce pacientů	Vzor pro řadu národních programů, systematické publikování výstupů
Care4Rare, Kanada [19]	2011	> 1 dekáda výsledků	Zaměření na objevování nových kauzálních genů
UD-PrOZA, Belgie [20]	2018	multidisciplinární program pro dospělé	Cílená adaptace modelu pro dospělou populaci
IRUD, Japonsko [21]	2015	celonárodní síť	6 let zkušeností, systematický reporting
Korejský UDP [22]	fáze I	rozšiřující se síť	Budování dlouhodobé národní infrastruktury
Singapurský UDP [23]	-	pilotní kohorta	Genomická analýza podporující klinický management
Jihoafrický UDP [24]	-	prvních 100 exomů	Program v rozvíjejícím se zdravotním systému
SpainUDP, Španělsko [25]	-	národní síť	Budování dlouhodobé národní infrastruktury
Victoria's UDP, Austrálie [26]	-	prvních 150 rodin	Komplexní diagnostický přístup
100 000 Genomes Project, UK [27]	2013	4660 rodin (pilot)	Systémová integrace WGS do NHS (National Health Service, veřejný zdravotní systém UK)
Švédský národní WGS program [28]	-	3219 pacientů	Vysoká diagnostická výtěžnost napříč klinickými entitami
UDP program FN Brno [9,29]	**2019**	**387 probandů (08/2026)**	**První specializovaný program v ČR**

Sdílení dat mezi jednotlivými centry umožňují mezinárodní platformy jako GeneMatcher [30] a PhenomeCentral [31], které slouží k párování pacientů s podobným genotypem nebo fenotypem a k objevování nových genů asociovaných s onemocněním (viz kap. 4.4).

1.5 Systém organizace péče o vzácná onemocnění v České republice a EU

Vedle mezinárodních a národních sítí pro nediagnostikované pacienty (kap. 1.4) stojí péče o pacienty se vzácnými onemocněními na širším institucionálním rámci budovaném na úrovni EU i České republiky přibližně od roku 2010. Tento rámec tvoří přímé systémové pozadí, do něhož je zasazen i **UDP program FN Brno** popsaný v kapitolách 2–5 [32].

Klíčovým nástrojem koncentrace odbornosti na evropské úrovni jsou **Evropské referenční sítě pro vzácná onemocnění (ERN)**, jejichž vznik navrhla v roce 2013 pracovní skupina EUCERD (The European Union Committee of Experts on Rare Diseases) a jejichž právní základ tvoří čl. 12 směrnice 2011/24/EU o uplatňování práv pacientů v přeshraniční zdravotní péči [33]. Sítě sdružují expertízu jednotlivých národních pracovišť pro 24 diagnostických skupin vzácných onemocnění, vedou dlouhodobé registry a v rámci mezinárodní spolupráce vzájemně vyhodnocují a optimalizují kvalitu poskytované péče. V roce 2017 zahájilo činnost 24 ERN sdružujících téměř 900 vysoce specializovaných center; síť se od té doby rozšířila na více než 1 600 zdravotnických jednotek z téměř 400 nemocnic ve všech 27 členských státech EU a v Norsku [34].

Do 22 z 24 ERN jsou v současnosti zapojena i pracoviště z České republiky, chybí zastoupení pouze v ERN TRANSPLANT-CHILD a VASCERN (Tab. 3). Z hlediska účasti v ERN je ČR mezi novými členskými státy EU na prvním místě a v rámci celé Unie na osmém místě, což svědčí o vysoké kvalitě péče o pacienty se vzácnými onemocněními v ČR i o náročnosti procesu mezinárodního auditu, kterému musí žadatelská centra pod dohledem externího auditora Evropské komise vyhovět [33,34].

Tabulka 3. Zapojení vybraných českých pracovišť do Evropských referenčních sítí (ERN) pro vzácná onemocnění (08/2026).

Instituce	**Počet zapojených ERN**	**Příklady sítí relevantních pro obor autorky**
FN Motol a Homolka	15	Endo-ERN, EpiCARE, ERN-RND, ERKNet, ERN-BOND, ERN-CRANIO, ERN-GENTURIS, ERN-ITHACA, ERN-LUNG, ERN-RITA, ERNICA, EURACAN, EURO-NMD, GUARD-HEART, PaedCan-ERN
VFN Praha	7	Endo-ERN, eUROGEN, ERN EYE, MetabERN, ERN RITA, ERN-RND
FN Brno	6	EpiCARE (s FN u sv. Anny), EuroBloodNet, EURO-NMD, ERN PaedCan, ERN Skin, ERN LUNG
Masarykův onkologický ústav	2	EURACAN, GENTURIS

FN Brno je zapojena do sedmi ERN významných pro spektrum diagnóz, se kterými se setkáváme v rámci **UDP programu FN Brno** (kap. 2) a v programu **Baby Fox** (kap. 5), od vzácných epilepsií a nervosvalových onemocnění po vzácná kožní, plicní a hematoonkologická onemocnění včetně nádorů dětského věku. V závislosti na typu diagnózy jsou samozřejmě pacienti referování také do ERN center mimo FN Brno, např. MetabERN a ERN RITA ve VFN Praha, nebo ITHACA ve FN Motol a Homolka.

Na národní úrovni koordinuje agendu vzácných onemocnění **Mezioborová komise pro vzácná onemocnění (MEKOVO)**, poradní orgán Ministerstva zdravotnictví ČR odpovědný za přípravu strategických dokumentů (národní strategie, národní akční plán) a za koordinaci činnosti Národní sítě center pro vzácná onemocnění. Realizaci národních strategií zajišťuje **Národní koordinační centrum pro vzácná onemocnění (NKCVO)** se sídlem ve FN Motol a Homolka, které mimo jiné pravidelně školí praktické lékaře v rozpoznávání časných příznaků vzácných onemocnění [35]. Partnerem NKCVO je **Česká asociace pro vzácná onemocnění (ČAVO)**, zastřešující organizace více než 45 pacientských sdružení a přes 140 individuálních členů, včetně rodin s ultra-vzácnými diagnózami. ČAVO provozuje také odbornou helplinku (help@vzacna-onemocneni.cz) a virtuální Platformu ultra-vzácní a nediagnostikovaní [36]. Tato platforma po řadu let představovala jedinou, byť pouze virtuální, formu podpory nediagnostikovaných pacientů v ČR.

Od roku 2023 je realizován národní projekt **SYPOVO**, jehož cílem je vytvořit standardy sdílené péče („shared care“) napříč vysoce specializovanou, specializovanou, všeobecnou, primární, paliativní a sociální péčí a jasně definovat kompetence jednotlivých poskytovatelů v cestě pacienta systémem. Ve výzkumné oblasti se ČR prostřednictvím Agentury pro zdravotnický výzkum ČR zapojuje do evropského partnerství **European Rare Diseases Research Alliance (ERDERA)**, které koordinuje a spolufinancuje nadnárodní výzkum vzácných onemocnění, přípravu na klinické studie a budování sdílených výzkumných infrastruktur [37].

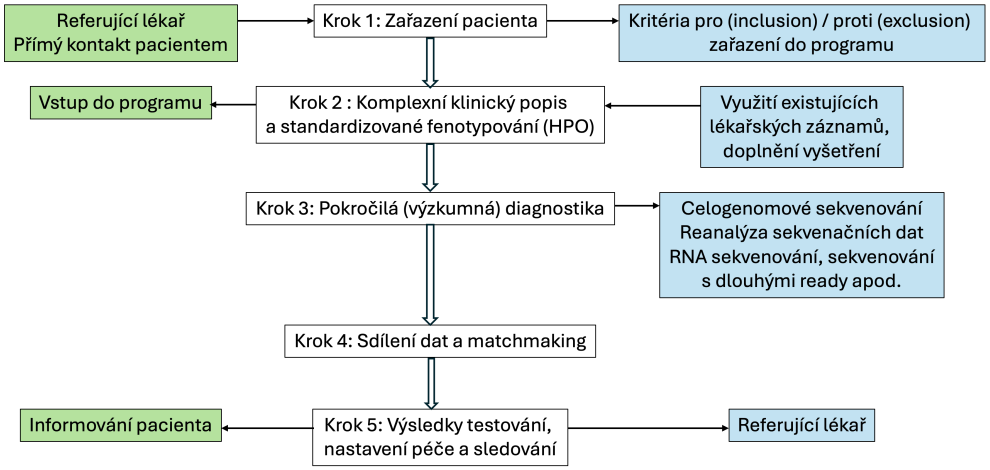
Přeshraniční rozměr péče upravuje směrnice 2011/24/EU, která zavádí národní kontaktní místa pro přeshraniční zdravotní péči a princip úhrady nákladů na péči čerpanou v jiném členském státě do výše, na niž by měl pacient nárok v zemi pojištění [33]. V praxi tento mechanismus naráží

na limity zejména u léčivých přípravků pro vzácná onemocnění (LPVO), jejichž úhrada se mezi členskými státy výrazně liší. Tato disparita je relevantní i pro pacienty popsané v kap. 4, jejichž rodiny se v případě experimentální léčby obracejí na zahraniční pracoviště a klinické studie (viz Kazuistika 3 v kap. 4.2, kde se rodina zapojila do přípravy klinické studie genové terapie plánované v Austrálii).

Institucionální rámec popsaný v této podkapitole (ERN, MEKOVO/NKCVO, ČAVO, SYPOVO a ERDERA) tvoří systémové pozadí vlastního UDP programu FN Brno. Lokální program pro nediagnostikované pacienty (kap. 2) a program Baby Fox (kap. 5) reagují na dlouhodobě chybějící dedikovanou síť pro pacienty bez diagnózy v ČR, zatímco zapojení do projektu JARDIN a do přípravy Národní strategie pro vzácná onemocnění 2026–2035 (kap. 3) propojuje tyto aktivity s národním a evropským rámcem péče o vzácná onemocnění.

1.6 Komplexní diagnostický proces u dětských pacientů bez diagnózy

Diagnostický proces u dětských pacientů bez diagnózy je ze své podstaty komplexní a vícestupňový, zahrnuje řadu klinických, laboratorních i systémových kroků, které se navzájem prolínají a v případě potřeby opakují. Nejde přitom pouze o vlastní genetické vyšetření. Proces zahrnuje standardizovanou fenotypovou charakterizaci pacienta, volbu a indikaci vhodné diagnostické metody, případnou periodickou reanalýzu dříve získaných dat, mezinárodní sdílení nálezů a průběžné přizpůsobování klinické péče na základě nových zjištění, a především o zajištění péče o pacienty, kteří i přes veškeré úsilí zůstávají bez diagnózy. Tento cyklický proces, uplatňovaný v rámci **UDP programu FN Brno**, je schematicky znázorněn na Obrázku 3 a jeho jednotlivé kroky jsou podrobněji rozvedeny v následujících podkapitolách.



Obrázek 3. Obecný diagnostický proces v UDP programu FN Brno. Upraveno podle vlastních dat autorky [9].

1.6.1 Přehled diagnostických metod

Vývoj diagnostiky vzácných a nediagnostikovaných onemocnění byl v posledních 15 letech poháněn zejména zaváděním technologie sekvenování nové generace (next generation sequencing, NGS). Klíčovým milníkem bylo použití **celoexomového sekvenování (WES)** k identifikaci kauzální varianty u mendelovsky děděného onemocnění (Ng et al., 2010) [38], které následně prokázalo svoji klinickou užitečnost v řadě kohortových studií [39,40]. **Celogenomové sekvenování (WGS)** dále rozšiřuje sekvenační pokrytí i na nekódující oblasti a strukturální varianty a v přímém srovnání prokazuje vyšší záchyt patogenních variant než WES [41,42]; trio design (dítě + oba rodiče) dále zvyšuje diagnostickou výtěžnost oproti singleton přístupu, jak dokládá přímé srovnání Tan et al. (2019) [43]. Tabulka 4 shrnuje silné stránky a limitace jednotlivých diagnostických metod používaných v programu. Zatímco WES a jeho trio uspořádání zůstává nejdostupnější vstupní metodou, která je i součástí a nejkomplexnější možností vyšetření v rámci úhradového systému v ČR,

přechod na celogenomové sekvenování přináší nejvyšší diagnostickou výtěžnost, přičemž rychlé WGS (rWGS) s časem do výsledku 3–7 dní již potvrdilo klinickou užitečnost u kriticky nemocných dětí a novorozenců (viz kap. 1.7.2). Doplňkové metody, optické mapování genomu, sekvenování s dlouhým čtením, RNA-seq a metylomová analýza, nejsou určeny k plošnému využití, ale cíleně doplňují diagnostický algoritmus u pacientů, u nichž standardní přístupy selžou (viz kap. 1.6.3). Periodická reanalýza dat a mezinárodní sdílení nálezů (matchmaking) pak představují nízkonákladové, ale časově a odborně náročné nástroje, které dokážou dodatečně zvýšit výtěžnost i u již dříve negativně vyšetřených pacientů.

*Tabulka 4. Rozšířené srovnání diagnostických metod používaných v programu péče o nediagnostikované pacienty. TAT, turnaround time. *Orientační hodnoty dle vlastních dat autorky a citované literatury [32–48].*

Metoda	**Princip**	**Typický TAT**	**Detekuje**	**Dg. výtěžnost***	**Náklady (relativně)**	**Limitace**
Singleton WES	Sekvenování kódujících oblastí, pouze proband	týdny	SNV, malé indely v exonech	~30-40 %	nízké	Chybí trio kontext, nekódující oblasti, CNV omezeně
Trio WES	WES dítě + oba rodiče	týdny	SNV, indely; *de novo* status	~40–45 %	střední	Chybí nekódující oblasti, strukturální varianty
WGS (trio)	Celogenomové sekvenování	týdny	SNV, indely, CNV, část nekódujících variant	~45–55 % (vč. VUS)	vysoké	Cena, bioinformatická a interpretační zátěž
rWGS (trio)	Rychlé (rapidní) celogenomové sekvenování	3–7 dní	SNV, indely, CNV, část nekódujících variant	~45–55 % (vč. VUS)	vysoké	Cena, bioinformatická a interpretační zátěž, provozní zátěž
Optické mapování genomu	Zobrazení dlouhých DNA fragmentů	dny–týdny	Velké strukturální varianty, CNV	doplňková metoda	Střední – vysoké	Nedetekuje bodové varianty
Sekvenování s dlouhým čtením (ONT, PacBio)	Sekvenování dlouhých úseků DNA	Dny–týdny	Strukturální varianty, fázování, metylace	doplňková metoda	velmi vysoké	Cena, nižší dostupnost, bioinformatická náročnost
RNA-seq	Sekvenování transkriptomu	týdny	Sestřihové varianty, expresní změny	doplňková metoda	střední	Tkáňová specificita exprese
Metylom (EPIC array)	Analýza metylačního profilu	týdny	Epigenetické změny, imprinting, episignatures	doplňková metoda	střední	Bioinformatická a interpretační zátěž
Reanalýza dat	Periodická reinterpretace existujících dat	dle intervalu (obvykle 12-24 měsíců)	Nově popsané geny/varianty	+10–15 % dodatečně	nízké	Personální kapacita, systém připomínání
Funkční validace (buněčné modely)	*Ex vivo* exprese, enzymatická aktivita	měsíce	Potvrzení patogenity VUS	reklasifikace VUS→P/LP	vysoké	Časová a personální náročnost

Matchmaking (GeneMatcher, PhenomeCentral)	Sdílení dat mezi centry	týdny–měsíce	Nové gen-nemoc asociace	objevování nových syndromů	nízké	Závislé na globální účasti center

1.6.2 Klasifikace variant a interpretační rámec

Interpretace nalezených variant se řídí doporučeními ACMG/AMP (American College of Medical Genetics and Genomics ve spolupráci s Association for Molecular Pathology), publikovanými Richards et al. (2015) [44], a jejich následnými obecnými upřesněními či upřesněními specifickými pro daný gen a chorobu, zejména doporučeními ClinGen Sequence Variant Interpretation (SVI, https://clinicalgenome.org/working-groups/sequence-variant-interpretation/). Tato doporučení rozdělují varianty do pěti tříd na základě směru (patogenní vs. benigní) a síly souboru důkazů (Tab. 5) a v klinické praxi se dnes pro klasifikaci genových variant používají téměř výhradně. Klasifikace se vždy vztahuje ke konkrétnímu genu, onemocnění a způsobu dědičnosti.

Klasifikace vychází z kombinace nezávislých typů důkazů s definovanou vahou. Ve prospěch patogenity se hodnotí: PVS1 (very strong), tj. předpokládaná varianta se ztrátou funkce v genu (např. nonsense, frameshift, kanonická sestřihová místa), u něhož je ztráta funkce zavedeným mechanismem onemocnění. Síla PVS1 se posuzuje podle typu varianty, její polohy a očekávaného dopadu na transkript. Kritéria PS1–PS4 (strong) zahrnují např. stejnou aminokyselinovou změnu jako u dříve prokázané patogenní varianty (PS1), potvrzený výskyt *de novo* (PS2), dobře zavedené funkční studie (PS3) nebo zvýšený výskyt u postižených oproti kontrolám (PS4). Kritéria PM1–PM6 (moderate) zahrnují např. lokalizaci v mutačním hotspotu či kritické funkční doméně (PM1), absenci nebo extrémně nízkou četnost v populačních databázích (PM2; podle aktuálních doporučení ClinGen SVI se obecně používá v podpůrné síle), průkaz výskytu v *trans* s patogenní variantou u recesivního onemocnění (PM3) a předpokládaný výskyt de novo bez potvrzeného rodičovství (PM6). Kritéria PP1–PP4 představují podpůrné důkazy. Segregace s onemocněním náleží ke kritériu PP1 a více výpočetních predikcí podporujících škodlivý účinek ke kritériu PP3; specifická shoda fenotypu s onemocněním způsobeným daným genem může naplnit PP4. Kritérium PP5 založené pouze na tvrzení důvěryhodného zdroje bez dostupných primárních podkladů se podle doporučení ClinGen SVI nemá používat.

Proti patogenitě, tedy ve prospěch benigní klasifikace, se hodnotí: BA1 (stand-alone), alelová frekvence vyšší, než je slučitelné s daným onemocněním; BS1–BS4 (strong), např. frekvence vyšší, než odpovídá očekávané maximální frekvenci alely, nebo absence segregace; a BP1–BP7 (supporting), mimo jiné missense varianta v genu, u něhož jsou patogenní především varianty vedoucí ke ztrátě funkce. Kritérium BP6, obdobné PP5 a založené pouze na tvrzení externího zdroje, se podle doporučení ClinGen SVI nemá používat. Finální klasifikace vzniká kombinací splněných kritérií podle stanovených pravidel a s přihlédnutím k případným úpravám specifickým pro daný gen a onemocnění. Kombinace PVS1 + PM2 odpovídá podle původních pravidel Richards et al. (2015), při použití PM2 v síle moderate, třídě 4 pravděpodobně patogenní, nikoli patogenní (třída 5). Kombinace PS3 + PM2 + PM3 + PP2 + PP3 může podle původního rámce vést ke třídě 5 patogenní pouze tehdy, je-li kritérium PS3 hodnoceno jako strong a kritéria PM2 i PM3 jako moderate; při současném obecném použití PM2 v podpůrné síle tato kombinace bez dalšího důkazu zpravidla odpovídá třídě 4 pravděpodobně patogenní. Klasifikaci varianty *CYP2U1* p.Arg186His uvedenou v kap. 4.2 je proto nutné posuzovat a vztahovat ke konkrétní síle jednotlivých použitých kritérií a k verzi použitých specifikací.

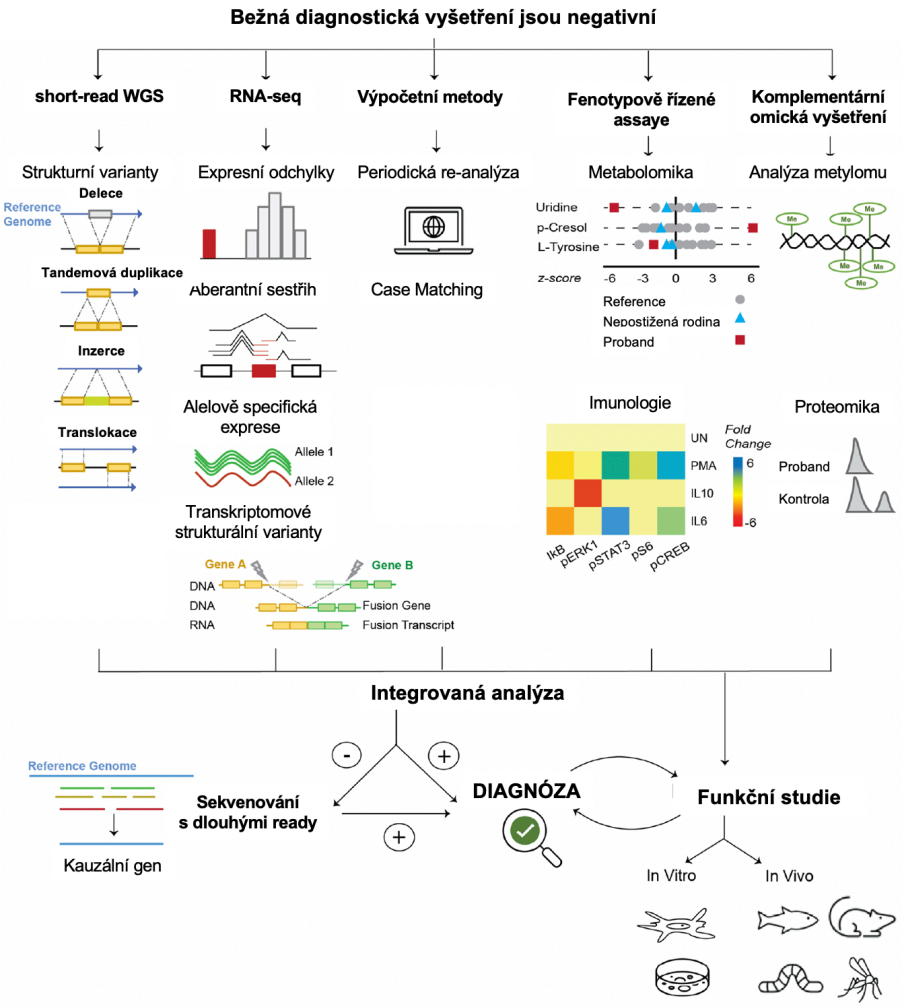
Zvláštní postavení mají funkční studie (PS3 ve směru patogenity, BS3 ve směru benignity), které byly důležité při reklasifikaci varianty *CYP2U1* popsané v kap. 4.2; *in vitro* test prokázal ztrátu enzymatické aktivity, resp. nestabilitu proteinu. V původním rámci Richards et al. (2015) jsou PS3 a BS3 definována jako kritéria se silou strong, samotný funkční výsledek však nelze automaticky hodnotit touto vahou. Podle současných doporučení ClinGen SVI se síla PS3/BS3 stanovuje podle biologické relevance testu, jeho analytické validace, reprodukovatelnosti a počtu i typu patogenních a benigních kontrol a může být supporting, moderate, strong, případně u PS3 ve výjimečných případech very strong. Funkční důkaz proto může být pro reklasifikaci rozhodující, musí však být kombinován s ostatními nezávislými důkazy a nesmí docházet k jejich dvojímu započtení.

Tabulka 5. Systém pěti tříd ACMG/AMP pro klasifikaci variant s příklady platných kombinací kritérií podle Richards et al. (2015) [44]; uvedené síly kritérií mohou být následnými obecnými nebo genově specifickými doporučeními upraveny.

Třída	**Klinický význam**	**Příklady kombinací kritérií podle Richards et al. (2015)**
Třída 5	Patogenní (Pathogenic, P)	např. PVS1 + PS1; PVS1 + PM1 + PM2; nebo PS3 + PM1 + PM3 + PP2 + PP3
Třída 4	Pravděpodobně patogenní (Likely pathogenic, LP)	např. PVS1 + PM2; PS3 + PM2; nebo PM1 + PM2 + PM3
Třída 3	Varianta nejasného významu (VUS)	kritéria jsou nedostatečná nebo si důkazy pro patogenitu a benignitu odporují
Třída 2	Pravděpodobně benigní (Likely benign, LB)	např. BS1 + BP4; nebo BP1 + BP4
Třída 1	Benigní (Benign, B)	např. BA1; nebo BS1 + BS2

1.6.3 Přístup u exom-negativních pacientů

Většina nediagnostikovaných pacientů přicházejících a posuzovaných v rámci **UDP center v USA a EU** (včetně UDP programu FN Brno) již přichází po genetickém vyšetření a jsou tzv. “exom-negativní”. U těchto geneticky nevysvětlených ("exom-negativních") pacientů je třeba implementovat komplexní přístup zahrnující reanalýzu dat [45], sekvenování s dlouhým čtením [46], RNA-sekvenování k záchytu sestřihových defektů [47], metylomovou analýzu, a funkční validaci [48,49,50]. Integrace těchto přístupů je znázorněna na Obr. 4 a tvoří koncepční základ pro diagnostické workflow v rámci UDP programu FN Brno a jeho výzkumné platformy v rámci centra CREATIC (viz kap. 2 a kap. 4).



Obrázek 4. Integrované diagnostické workflow pro pacienty s negativním standardním genetickým vyšetřením. Upraveno podle Marwaha S. et al., Genome Medicine, 2022 [48].

U pacientů, kde tento postup opět nevede k diagnóze, ale k nalezení klinicky relevantních kandidátních VUS, jsou k dispozici funkční studie *in vitro* i *ex vivo* (buněčné modely, organoidy, modelové organismy), jejichž princip a použití v podmínkách centra CREATIC jsou popsány v kapitole 4.

V posledních letech se těžiště výzkumu u pacientů, kteří zůstávají bez diagnózy po všech standardních genetických vyšetřeních, přesouvá k integraci více „omických" přístupů: transkriptomiky, metylomiky a sekvenování s dlouhým čtením. Tabulka 6 shrnuje klíčové recentní studie kvantifikující dodatečný diagnostický přínos jednotlivých přístupů nad rámec samotného exomu/genomu.

Tabulka 6. Studie zaměřené na přínos multi-omických přístupů (long-read sekvenování, transkriptomika, metylomika) u exom/genom-negativních pacientů se vzácným onemocněním.

Studie	Přístup	Kohorta	Dodatečný/absolutní přínos	Rok
Cummings et al., Sci Transl Med [51]	RNA-seq (svalová tkáň)	mendelovské nervosvalové nemoci	průkaz konceptu transkriptomové diagnostiky	2017
Merker et al., Genet Med [52]	WGS s dlouhým čtením (long-read)	kazuistika (kauzální strukturální varianta)	průkaz konceptu pro strukturální varianty nedetekovatelné short-read	2018

Frésard et al., Nat Med [53]	RNA-seq (leukocyty) + velké kontrolní kohorty	geneticky nevyřešené případy	identifikace kauzálních genů z transkriptomu leukocytů	2019
Lee et al., Genet Med [54]	RNA-seq (transkriptom)	geneticky nevyřešené případy	+7 % dodatečných diagnóz	2020
Levy et al., HGG Adv [55]	Nové diagnostické episignatury	geneticky nevyřešené případy	rozšíření epigenetického spektra mendelovských chorob	2021
Lunke et al., Nat Med [56]	WGS + transkriptomika + metylomika + dlouhé čtení – integrovaně	australská národní kohorta	výtěžnost 47 % → 54 %; 77 % nálezů se změnou managementu	2023
Kerkhof et al., Genet Med [57]	Metylomové episignatury	geneticky nevyřešené případy	+18 % diagnóz u dříve nejednoznačných nálezů	2024
Pucel et al., Genet Med [58]	WES/WGS v heterogenní populaci	rare disease kohorta	identifikace prediktorů úspěšného stanovení diagnózy	2024
Lagorce et al., Eur J Hum Genet [59]	Prioritizace variant na základě fenotypové podobnosti	geneticky nevyřešené případy	metodologický přístup k prioritizaci kandidátních variant	2024
Vollger et al., Nat Genet [60]	Synchronizované long-read genom/metylom/epigenom/transkriptom	geneticky nevyřešené případy	kompletní multi-omická charakterizace z jedné long-read platformy	2025

Tato literatura je východiskem pro nastavení vlastního výzkumného programu UDP programu FN Brno a centra CREATIC, který na klinickou kohortu popsanou v kapitole 2 navazuje pilotními daty s funkční validací a implementuje obdobný stupňovitý multi-omický přístup u pediatrických pacientů zůstávajících bez diagnózy po WES.

Z jednotlivých studií vyplývá, že přínos jednotlivých „omických" přístupů je komplementární, nikoli zaměnitelný. Lunke et al. (2023) [56] v celonárodní australské kohortě prokázali, že plně integrovaný multi-omický přístup (WGS spolu s transkriptomikou, metylomikou a sekvenováním s dlouhým čtením) zvyšuje výtěžnost z 47 % na 54 % a u 77 % nově diagnostikovaných pacientů přímo mění klinický management. Jde o dosud nejsilnější evidenci pro plošné zavedení tohoto přístupu. Samotné RNA-sekvenování přináší u nevyřešených mendelovských onemocnění dodatečných 5–7 % diagnóz (Cummings et al. [51], Lee et al. [54]), zatímco metylomové episignatury dokážou reklasifikovat až 18 % dříve nejednoznačných nálezů (Kerkhof et al. [57]). Sekvenování s dlouhým čtením (long-read) má naproti tomu jedinečnou schopnost zachytit strukturální varianty nedetekovatelné klasickým sekvenováním s krátkým čtením (Merker et al. [52]) a v nejnovější podobě (Vollger et al., 2025 [60]) umožňuje kompletní genomovou, metylomovou i transkriptomovou charakterizaci z jediné platformy.

1.7 Přehled klíčových studií

Předchozí podkapitoly byly zaměřeny na jednotlivé diagnostické metody a jejich technické parametry; tato kapitola je doplňuje o systematický přehled publikované evidence, který umožňuje zasadit vlastní výsledky UDP programu FN Brno do širšího mezinárodního kontextu. Vzhledem k tomu, že diagnostická výtěžnost i klinický dopad genomických metod se významně liší podle typu klinické populace a naléhavosti indikace, je kapitola rozdělena na dvě samostatné části. Podkapitola 1.7.1 shrnuje evidenci z programů pro ambulantní nediagnostikované pacienty (UDP), u nichž je

diagnostický proces zpravidla dlouhodobější a klade důraz na komplexní fenotypovou charakterizaci a případnou reanalýzu dat. Podkapitola 1.7.2 naproti tomu shrnuje evidenci z programů rychlé genomiky (rES/rWGS) u kriticky nemocných pacientů na neonatologických a pediatrických jednotkách intenzivní péče (NJIP/JIP), kde je klíčovým parametrem rychlost výsledku a jeho okamžitý dopad na klinické rozhodování.

1.7.1 Studie zaměřené na nediagnostikované pacienty

Studie zaměřené na nediagnostikované pacienty tvoří metodologický základ oboru a zahrnují jak specializované ambulantní programy, tak národní a mezinárodní sítě popsané v podkapitole 1.4. Společným znakem těchto studií je heterogenní, zpravidla chronická pacientská populace s dlouhou diagnostickou odyseou, u níž je diagnostický proces založen na kombinaci komplexní fenotypové charakterizace, celoexomového či celogenomového sekvenování a případné periodické reanalýzy dat a aplikace multiomických přístupů. Následující tabulka shrnuje diagnostickou výtěžnost a klinický dopad vybraných reprezentativních programů, včetně kohorty z UDP programu FN Brno (detailněji v kap. 2.3).

Tabulka 7. Přehled diagnostické výtěžnosti a klinického dopadu vybraných programů pro nediagnostikované pacienty (UDP), včetně UDP kohorty FN Brno.

Studie / program	Populace, N	Metoda	Dg. výtěžnost	Klinický dopad	Rok
Ng et al., první diagnostický WES [38]	kazuistika (Miller sy.)	WES	1/1 (proof of concept)	zavedení metody	2010
Splinter et al., UDN [61]	382 pacientů (komplet. hodnocení), USA	WES/WGS, multidisciplinární tým	35 %	21 % změna terapie	2018
Tan et al., trio vs. singleton [43]	komparativní kohorta	WES	trio > singleton	nižší náklady na dg. u tria	2019
Stranneheim et al. (Švédsko) [28]	3219 pacientů, celostátní program	WGS	~40 %	vysoký klinický dopad	2021
100 000 Genomes Project (UK) [27]	4660 rodin	WGS	25 %	systémový dopad na NHS	2021
Slaba K et al., Sci Rep [29]	58 pediatrických pac. bez dg., FN Brno	Singleton WES	43 %	76 % actionability	2024
Solve-RD, Laurie et al. [62]	6004 rodin (reanalýza), 37 evropských center	systematická reanalýza WES/WGS	12,6 % (8,4 % + 4,1 %)	nové diagnózy	2025
UDP program FN Brno (kap. 2.3)	**387 pediatrických pac.**	**WES/WGS/lrWGS**	**38 %**	**neuvedeno souhrnně**	**08/2026**

Napříč uvedenými programy se diagnostická výtěžnost u ambulantních nediagnostikovaných pacientů pohybuje v rozmezí 25–46 %, přičemž výsledky UDP programu FN Brno (38 %) jsou plně srovnatelné s velkými zahraničními programy (UDN, USA, 35 % [61]; švédský celostátní program,

~40 % [28]). Systematická reanalýza dat v rámci evropského konsorcia Solve-RD dosahuje klinicky významné výtěžnosti (12,6 %), což potvrzuje hodnotu periodické reanalýzy jako doplňkového nástroje k prvotnímu negativnímu vyšetření u pacientů bez diagnózy [62].

1.7.2 Rychlá genomika u kriticky nemocných pacientů

Na rozdíl od ambulantních UDP programů je rychlá genomika u kriticky nemocných pacientů diagnostickým nástrojem nasazovaným přímo u lůžka na jednotkách intenzivní péče, kde rozhoduje o volbě či ukončení intenzivní terapie během hodin až dnů. Metodicky se opírá především o trio celogenomové sekvenování se zkráceným bioinformatickým pipeline, jehož cílem je dosažení klinicky použitelného výsledku v řádu jednotek dnů od odběru vzorku. Následující tabulka shrnuje diagnostickou výtěžnost a klinický dopad publikovaných programů rychlé genomiky u novorozenců a dětí na NJIP/JIP včetně vlastních výsledků projektu Baby Fox.

Tabulka 8. Srovnání diagnostické výtěžnosti a klinického dopadu u vybraných programů rychlé genomiky (rES/rWGS) u kriticky nemocných novorozenců a dětí na NJIP/JIP.

Studie / program	Populace, N	Metoda	Dg. výtěžnost	Dopad	Rok
Petrikin et al., NSIGHT1 [63]	65 probandů (32 rWGS/33 kontrol), USA	Trio rWGS, RCT	31 % (10/32) vs. 3 % kontroly	zkrácení doby do dg. (13 vs. 107 dní), potvrzení proveditelnosti	2018
Farnaes et al. [64]	42 novorozenců/dětí, USA	rWGS	43 % (18/42)	snížení morbidity a nákladů hospitalizace	2018
Baby Bear, Dimmock et al. [65]	USA, novorozenci NICU	rWGS	~40 %	úspora 14 265 USD/dítě	2021
Wu et al., China Neonatal Genomes Project [66]	novorozenci NICU, Čína	Trio rWGS vs. proband rES	36,6 % (vs. 20,3 % rES)	Superiorita WGS nad WES	2021
Krantz et al., NICUSeq [67]	100 novorozenců, USA	rWGS	39 % (32 % + 7 % pravděpodobná)	2× vyšší pravděpodobnost změny péče	2021
Baby Bambi, Marom et al. [68]	130 novorozenců, Izrael (národní pilot)	rWGS (trio)	50 % (65/130)	dopad do péče u části pacientů	2024
Kingsmore et al., metaanalýza [69]	44 studií, děti na NICU/PICU	rWGS/URGS/rES	37 % nová dg.	26 % dopad do péče	2024
Baby Fox, vlastní data (kap. 5.2)	**89/120 pacientů NJIP/JIP**	**rWGS (trio)**	**43,8 % (57,3 % vč. VUS)**	**60 % přímý dopad do péče**	**08/2026**

Diagnostická výtěžnost rychlé genomiky u kriticky nemocných novorozenců a dětí (37–50 %) je srovnatelná s výtěžností dosahovanou u ambulantních nediagnostikovaných pacientů, přičemž projekt Baby Fox (43,8 %, resp. 57,3 % včetně VUS) dosahuje spíše vyšších hodnot napříč uvedenými programy. Klinický přínos je konzistentně vysoký napříč programy, od přímé úspory nákladů (Baby Bear, 14 265 USD/dítě) po změnu léčby u významné části diagnostikovaných pacientů (Baby Fox, Baby Bambi), což dokládá robustnost rychlé genomiky jako diagnostiky první volby v prostředí intenzivní péče napříč odlišnými zdravotními systémy. Časná evidence z randomizovaných studií NSIGHT1 (Petrikin et al., 2018) [63] a observačních kohort (Farnaes et al., 2018) [64] potvrdila, že i při skromnějším rozsahu (42–65 pacientů) vede rWGS k signifikantnímu

zkrácení doby do diagnózy oproti standardní péči. Čínský národní program (Wu et al., 2021) [66] a americká randomizovaná studie NICUSeq (Krantz et al., 2021) [67] následně na větších kohortách (100 a více pacientů) doložily konzistentní diagnostickou výtěžnost 35–40 % a přibližně dvojnásobnou pravděpodobnost změny klinické péče oproti standardnímu postupu. Metaanalýza Kingsmore et al. (2024) [69], zahrnující 44 studií, potvrzuje analytickou u klinickou utilitu rWGS při průměrné diagnostické výtěžnosti na úrovni 37 % nových diagnóz a 26 % změny léčebného postupu, čímž rozšiřují mezinárodní důkazní základnu, do níž se zapojuje také český projekt Baby Fox koordinovaný z FN Brno.

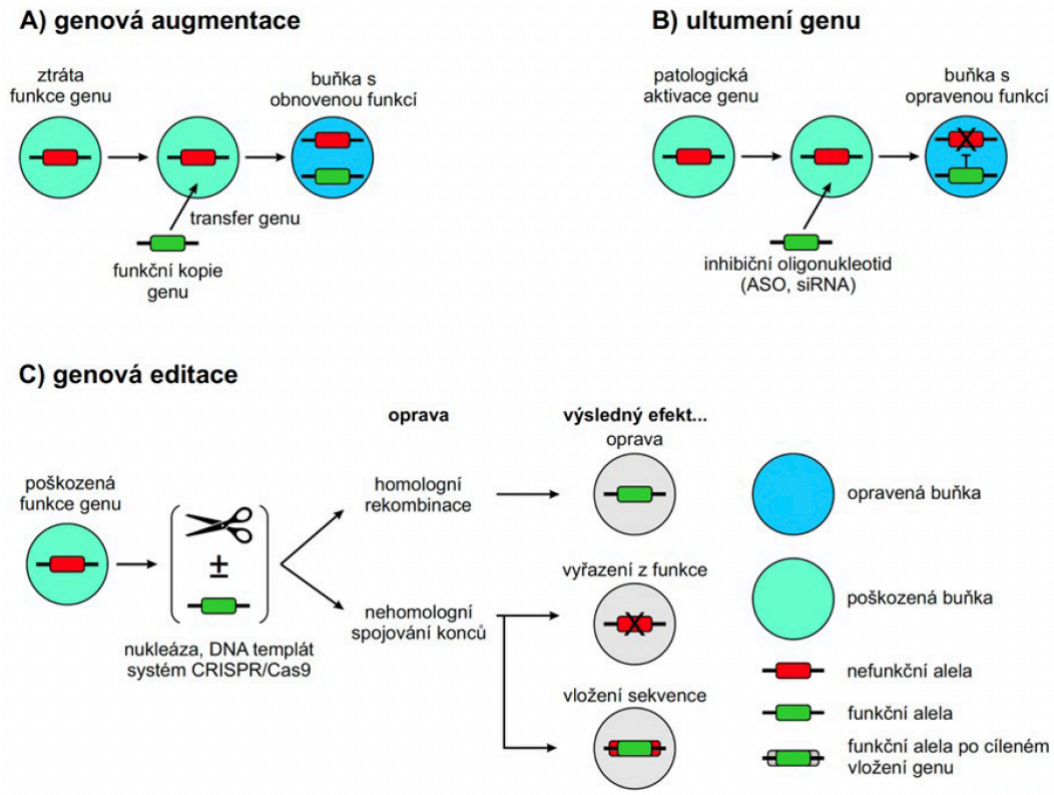
1.8 Terapeutické přístupy u vzácných onemocnění

Kauzální léčba bohužel zůstává i po objasnění genetické etiologie dostupná jen u malé části vzácných onemocnění. Přijetí Orphan Drug Act v roce 1983 umožnilo vývoj více než 500 léčivých přípravků pro vzácná onemocnění [70] a v EU je dnes registrováno přes 230 tzv. orphan drugs s cílem rozšířit jejich počet o dalších 1 000 do roku 2027 [12]. Přesto má schválenou léčbu jen necelých 5 % vzácných onemocnění, u dalších přibližně 15 % je léčivý přípravek ve vývoji nebo s uděleným orphan drug designation [71]. Ojedinělým příkladem úspěšného vývoje léčiva pro ultra-vzácné onemocnění je hereditární orotová acidurie (popsána u méně než 25 pacientů celosvětově), kde byl na základě omezených dat fáze III v roce 2015 schválen uridin triacetát (Xuriden). Jedná se o dosud nejvzácnější onemocnění s registrovanou léčbou [72].

Genová terapie

Genová terapie (GT) je založena na cílené modifikaci buněčné DNA nebo interakci s buněčnou DNA/RNA za účelem aktivace nebo inaktivace konkrétního genu a představuje jeden z nejperspektivnějších přístupů k léčbě monogenně podmíněných vzácných chorob. V letech 2017–2023 bylo v Evropě zahájeno více než 90 klinických studií s přípravky genové terapie u vzácných onemocnění, 12 přípravků již bylo registrováno a dalších 15 je ve třetí fázi klinického hodnocení [73]. Základním cílem GT je (i) nahradit funkci poškozeného genu vložením jeho funkční kopie do buněk pacienta, genová augmentace, (ii) utlumit patologicky aktivní gen pomocí terapeutických oligonukleotidů, nebo (iii) opravit poškozený gen pomocí genové editace. Na rozdíl od symptomatické léčby jde o léčbu kauzální, obnovující funkci poškozeného genu. Základní strategie genové terapie, genová augmentace, umlčení genu a genová editace, jsou shrnuty na Obr. 6.

Přenos genetického materiálu lze provést *in vivo* (přímo v těle pacienta) nebo *ex vivo*, kdy jsou buňky pacienta geneticky modifikovány mimo tělo a následně vráceny zpět; *ex vivo* přístup umožňuje selekci a kontrolu úspěšně modifikovaných buněk před jejich aplikací. Podle nosiče (vektoru) rozlišujeme virovou GT (retroviry, lentiviry, adenoviry, AAV – adeno-asociované viry), používanou zejména u genové augmentace, a nevirovou GT, uplatňovanou především u terapeutických oligonukleotidů.



Obrázek 5. Základní strategie genové terapie: (A) genová augmentace, (B) umlčení genu, (C) genová editace s možnými výsledky opravy pomocí homologní rekombinace nebo nehomologního spojování konců.

Registrované léčivé přípravky využívají všechny tři základní principy: *ex vivo* genová augmentace autologních hematopoetických kmenových buněk (Strimvelis u ADA-SCID, historicky první nemoci léčené genovou terapií), *ex vivo* genová editace pomocí CRISPR/Cas9 (Casgevy u srpkovité anémie), *in vivo* podání virového vektoru AAV2 nesoucího funkční kopii genu *RPE65* (Luxturna u retinální dystrofie) a systémově podávaný AAV9 vektor nesoucí funkční gen *SMN1* (Zolgensma u spinální muskulární atrofie, SMA), jehož účinek přetrvává dlouhodobě po jednorázovém podání [74]. Cena přípravku Zolgensma v ČR přesahuje 50 milionů Kč na pacienta.

Terapeutické oligonukleotidy

Terapeutické oligonukleotidy jsou krátké nukleotidové sekvence interagující s cílovou (pre-)mRNA, dělené na ASO (antisense oligonucleotides), které se váží na komplementární RNA a blokují její translaci nebo modulují sestřih, a siRNA (small interfering RNAs), vyvolávající endonukleázovou degradaci cílové mRNA. Typickým příkladem ASO je nusinersen, který u SMA moduluje sestřih pre-mRNA pseudogenu *SMN2* tak, aby zabránil vynechání exonu 7; u Duchennovy muskulární dystrofie využívají přípravky golodirsen a casimersen princip exon skippingu k obnovení čtecího rámce genu *DMD*. Terapeutická siRNA inklisiran (léčba hypercholesterolémie) vyvazuje mRNA kódující proteázu PCSK9, čímž snižuje odbourávání LDL receptorů. Obdobným mechanismem cílí patisiran a vutrisiran na mRNA transthyretinu (TTR) v léčbě hereditární transthyretinové amyloidózy. Malá velikost cílové sekvence a vysoká konzervovanost činí atraktivní kandidáty pro obdobné terapeutické strategie také z nekódujících RNA, jako je snRNA *RNU4-2* u ReNU syndromu (kap. 2, Příloha 6).

Lékový repurposing

Lékový repurposing (repozicování léčiv), tedy hledání nových indikací pro již existující léčiva, představuje efektivní a ekonomicky dostupnou strategii urychlení vývoje léčby vzácných onemocnění, neboť využívá existující znalosti o bezpečnosti, farmakokinetice a klinické toleranci [75]. Moderní přístupy propojují genomická, transkriptomická, proteomická a metabolomická data

metodami síťové medicíny (network medicine) a umělé inteligence a umožnily identifikovat přes 1000 potenciálních kandidátů pro dosud neléčené vzácné choroby [75]. Klinicky ověřenými příklady jsou sirolimus (původně imunosupresivum) jako inhibitor mTOR u tuberózní sklerózy, metformin v terapii mitochondriálních a nádorových onemocnění, propranolol v léčbě infantilních hemangiomů, sildenafil u plicní arteriální hypertenze, riluzol jako doplňková terapie u SMA či Huntingtonovy choroby a dantrolen v terapii spasticity u neuromuskulárních poruch. Zvláštním směrem je tzv. personalizovaný repurposing, kdy se léčivo vybírá podle individuálního genomického profilu pacienta (N-of-1 přístupy), princip, na němž je přímo postavena platforma pro repurposing léčiv realizovaná v rámci centra CREATIC a popsaná v kap. 4.5.

Ekonomické a regulační aspekty

Zásadní překážkou dostupnosti moderních terapií zůstávají vysoké náklady, složitý regulační proces a jejich omezená dostupnost napříč členskými státy EU (kap. 1.5). Cena jednorázových léčivých přípravků genové terapie přesahuje možnosti většiny národních systémů veřejného zdravotnictví; EU na to reaguje systémem regulačních pobídek (daňové úlevy, prodloužená tržní exkluzivita, vědecké poradenství pro výrobce) v rámci Orphan Drug Regulation, přesto pouze malé procento vzácných onemocnění dosáhne fáze registrace a komerční dostupnosti [76]. Neziskové a pacientské organizace, v českém kontextu zejména ČAVO (kap. 1.5), sehrávají klíčovou roli v koordinaci klinického výzkumu, náboru pacientů a poskytování dat pro postregistrační sledování účinnosti [77,78].

VLASTNÍ PŘÍNOS A KOMENTÁŘ K RELEVANTNÍM PUBLIKACÍM, kapitola 1

Vlastní práce publikovaná v časopise Scientific Reports [29] dokládá, že systematické zavedení singleton WES, tedy celoexomového sekvenování samotného probanda bez současného vyšetření rodičů, do péče o nediagnostikované dětské pacienty přináší diagnostickou výtěžnost plně srovnatelnou s výsledky velkých zahraničních programů. Význam práce nespočívá pouze ve vyhodnocení diagnostické výtěžnosti jedné genomické metody, ale také v ověření organizačního modelu, v němž jsou indikace k vyšetření, interpretace nálezů a jejich převod do klinické péče zajišťovány prostřednictvím multidisciplinární spolupráce.

Získaná data poskytla odborný podklad nezbytný pro rozhodnutí o institucionalizaci programu pro nediagnostikované pacienty ve FN Brno (UDP program FN Brno) a pro vytvoření jeho stabilního klinického a organizačního zázemí (viz kap. 2). Pilotní projekt se následně stal východiskem pro postupné rozšíření programu od singleton WES k celogenomovému a rychlému celogenomovému sekvenování, k začlenění multiomických metod a funkční genomiky a k budování integrované výzkumné platformy propojující klinickou diagnostiku s experimentálním ověřováním variant a hledáním individualizovaných terapeutických možností (kap. 4–5). Publikace [29] tak představuje nejen souhrn výsledků pilotní kohorty, ale také klíčový důkaz proveditelnosti a klinického významu koncepce, z níž se následně rozvinul komplexní translační program péče o děti s ultra-vzácnými a dosud neobjasněnými onemocněními.

2. Institucionalizace péče o nediagnostikované pacienty ve Fakultní nemocnici Brno

2.1 Historie a vznik programu

Vývoj programu lze rozdělit do několika na sebe navazujících fází, shrnutých v Tabulce 9. Výzkumný UDP program vznikl v září 2019 jako společná iniciativa Pediatrické kliniky FN Brno, Biologického ústavu LF MU a CEITEC MU, financovaná zpočátku ze StartUp grantu FN Brno. V letech 2019–2023 proběhla pilotní fáze programu s využitím singleton WES u 58 pacientů; na tuto fázi v letech 2022–2024 navázal rozšiřující projekt (spoluřešitelé K. Slabá a P. Jabandžiev, EK: 12-071222/EK).

Zásadním institucionálním milníkem bylo září 2023, kdy byla otevřena první Ambulance pro dětské pacienty bez diagnózy v ČR a zároveň ustavena Multioborová indikační komise (předseda P. Jabandžiev, místopředsedkyně K. Slabá) na Pediatrické klinice FN Brno a LF MU. Od ledna 2024 byla navázána spolupráce s centrem excelence CREATIC (Central European Advanced Therapy and Immunotherapy Center, https://creatic.muni.cz), translačním pracovištěm Masarykovy univerzity zaměřeným na vývoj pokročilých terapií, financovaným mimo jiné z programu Horizon Europe Teaming for Excellence (grant č. 101059788). Souběžně byla navázána spolupráce s národní infrastrukturou CZECRIN (Czech Clinical Research Infrastructure Network) a jejím centrem CAATS (https://czecrin.cz/en/caats/), které poskytuje expertní podporu při vyhledávání a screeningu vhodných klinických studií a terapeutických možností pro pacienty s nejasnou nebo vzácnou diagnózou. **UDP program FN Brno** je založen na široké mezioborové spolupráci v rámci FN Brno a propojení s akademickými a výzkumnými pracovišti. Díky spolupráci s CEITEC MU a Biologickým ústavem LF MU lze využívat pokročilé genomické metody nad rámec současného systému úhrad v ČR, spolupráce s CREATIC LF MU pak rozšiřuje možnosti vyhledávání experimentální léčby a klinických hodnocení v mezinárodním kontextu.

V srpnu 2024 byl program formálně začleněn pod nově vzniklé Centrum precizní medicíny FN Brno (www.fnbrno.cz/cpm), čímž získal širší infrastrukturní a expertní zázemí. Začlenění do CPM současně přispělo k lepší komunikaci programu směrem k pacientům i odborné a široké veřejnosti, mimo jiné prostřednictvím prezentace pacientských příběhů a medializace aktivit programu (https://www.fnbrno.cz/cpm-pribehy-pacientu, https://www.fnbrno.cz/napsali-o-nas/t7866). O měsíc později, v září 2024, byl zahájen multicentrický projekt **Baby Fox** pro rychlou genomiku u kriticky nemocných dětí a novorozenců, sponzorovaný společností Illumina Inc.. Projekt a jeho výsledky jsou podrobně popsány v kapitole 5. V lednu 2026 založili rodiče pacientů z UDP programu FN Brno pacientskou organizaci **Malý Odyseus** (https://malyodyseus.cz). V březnu 2026 schválila vláda ČR **Národní strategii pro vzácná onemocnění 2026–2035**, která explicitně zmiňuje UDP program FN Brno (viz Národní strategie pro vzácná onemocnění, kap. 3). V květnu 2026 byla v rámci CREATIC LF MU založena samostatná výzkumná skupina Ultra-vzácná onemocnění a pacienti bez diagnózy (vedoucí K. Slabá), která program dále integruje jako výzkumnou platformu, a pro čtvrté čtvrtletí 2026 je ve spolupráci s CREATIC plánováno spuštění registru ROADS (Registry for Patients Without Diagnosis) pro dětské pacienty bez diagnózy.

Tabulka 9. Časová osa institucionalizace UDP programu FN Brno.

Datum	Milník	Financování / rámec
09/2019	Založení výzkumného UDP programu (Pediatrická klinika FN Brno, Biologický ústav LF MU, CEITEC MU)	StartUp grant FN Brno; EK: 31-270420/EK
2019–2023	Pilotní fáze, singleton WES, 58 pacientů	interní grant FN Brno 2019–2022
2022–2024	Navazující projekt (spoluřešitelé K. Slabá, P. Jabandžiev)	EK: 12-071222/EK

09/2023	Otevření Ambulance pro dětské pacienty bez diagnózy (první svého druhu v ČR) + ustanovení Multioborové indikační komise pro dětské pacienty bez diagnózy na Pediatrické klinice FN Brno a LF MU (předseda P. Jabandžiev, místopředsedkyně K. Slabá)	institucionální ukotvení ve FN Brno
01/2024	Zahájení spolupráce s centrem CREATIC (https://creatic.muni.cz) a infrastrukturou CZECRIN a jejím centrem CAATS (https://czecrin.cz/en/caats/#cinnosti_CAATS), expertní podpora terapeutických možností a screening klinických studií	Horizon Europe Teaming for Excellence (CREATIC – Grant agreement number 101059788)
08/2024	Zařazení UDP programu pod Centrum precizní medicíny FN Brno	www.fnbrno.cz/cpm
09/2024	Zahájení multicentrického projektu Baby Fox pro rychlou genomiku u kriticky nemocných dětí a novorozenců	Sponzorováno Illumina Inc. (Baby Fox)
01/2026	Rodiče pacientů UDP programu FN Brno zakládají pacientskou organizaci Malý Odyseus	https://malyodyseus.cz
03/2026	Vláda ČR schvaluje Národní strategii pro vzácná onemocnění 2026–2035, ve které je obsažen i UDP program FN Brno jako silná stránka systému péče o vzácná onemocnění ČR [10]	MZČR
05/2026	Založení výzkumné skupiny Ultra-vzácná onemocnění a pacienti bez diagnózy (vedoucí Kateřina Slabá) v rámci CREATIC LF MU jako integrované výzkumné platformy UDP programu	CREATIC a LF MU

2.2 Diagnostický proces a multioborový přístup

Vlastní klinický proces v rámci **Ambulance pro dětské pacienty bez diagnózy FN Brno** (dále Ambulance) má standardizovanou strukturu: při první návštěvě je provedena komplexní genetická konzultace, klinický popis, odběr biologického materiálu pacienta a v indikovaných případech i obou rodičů (trio přístup) a zahájena fenotypová anotace pomocí HPO (Human Phenotype Ontology) terminologie. Na základě fenotypu a předchozí diagnostické historie je volena vstupní metoda (singleton nebo trio WES, případně WGS) a v případě negativního nálezu jsou k dispozici návazné metody popsané v podkapitole 1.6 (transkriptomika, metylomika, sekvenování s dlouhým čtením, funkční validace). V případě stanovení diagnózy, a když to daná diagnózy umožňuje, jsou pacienti dle dominantního fenotypu referováni do příslušného ERN centra ve FN Brno nebo mimo FN Brno, např. MetabERN a ERN RITA ve VFN Praha nebo ITHACA ve FN Motol a Homolka. Pacienti, kteří přes veškeré úsilí zůstavají bez diagnózy (cca 50–60 %), jsou dále sledováni v rámci Ambulance, která koordinuje jejich péči a mimo jiné zajišťuje periodickou reanalýzu genomických dat případně použití nových technologických postupů a metod. Ambulance poskytuje také konziliární činnost v rámci Dětské nemocnice FN Brno.

Multioborovost procesu je zajištěna složením Multioborového týmu pro dětské pacienty bez diagnózy shrnutým v Tabulce 10: vedle lékařky ambulance a předsedy indikační komise se na hodnocení podílí klinický genetik a molekulární biolog z CEITEC MU/ LF MU, specialisté podle fenotypu pacienta (neurologie, endokrinologie, gastroenterologie aj.) a od roku 2024 také expert centra CREATIC/CZECRIN, který zajišťuje screening klinických studií a možností experimentální léčby nebo lékového repurposingu (kap. 4.5). Tato struktura umožňuje, aby výsledek genomické analýzy byl vždy interpretován v plném klinickém kontextu pacienta a aby diagnostický závěr byl bezprostředně provázán s návrhem dalšího klinického postupu, včetně případného zapojení do specifické léčby nebo klinické studie.

Tabulka 10. Složení multioborového týmu podílejícího se na péči o nediagnostikované pacienty ve FN Brno.

Role	Odbornost	Náplň v procesu
Lékařka Ambulance pro dětské pacienty bez diagnózy FN Brno	Klinická genetika, pediatrie	Klinické hodnocení, indikace vyšetření, sdělování diagnózy, sledování
Předseda indikační komise	Pediatrie	Koordinace komise, klinická korelace nálezů
Klinický genetik	CEITEC MU, LF MU	Zpracování sekvenačních dat, filtrace variant, interpretace nálezů
Molekulární biolog	CEITEC MU, LF MU	Laboratorní zpracování vzorků, NGS, lrWGS, funkční genomika
Specialisté dle fenotypu	Neurologie, endokrinologie, gastroenterologie aj.	Konziliární hodnocení, doplňková vyšetření
Expert CREATIC/CZECRIN	Translační medicína	Screening klinických studií, možností experimentální léčby, lékový repurposing

2.3 Charakteristika a vývoj souboru pacientů

Velikost i výtěžnost kohorty se v čase vyvíjely, jak dokládá Tabulka 11. Pokles výtěžnosti mezi lety 2023–2026 odráží rostoucí komplexitu nově přijímaných pacientů. Z pacientů vyšetřených v ambulanci v letech 2025 a 2026 již 83 % před odesláním podstoupilo genetické vyšetření, přičemž u 60 % z nich bylo provedeno WES s negativním výsledkem.

Kohorta ambulance je vedena odděleně od projektu Baby Fox, popsaného v kapitole 5. Zatímco ambulance je určena převážně pro dosud nediagnostikované pacienty s chronickými obtížemi bez akutní indikace, projekt Baby Fox se zaměřuje na akutně nemocné novorozence a děti hospitalizované na jednotkách intenzivní péče. Výsledky projektu Baby Fox proto nejsou zahrnuty do údajů prezentovaných v této podkapitole.

Ambulance byla formálně zřízena v září 2023, čímž vznikl vyhrazený prostor pro systematické vyšetřování většího počtu pacientů. K srpnu 2026 zahrnovala kohorta ambulance 387 pacientů s celkovou diagnostickou výtěžností 38 %. Tato výtěžnost zůstává relativně stabilní navzdory pokračujícímu nárůstu počtu pacientů, jejich stále rozsáhlejšímu předchozímu diagnostickému vyšetření a rozšiřujícímu se geografickému spádu ambulance.

Tabulka 11. Vývoj kohorty pacientů UDP programu FN Brno a diagnostické výtěžnosti.

Období	N pacientů	Metoda	Dg. výtěžnost	Medián věku	Poznámka
2019–2023	58	WES	43 %	4 roky	pilotní fáze
k 01/2025	268	WES/WGS	40%	5 let	Nárůst počtu případů po institucionalizaci UDP programu FN Brno
k 08/2026	387	WES/WGS/lrWGS/ multiomika/funkční genomika	38 %	5 let	Celkový počest pacientů v UDP programu FN Brno (mimo projekt Baby Fox)

K lednu 2025 zahrnovala kohorta 268 pacientů, z nichž přibližně 70 % bylo mladších 5 let (54 % chlapců, 46 % dívek). Neurologická symptomatologie byla přítomna u 85 % pacientů a zahrnovala zejména vývojové opoždění, epilepsii, poruchy autistického spektra či intelektu a suspektní neuromuskulární onemocnění. Regionálně převažovali pacienti z Moravy; v souboru bylo rovněž 7 pacientů ze Slovenska a postupně narůstal podíl pacientů z Čech (z 8 % v roce 2024 na 14 % v roce 2025).

V aktuální kohortě (N = 387) tvoří přibližně 60 % děti mladší 5 let. Neurologická problematika zůstává v souboru dominantní (53 %). Mezi pacienty s potvrzenou molekulární diagnózou tvoří dědičné poruchy metabolismu (DPM) 15 %. Současně se rozšiřuje geografický spád ambulance, v roce 2026 již pacienti z Čech představují 20 % souboru. Nejčastěji jsou pacienti do ambulance odesíláni odbornými specialisty (50 %), významný je však i podíl pacientů přicházejících z iniciativy rodičů (30 %). Nižší zastoupení pacientů odesílaných praktickými lékaři pro děti a dorost (20 %) poukazuje na význam dalšího zvyšování povědomí o možnostech opakované či rozšířené genetické diagnostiky u dosud neobjasněných případů (Tabulka 12).

Tabulka 12. Referování pacientů do Ambulance pro dětské pacienty bez diagnózy FN Brno.

Zdroj reference	**Podíl**
Specialisté (neurolog, endokrinolog, gastroenterolog aj.)	50 %
Žádost rodičů	30 %
Praktický lékař pro děti a dorost	20 %

2.4 Publikované výsledky a přehled vybraných kazuistik

Hlavním publikačním výstupem pilotní fáze je souhrnná práce popisující diagnostickou výtěžnost a klinickou využitelnost WES u souboru 58 pacientů [29]. Pět kazuistických sdělení dokládá konkrétní diagnostické nálezy identifikované v rámci tohoto souboru, jejichž klíčové parametry shrnuje Tabulka 13.

Tabulka 13. Přehled kazuistických sdělení autorky vzešlých z pilotní kohorty (kap. 2).

Publikace	**Gen / syndrom**	**Typ nálezu**	**Klinický význam**
Slaba K et al., Front Genet 2020 [79] *Příloha 2*	*PMM2* (*PMM2*-CDG)	Nová sestřihová varianta	Neobvyklá manifestace výrazným perikardiálním výpotkem
Slabá K et al., Cesk Slov Neurol N 2021 [80] *Příloha 3*	*PPP2R5D*	Známá patogenní varianta	První popsaný český případ
Slaba K et al., Mol Genet Genomic Med 2023 [81] *Příloha 4*	*MYRF*	Patogenní sestřihová varianta	Podezření na gonadální mozaicismus u dvou sester
Slabá K et al., Ces-slov Pediat 2022 [82] *Příloha 5*	*DYRK1A*	Známá patogenní varianta	Rozšíření klinického spektra syndromu
Slabá K et al., Cesko-slov Pediatrie 2025 [83] *Příloha 6*	*RNU4-2* (ReNU syndrom)	Intronová varianta	První popsaný český případ ReNU syndromu

Ilustrativní kazuistiky

Kazuistika 1. Matěj – 13letá diagnostická odysea s neprospíváním

Chlapec s neprospíváním a hypotonickým syndromem přítomným od kojeneckého věku, s normálním psychomotorickým vývojem. Od 8 let byl opakovaně vyšetřován pro těžkou malnutrici až kachexii a rychlou unavitelnost, postupně se přidala hypernazální řeč, svalová hypotrofie a progredující kyfoskolióza. Rozsáhlá gastroenterologická, endokrinologická, metabolická i základní genetická vyšetření příčinu obtíží neobjasnila. Ve 14 letech byl vyšetřen v Ambulanci pro dětské pacienty bez diagnózy. WES, původně hodnocené se zaměřením na lipodystrofie, bylo negativní. Následně se rozvinula závažná respirační insuficience v důsledku závažné atelektázy. Neurologické vyšetření provedené za hospitalizace odhalilo areflexii v kvadridistribuci a EMG myopatický vzorec. Doplnění neuromuskulárního fenotypu vedlo k bioinformatické reanalýze WES dat, která odhalila homozygotní variantu nejasného významu c.1562G>C, p.(Arg521Pro) v genu *MEGF10*; oba rodiče byli heterozygotními přenašeči. Následně provedená svalová biopsie potvrdila myopatické změny charakteru kongenitální myofibrilární „desmin storage“ myopatie. Korelace klinického, molekulárního a histopatologického nálezu vedla ke stanovení diagnózy EMARDD (early-onset myopathy, areflexia, respiratory distress and dysphagia). Stanovení diagnózy mělo bezprostřední dopad na další léčbu, neboť umožnilo indikovat operační korekci těžké skoliózy; bez potvrzení myopatie pacient v daném čase nesplňoval indikační kritéria a skolióza by byla nadále řešena konzervativně. Současně byla na základě dostupných poznatků o možném příznivém ovlivnění myopatického profilu u *MEGF10*-asociované myopatie zahájena off-label terapie SSRI v rámci lékového repurposingu. Volba SSRI byla výhodná i s ohledem na výraznou úzkostnost pacienta související s dlouhodobým onemocněním. Po zavedení PEG, operační korekci skoliózy a komplexní terapii došlo k významnému zlepšení nutričního i celkového stavu.



Obrazová dokumentace ke kazuistice 1. Fotografie zveřejněna se souhlasem rodičů.

Kazuistika 2. Matyáš – multisystémová porucha s progeroidním vzhledem

Chlapec narozený ve 36+1. týdnu pro těžkou fetální růstovou restrikci (porodní hmotnost 1610 g) měl od novorozeneckého období výrazné neprospívání, centrální hypotonii a prakticky chybějící podkožní tukovou tkáň s charakteristickým progeroidním vzhledem. V prvním týdnu života se rozvinula závažná hyponatrémie, hypochlorémie a hyperkalémie. Kongenitální adrenální hyperplazie nebyla potvrzena. Pro známky přetrvávající primární adrenální insuficience s mineralokortikoidní nedostatečností však byla zahájena substituce hydrokortizonem a fludrokortizonem, pro subklinickou hypotyreózu také levothyroxinem. Navzdory adekvátní substituci a dostatečnému energetickému příjmu přetrvávalo výrazné neprospívání. Dále byla diagnostikována převodní nedoslýchavost při oboustranné stenóze zevních zvukovodů a bilaterální kryptorchismus. Psychomotorický vývoj byl pouze mírně opožděn. Rozsáhlá genetická diagnostika včetně karyotypu, array CGH a singleton WES příčinu obtíží neobjasnila. Ve dvou letech byl proto chlapec odeslán do Ambulance pro dětské pacienty bez diagnózy, kde pro přetrvávající syndromový fenotyp bylo indikováno trio WGS. Vyšetření odhalilo dvě varianty v genu *MCM7 in trans* konfiguraci: maternálně zděděnou c.776G>C, p.(Gly259Ala), klasifikovanou jako pravděpodobně patogenní, a dosud nepopsanou paternálně zděděnou c.401+2dup, původně klasifikovanou jako VUS. Cílená RNA analýza následně prokázala poruchu sestřihu a umožnila reklasifikaci druhé varianty na pravděpodobně patogenní (Obr. B). Korelace klinického fenotypu, genomického nálezu a funkční analýzy vedla k potvrzení diagnózy *MCM7*-asociovaného Meierova–Gorlinova syndromu s progeroidním fenotypem, generalizovanou lipodystrofií a primární adrenální insuficiencí. Jedná se o druhého dosud popsaného pacienta s tímto specifickým fenotypem asociovaným s bialelickými variantami v genu *MCM7*. Na základě molekulární diagnózy bylo cíleně doplněno ortopedické vyšetření, které prokázalo další charakteristický znak onemocnění, oboustrannou aplazii patel. Cílené CT vyšetření hrudníku dále prokázalo plicní emfyzém, rovněž popisovaný v souvislosti s tímto onemocněním. Aktuálně ve věku tří let psychomotorický i řečový vývoj odpovídá věku.

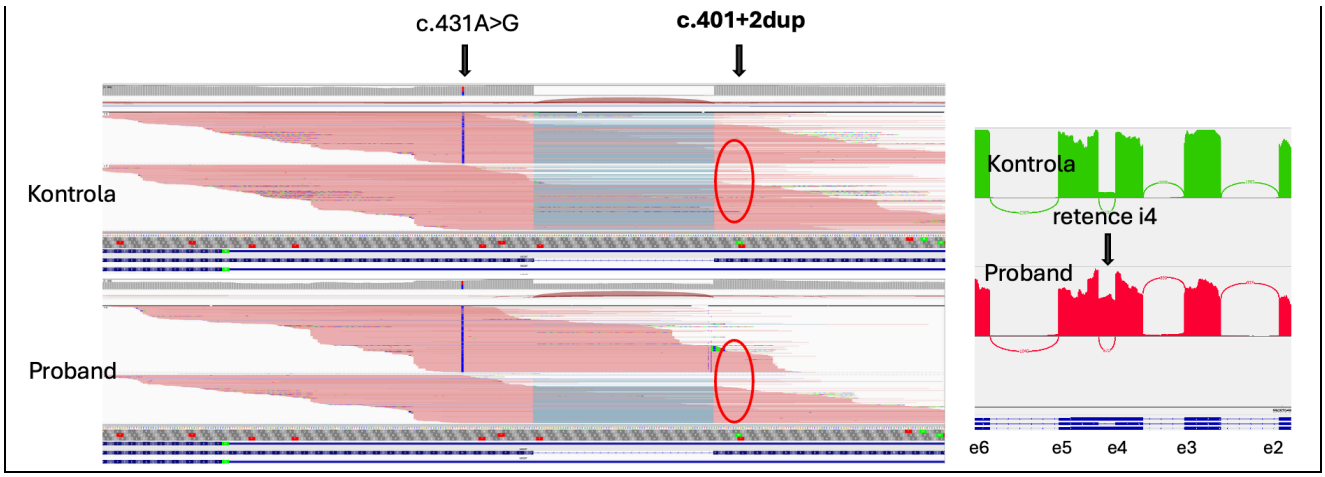
Obrazová dokumentace ke kazuistice 2. Fotografie zveřejněny se souhlasem rodičů.

A)





B)



VLASTNÍ PŘÍNOS A KOMENTÁŘ K RELEVANTNÍM PUBLIKACÍM, kapitola 2

Vlastní publikační výstup [29] shrnuje výsledky pilotní kohorty 58 pacientů. U 25 z nich (43 %) bylo identifikováno celkem 28 variant, z toho 11 patogenních, 13 pravděpodobně patogenních a 4 varianty nejasného významu (VUS); 11 variant dosud nebylo popsáno. Klinická využitelnost nálezu, zahrnující změnu dalšího sledování, odeslání pacienta ke specialistovi, úpravu medikace nebo indikaci či kontraindikaci diagnostického nebo léčebného výkonu, dosáhla 76 %. U diagnostikovaných pacientů byly zaznamenány v průměru dva konkrétní dopady na klinickou péči. Publikace tak dokládá naplnění všech tří dílčích cílů pilotního projektu: ověření proveditelnosti programu v podmínkách českého zdravotnictví, porovnání jeho diagnostické výtěžnosti s mezinárodními výsledky a institucionalizaci péče prostřednictvím multidisciplinární indikační komise a specializované ambulance.

Tuto zkušenost dále prohlubuje pět navazujících kazuistických sdělení autorky ze souboru uvedeného v Tabulce 13, která dokumentují význam genomické diagnostiky na úrovni jednotlivých pacientů. Publikace věnovaná *PMM2*-CDG [79] popisuje novou sestřihovou variantu genu *PMM2* a neobvyklou manifestaci onemocnění v podobě výrazného perikardiálního výpotku. Práce o genu *MYRF* [81] poukazuje na pravděpodobný gonadální mozaicismus u zdravého rodiče v rodině se dvěma postiženými sestrami se stejným autozomálně dominantním onemocněním, přestože varianta nebyla v běžně vyšetřovaném materiálu rodičů prokázána. Kazuistika syndromu asociovaného s genem *DYRK1A* [82] přispívá k rozšíření jeho známého fenotypového spektra.

Publikace týkající se genu *PPP2R5D* [80] a navazující kazuistika ReNU syndromu způsobeného variantou v genu *RNU4-2*, který kóduje malou jadernou nekódující RNA tvořící součást spliceozomu [83], představují první popsané české případy těchto jednotek. Zatímco *PPP2R5D* byl v době publikace již etablován jako kauzální gen neurovývojového onemocnění, ReNU syndrom byl popsán teprve v květnu 2024 na základě dvou rozsáhlých studií z Velké Británie a USA. Jeho odhadované zastoupení mezi pacienty s neurovývojovými poruchami dosahuje přibližně 0,4 %. Identifikace prvního českého případu v horizontu necelého roku od původního popisu proto dokládá schopnost našeho pracoviště rychle reagovat na vývoj poznání, průběžně reanalyzovat genomická data a přenášet nově publikované poznatky do klinické diagnostiky.

3. Systémový a národní dopad

Národní strategie pro vzácná onemocnění 2026–2035

Národní strategie pro vzácná onemocnění 2026–2035, schválená vládou ČR dne 30. 3. 2026, navazuje na předchozí strategický dokument pro období 2010–2020 a reaguje na doporučení Rady EU (2009/C 151/02) o opatřeních v oblasti vzácných onemocnění. Dokument byl připravován od roku 2024 expertní pracovní skupinou při Ministerstvu zdravotnictví ČR za účasti zástupců odborných společností, pacientských organizací (včetně ČAVO), akademických pracovišť a center vysoce specializované péče a definuje strategické cíle v oblastech časné diagnostiky, koordinace péče, dostupnosti léčby, výzkumu a mezinárodní spolupráce.

V samotném strategickém dokumentu je doloženo přímé uznání UDP programu FN Brno: v rámci SWOT analýzy (Národní strategie pro vzácná onemocnění 2026–2035, str. 42, **oddíl Silné stránky → Oblast zdravotní péče)** je uvedeno: **„Existence ambulance pro nediagnostikované pacienty (v Brně) – Speciální pracoviště pro pacienty bez diagnózy.“** Analytická část strategie (Příloha 1, str. 59–60) [10] dále obsahuje samostatný narativní popis ambulance i projektu Baby Fox jako příkladu dobré praxe včetně dobových souhrnů klinických dat.

Mezi konkrétní opatření strategie patří příprava Národního registru pro vzácná onemocnění (NRVO), rozšíření sítě center vysoce specializované péče, systematizace koordinace mezi jednotlivými úrovněmi péče (praktický lékař, specializovaná centra, ERN) a podpora zavádění pokročilých diagnostických metod, včetně rychlé genomiky, do standardní klinické praxe. Zkušenosti z pilotního UDP programu FN Brno a projektu Baby Fox byly součástí analytických materiálů pro formulaci těchto doporučení.

Zařazení UDP programu FN Brno do strategického dokumentu na národní úrovni potvrzuje, že model kombinující specializovanou ambulanci, multioborovou indikační komisi a přímou návaznost na translační výzkum v rámci spolupráce se špičkovými akademickými centry (kap. 4) představuje jeden z ověřených přístupů, na jejichž základě lze budovat systém péče o pacienty s ultra-vzácným onemocněním a pacienty bez diagnózy.

Evropské iniciativy JARDIN a ERDERA

Projekt JARDIN (Joint Action on integration of ERN into national health systems) je společnou akcí (Joint Action) financovanou z programu EU4Health, sdružující přes 25 členských a přidružených států EU s cílem systematicky zakotvit fungování Evropských referenčních sítí (ERN, kap. 1.5) do struktur národních zdravotních systémů. Pracovní balíček 7 je zaměřen na problematiku pacientů bez diagnózy a formuluje konsensuální doporučení pro identifikaci, diagnostiku a koordinaci péče o nediagnostikované pacienty napříč zapojenými zeměmi, včetně jednotné terminologie a minimálních standardů péče, které mají sloužit jako podklad pro navazující národní politiky obdobné Národní strategii pro vzácná onemocnění popsané v kap. 3. Díky zkušenostem s UDP programem FN Brno se za ČR podílíme na plnění cílů tohoto pracovního balíčku (https://jardin-ern.eu/work-package/national-reference-networks-nrn-and-undiagnosed-disease-programmes-or-equivalent-strategies-interlinked-with-ern/).

Ve výzkumné oblasti jsme zapojeni prostřednictvím Agentury pro zdravotnický výzkum ČR jako stálý zástupce národního delegáta také do evropského partnerství European Rare Diseases Research Alliance (ERDERA). ERDERA byla spuštěna v roce 2024 v rámci programu Horizon Europe a je největší evropskou výzkumnou iniciativou v oblasti vzácných onemocnění, která sdružuje přes 180 institucí z více než 30 zemí. Zaměřuje se na budování sdílené výzkumné infrastruktury (biobanky, registry, standardizace multi-omických dat), podporu časných fází klinických studií a urychlení translace základního výzkumu do klinické praxe. Zapojení do tohoto partnerství doplňuje klinicky a organizačně orientovanou agendu JARDIN o výzkumný rozměr a vytváří přímou vazbu mezi evropskou výzkumnou infrastrukturou a translačním výzkumem.

VLASTNÍ PŘÍNOS A KOMENTÁŘ K RELEVANTNÍM PUBLIKACÍM, kapitola 3

Vlastní přínos na systémové úrovni spočívá v přenosu praktických klinických a organizačních zkušeností z vlastního pracoviště a z budování programu pro nediagnostikované pacienty ve FN Brno do formulace národní politiky v oblasti vzácných onemocnění. Zkušenosti získané při vytváření specializované péče o děti bez stanovené diagnózy, při zavádění moderních genomických metod a při koordinaci mezioborové spolupráce poskytly konkrétní podklady pro identifikaci systémových potřeb této skupiny pacientů. Patří mezi ně zejména zajištění včasného přístupu ke komplexní diagnostice, návaznost klinické péče na výzkumné a funkční metody, dlouhodobá reanalýza negativních genomických nálezů, mezinárodní sdílení dat a vytvoření udržitelného organizačního rámce pro pacienty, u nichž dosavadní standardní diagnostické postupy nevedly k jednoznačnému diagnostickému závěru.

Explicitní uvedení Ambulance pro dětské pacienty bez diagnózy FN Brno mezi silnými stránkami českého zdravotního systému ve SWOT analýze Národní strategie pro vzácná onemocnění 2026–2035, schválené vládou ČR dne 30. 3. 2026, představuje přímý doklad tohoto systémového dopadu. Samostatný narativní popis programu v analytické části strategie [10] navíc potvrzuje, že zkušenosti z lokálního pracoviště byly při přípravě strategického dokumentu využity nad rámec jednotlivé citace. Program FN Brno zde slouží jako příklad prakticky realizovaného modelu péče, na jehož základě lze formulovat opatření směřující k lepší organizaci diagnostiky nediagnostikovaných pacientů, efektivnějšímu propojování specializovaných center a dostupnosti inovativních diagnostických a translačních postupů. Vlastní přínos tak nespočívá pouze v rozvoji jednoho klinického programu, ale také v převodu zkušeností z každodenní péče o konkrétní pacienty do strategické koncepce s potenciálem ovlivnit organizaci péče o vzácná onemocnění na celostátní úrovni.

4. Funkční genomika a translace směrem k terapii

4.1 Tři základní oblasti translační precizní medicíny u vzácných onemocnění

V rámci výzkumné skupiny Ultra-vzácná onemocnění a nediagnostikovaní dětští pacienti v centru excelence CREATIC (jedná se o sdílenou výzkumnou skupinu s Pediatrickou klinikou FN Brno a LF MU) je prováděn integrovaný translační výzkum, který navazuje na klinický program popsaný v kapitole 2. Cílem skupiny je systematicky převádět genomické nálezy u nediagnostikovaných dětských pacientů a pacientů s ultra-vzácným onemocněním do konkrétních diagnostických závěrů a v indikovaných případech i do experimentální nebo klinicky dostupné léčby. Činnost skupiny se opírá o tři vzájemně provázané oblasti translační precizní medicíny.

Jednak o **komplexní genomickou analýzu**, která významně přesahuje standardní možnosti testování v rámci systému péče v ČR, a zahrnuje nejen standardní diagnostická pipeline (WES, WGS a rychlou genomiku popsané v podkapitole 1.6 a v kapitole 5) ale i návazné metody pro exom-negativní pacienty, transkriptomiku, metylomiku a sekvenování s dlouhým čtením (podkapitola 1.6.3). Skupina zde úzce spolupracuje s výzkumným týmem Ondřeje Slabého v CEITEC MU a na Biologickém ústavu LF MU.

V případě identifikace klinicky relevantních kandidátních VUS je v rámci této spolupráce prováděna **funkční validace kandidátních variant** v *ex vivo* a buněčných modelech, od enzymatických esejí přes expresi v heterologních systémech (např. HEK293T) až po *in silico* pokročilé strukturní modelování (AlphaFold). Reprezentativním příkladem je reklasifikace varianty *CYP2U1* popsaná v podkapitole 4.2.

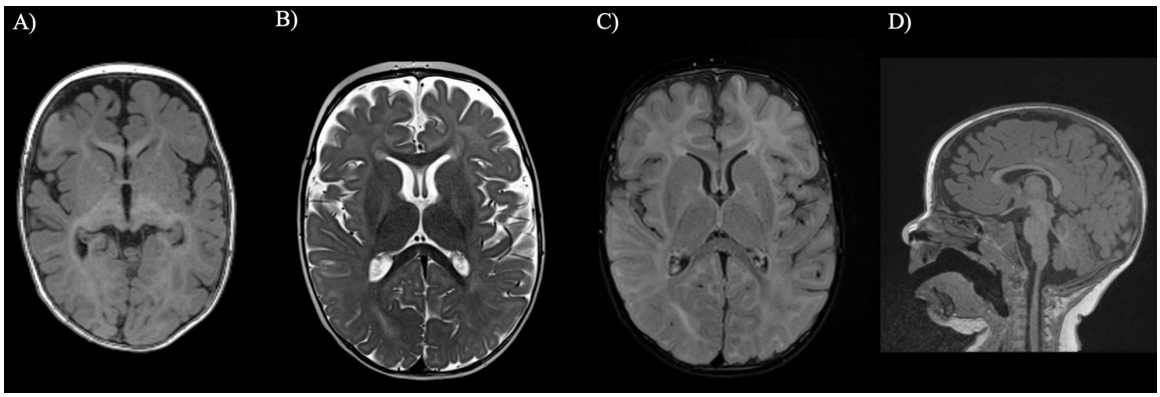
AI-driven platforma pro lékový repurposing (podkapitola 4.5) systematicky prohledává dostupné farmakologické a literární databáze s cílem identifikovat léčiva již registrovaná pro jiné indikace, která by mohla být využita pro konkrétní molekulární diagnózu, tj. konkrétní kauzální gen s konkrétní mutací. Veškeré molekulární modelování a AI-driven platforma jsou realizovány ve spolupráci s týmy prof. Jiřího Damborského a doc. Davida Bednáře z Loschmidtovy laboratoře proteinového inženýrství na Přírodovědecké fakultě MU.

4.2 Příklad funkční genomiky, ověření varianty nejasného významu *CYP2U1*

Kazuistika 3. Vilík s variantou nejasného významu v genu *CYP2U1*

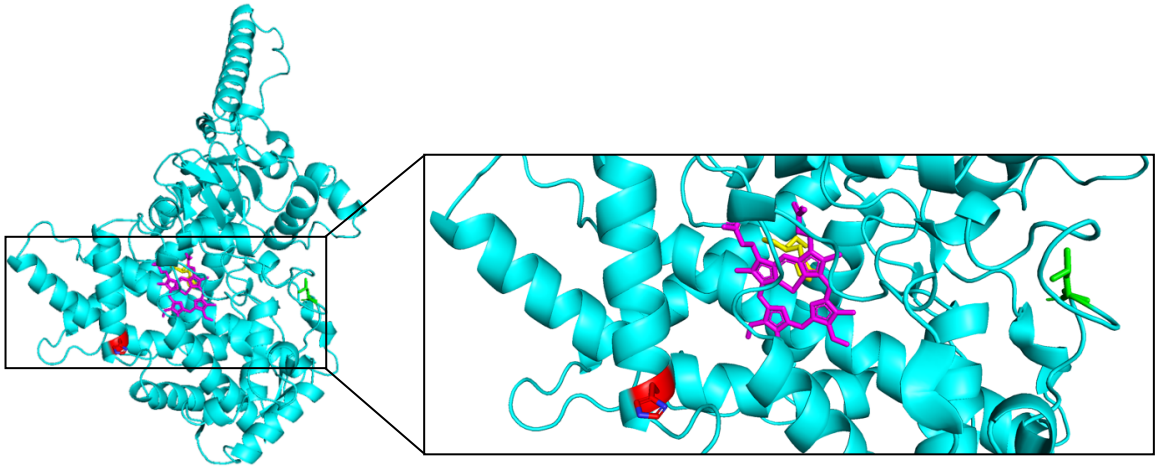
U chlapce bez perinatálních rizik a negativní rodinné anamnézy se mezi 3.–4. měsícem věku objevily občasné stavy stáčení do opistotonu, od 6. měsíce následované progresivní spasticitou dolních končetin. V 8. měsíci věku bylo provedeno první neurologické vyšetření se závěrem regrese psychomotorického vývoje na úroveň patologického novorozence, centrální hypotonie, končetinové spasticity a dystonických postur. MRI mozku prokázalo opožděnou myelinizaci, EMG demyelinizační změny. WES identifikovalo dvě varianty v genu *CYP2U1* v konfiguraci *in trans*, paternálně zděděnou pravděpodobně patogenní variantu c.1376C>T, p.(Pro459Leu) a maternálně zděděnou variantu nejasného významu (VUS) c.557G>A, p.(Arg186His). Diagnóza autozomálně recesivní hereditární spastické paraplegie typu 56 (SPG56) byla pomocí WES stanovena během 8 dnů od odběru krve. Vzhledem k velmi časnému a závažnému fenotypu a přítomnosti VUS byla následně provedena funkční validace a *in silico* strukturní modelování variant *CYP2U1*, jejichž výsledky jsou popsány dále. Po stanovení diagnózy byla zahájena symptomatická léčba spasticity a empirická substituce kyselinou folinovou na základě dříve publikovaného případu cerebrálního deficitu folátu u SPG56. Včasné stanovení molekulární diagnózy navíc pacientovi otevřelo možnost budoucí léčby genovou terapií vyvíjenou pro SPG56.

Obrazová dokumentace ke kazuistice 3



MRI mozku pacienta ve věku 9 měsíců. (A) T1 vážený obraz, transverzálně: oboustranně symetrické oblasti snížené signálové intenzity v periventrikulární bílé hmotě frontálních laloků (odpovídající věkově podmíněnému stupni myelinizace); (B, C) T2+FLAIR, transverzálně: pruhovité hyperintenzity bílé hmoty v obou sekvencích (převážně vlevo frontálně a vpravo okcipitálně), odpovídající opožděné myelinizaci; (D) T1 vážený obraz, sagitální rovina. Převzato z [84], Příloha 8.

Funkční validace obou identifikovaných variant popsaných v Kazuistice 3 probíhala v několika navazujících krocích. Nejprve byla provedena *in silico* strukturní analýza ve spolupráci s prof. J. Damborským. Modelování (AlphaFold DB, doplnění hemu metodou AlphaFill, srovnání s AlphaFold3, mutace vnesené v PyMOL) potvrdilo, že mutace p.Arg186His je lokalizována na šroubovici v přímém kontaktu s hemem, i mírná distorze proto může narušit vazbu hemu a vést k poškození katalytické funkce; mutace p.Pro459Leu na smyčce je predikována jako strukturně destabilizující (sterický střet postranního řetězce leucinu s okolními rezidui) (viz Obr. 6).



Obrázek 6. Strukturní model proteinu CYP2U1 (AlphaFold DB, doplněný o hem metodou AlphaFill) s vyznačením lokalizace mutací Arg186His (červená) a Pro459Leu (zelená). Mutace Arg186His leží na špici šroubovice v přímém kontaktu s hemem ve vzdálenosti 12 Å; mutace Pro459Leu leží na smyčce cca 18 Å od hemu. Zdro [84], Příloha 8.

Následně byl protein *CYP2U1* exprimován v buněčném modelu HEK293T a jeho přítomnost a stabilita byla ověřena Western blotem: u varianty p.Arg186His byl protein detekovatelný stejně jako u wild-typu, zatímco u varianty p.Pro459Leu byl konzistentně nedetekovatelný, což svědčí o nestabilitě proteinu způsobené touto variantou. Jedná se o známou variantu klasifikovanou jako pravděpodobně patogenní. Ve třetím kroku byla stanovena enzymatická aktivita, kdy inkubace lyzátů s kyselinou arachidonovou a následná detekce vznikajících metabolitů 19-HETE a 20-HETE ukázala, že zatímco nemutovaný enzym oba metabolity tvořil, obě studované varianty vedly ke kompletní ztrátě enzymatické aktivity. Na základě těchto zjištění byla varianta p.Arg186His podle kritérií ACMG (PS3, PM2, PM3, PP2, PP3) reklasifikována z varianty nejasného významu na patogenní (dle nejnovějších pravidel ClinGen SVI by byla hodnocena spíše jako pravděpodobně patogenní), čímž

byla potvrzena diagnóza, a nová klasifikace byla zapsána do mezinárodní databáze ClinVar (accession SCV006311003, SCV006586705) [84].

Kombinovaná genomická, buněčná a *in silico* analýza tak potvrdila u varianty p.Arg186His ztrátu enzymatické aktivity při zachované expresi proteinu, zatímco u varianty p.Pro459Leu byla prokázána nestabilita proteinu vedoucí k jeho nedetekovatelnosti, jde tedy o dva odlišné molekulární mechanismy patogenity v témže genu.

Reklasifikace VUS na patogenní umožnila rodině pacienta se prostřednictvím mezinárodní sítě rodin pacientů s SPG56 zapojit do přípravy akademické klinické studie genové terapie (AAV9 nesoucí terapeutický gen *CYP2U1*), plánované v Austrálii s předpokládaným zahájením v roce 2026.

4.3 Příklad molekulárního modelování, dominantně negativní efekt varianty *ADAR*

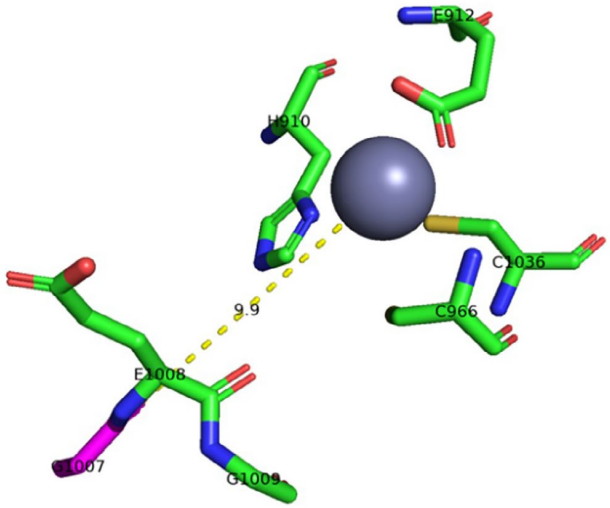
Kazuistika 4. Honzík s jednou chybějící variantou v genu *ADAR*

U chlapce se kolem 6. měsíce věku objevila výrazná dráždivost, progresivní spasticita a regrese motorického i kognitivního vývoje. Ve 13 měsících již dominovala kvadruspasticita s regresí vývoje na úroveň patologického novorozence. Somaticky byla přítomna mikrocefalie, celková hypotrofie, kryptorchismus a mikropenis, současně se rozvíjely významné obtíže s příjmem pevné stravy. MRI mozku prokázalo dysgenezi corpus callosum, dilataci komorového systému a mírnou kortikální atrofii, současně byla patrná hypoplastická adenohypofýza se ztenčeným infundibulem. Nález koreloval s laboratorně potvrzeným deficitem gonadotropinů a růstového hormonu. Pro rychle progredující neurologický fenotyp byl pacient zařazen do programu Baby Fox. Trio rWGS během 5 dnů od odběru krve identifikovalo heterozygotní *de novo* patogenní variantu c.3019G>A, p.(Gly1007Arg) v genu *ADAR*. V kontextu klinického fenotypu a současných poznatků o dominantně negativním efektu některých *de novo* variant genu *ADAR* byla stanovena diagnóza Aicardi-Goutièresova syndromu typu 6 (AGS6).

AGS6 je klasicky popisován jako autozomálně recesivní onemocnění, avšak narůstající počet publikovaných pozorování heterozygotních *de novo* variant *ADAR* s fenotypem připomínajícím hereditární spastickou paraparézu či dětskou mozkovou obrnu podporuje u vybraných variant dominantní mechanismus dědičnosti. V literatuře byly do doby publikace popsány pouze tři případy se shodnou variantou c.3019G>A a dominantně negativní mechanismus byl u ní dosud pouze hypoteticky navržen, nikoli experimentálně potvrzen ani podpořen molekulárním modelováním.

Molekulární modelování a mechanismus dominantně negativního efektu

Reziduum Gly1007Arg je součástí vysoce konzervovaného motivu GEG (G1007-E1008-G1009) v tzv. base-flipping smyčce katalytické deaminázové domény ADAR1, která umožňuje vysunutí cílového adenosinu z RNA helixu do aktivního místa, kde probíhá deaminace. Obě glyciny lemující katalytický glutamát Glu1008 poskytují díky malé velikosti a konformační flexibilitě prostor pro interkalaci postranního řetězce Glu1008 do malého žlábku dsRNA substrátu, což je nezbytným krokem pro vyklopení cílové báze. Substituce glycinu za objemný, kladně nabitý arginin v pozici Arg1007 pravděpodobně narušuje tento mechanismus jak stericky, kdy postranní řetězec argininu koliduje s konformací smyčky a její schopností zasunout se do malého žlábku, tak elektrostaticky, neboť v závislosti na rotameru může nově vzniklý kladný náboj Arg1007 vytvořit solný můstek se záporně nabitým sousedním reziduem Glu1008, což by aktivitu enzymu dále poškodilo.



Obrázek 7. Poloha varianty Gly1007Arg vůči katalytickému centru ADAR1. Klíčová rezidua aktivního místa jsou zobrazena jako „stick" struktury, koordinovaný katalytický zinečnatý iont jako koule. Mutované reziduum Gly1007 (purpurově) leží v bezprostřední blízkosti Arg1009 ve smyčce GRG kritické pro vazbu RNA a katalýzu, ve vzdálenosti 9,9 Å od Zn2+ (koordinovaného rezidui His910, Glu912, Cys966 a Cys1036); zavedení kladného náboje varianty Gly1007Arg by mohlo zvýšit afinitu mutovaného proteinu k záporně nabité fosfátové kostře dsRNA. Struktura byla připravena pomocí AlphaFold3 (DeepMind/Google), poloha zinečnatého iontu byla převzata ze struktury PDB ID 9D5K. Převzato [85], Příloha 7.

Hypotetický dominantně negativní efekt varianty Gly1007Arg lze vysvětlit dvěma mechanismy: (a) kompetitivní inhibicí, kdy mutovaný protein vykazuje potenciálně zvýšenou afinitu k vazbě RNA a tím blokuje wild-type enzym, a (b) tvorbou nefunkčních heterodimerů mutovaného a wild-type proteinu, čímž se snižuje množství funkčních komplexů ADAR1. Dostupná experimentální data v současnosti neumožňují mezi oběma mechanismy rozlišit a je třeba je považovat za hypotetické; interpretaci dále limituje neúplnost strukturních informací ve veřejných databázích a vysoká nejistota v predikci vzájemného uspořádání jednotlivých domén enzymu. Vyřešení struktury ternárního komplexu s navázanou RNA včetně oblasti varianty by vyžadovalo rozsáhlejší strukturní analýzy. I přes tato omezení však provedený strukturní model dominantně negativní efekt varianty G1007R podporuje, neboť lokalizuje mutaci do bezprostřední blízkosti katalytického centra s předpokládaným dopadem na vazbu RNA i deaminázovou aktivitu enzymu.

4.4 Matchmaking a mezinárodní sdílení dat

Propojování dosud diagnosticky neuzavřených pacientů s podobným genotypem nebo fenotypem probíhá prostřednictvím federované mezinárodní sítě Matchmaker Exchange a jejích zapojených služeb, mezi něž patří například GeneMatcher, MyGene2 a PhenomeCentral. Tyto nástroje umožňují bezpečné sdílení údajů mezi klinickými a výzkumnými pracovišti a vyhledávání případů s variantami ve stejném kandidátním genu nebo s podobnými klinickými projevy. Porovnávání fenotypů je podporováno jejich standardizovaným popisem pomocí termínů Human Phenotype Ontology (HPO), což usnadňuje systematické hodnocení podobnosti pacientů napříč jednotlivými centry a zeměmi.

Nalezení více nepříbuzných pacientů se srovnatelným fenotypem a variantami ve stejném genu může významně podpořit objasnění příčiny dosud nevysvětleného onemocnění a přispět k identifikaci nového vztahu mezi genem a onemocněním. Zjednodušeným příkladem může být několik nepříbuzných pacientů se shodnou nebo funkčně obdobnou variantou vzniklou *de novo* a s překrývajícími se klinickými projevy. Takové pozorování může vést k definici nového syndromu, obvykle však musí být doplněno dalšími genetickými, funkčními a klinickými důkazy.

Významnou součástí tohoto procesu je spolupráce klinických genetiků, laboratorních diagnostiků, bioinformatiků a výzkumných pracovníků, kteří společně posuzují genotypová a fenotypová data a plánují případné funkční ověření nalezených variant. Sdílení údajů současně vyžaduje důslednou ochranu soukromí pacientů, omezení rozsahu předávaných identifikujících informací, kontrolovaný

přístup k datům a odpovídající informovaný souhlas. Mezinárodní propojování případů tak představuje důležitý nástroj nejen pro diagnostiku vzácných onemocnění, ale také pro objevování nových genů a přesnější vymezení klinického spektra již známých genetických jednotek.

Kazuistika 5. Nela s variantami v genu s dosud nejasným klinickým významem

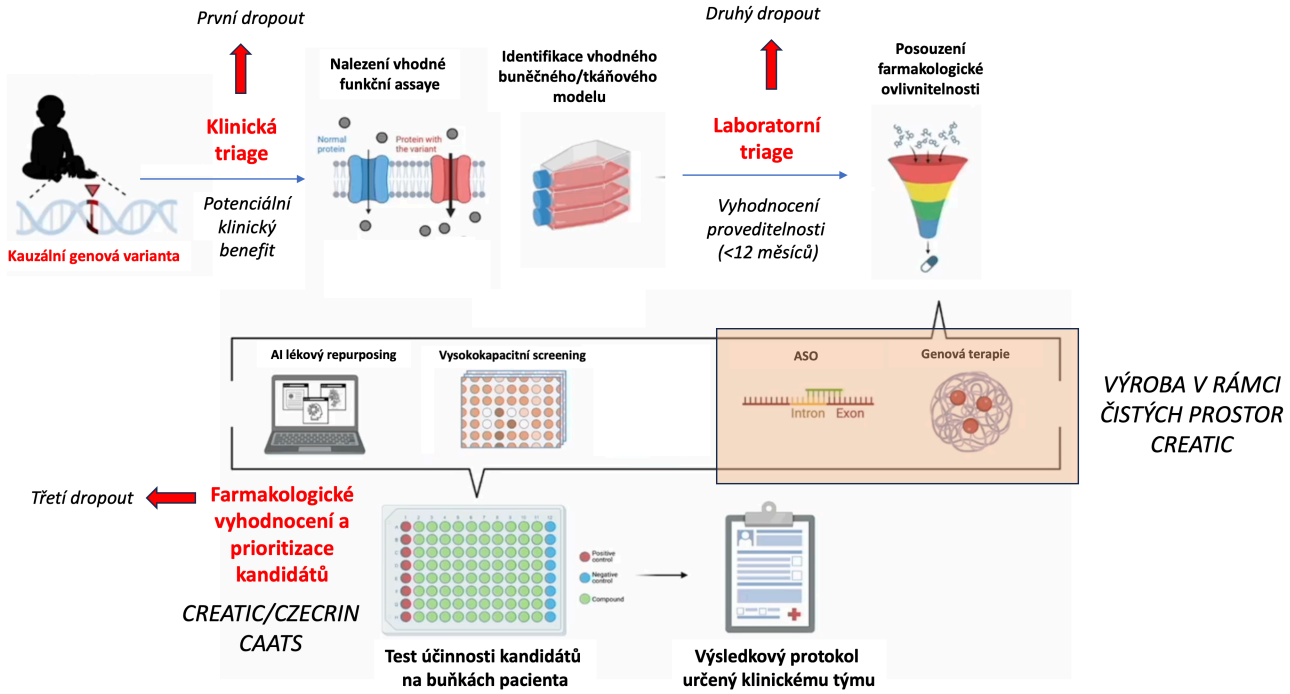
Dívka zdravých nepříbuzných rodičů se narodila v termínu po nekomplikované graviditě. Již časně po narození byla neurologicky vyšetřena pro hyperexcitabilitu, poruchu příjmu potravy s periorální cyanózou a desaturacemi a výrazné kolísání svalového tonu od těžké hypotonie po hypertonii. Od 3. dne života se objevily motoricko-tonické epileptické paroxysmy s korelátem v EEG. Neurologický nález dále prokázal areflexii a výraznou axiální hypotonii, somaticky byla patrná kraniofaciální dysmorfie s mikrognacií a širším kořenem nosu. EEG a aEEG vykazovaly těžce patologický obraz *burst suppression*, MRI mozku prokázala dysgenezi corpus callosum. Rozsáhlé laboratorní a metabolické vyšetření příčinu obtíží neobjasnilo, terapeutický test pyridoxinem nebyl účinný. Onemocnění mělo závažný progresivní průběh a dívka zemřela ve věku 6 měsíců.
V rámci projektu Baby Fox bylo provedeno trio rWGS bez nálezu jasně korelujícího s fenotypem. Bylo doplněno standardní vyšetření akreditovanou laboratoří: karyotyp, array CGH a WES, vše bez nálezu. Jediným nálezem WGS byly dvě missense varianty v pozici *trans* v genu *ADGRB1*: c.1451C>T, p.Ser484Phe (maternální) a c.1851G>C, p.Glu617Asp (paternální). Gen *ADGRB1*, kódující adhezní receptor spřažený s G proteinem (BAI1), nebyl v době nálezu asociován s žádným monogenně dědičným onemocněním u člověka ani uveden v databázi OMIM, jednalo se o tzv. **GUS (gene of unknown significance)**, obě varianty byly klasifikovány jako VUS. Studie na zvířecích modelech naznačovaly roli genu ve vývoji nervového systému a mozkové excitabilitě, klinická relevance u člověka však nebyla prokázána.
Vzhledem k tomu, že gen *ADGRB1* dosud nebyl asociován s žádným popsaným lidským onemocněním, byl kandidátní gen se stručným shrnutím fenotypu vložen do mezinárodní databáze **GeneMatcher** s cílem najít další pracoviště zabývající se stejným genem. Prostřednictvím GeneMatcheru byl následně navázán kontakt s prof. Andrewem Escaygem, Ph.D. (Department of Human Genetics, Emory University, USA), jehož laboratoř dlouhodobě studuje funkci genu *ADGRB1* na myším modelu. Prof. Escayg byl přes GeneMatcher již dříve osloven i dalšími pracovišti a eviduje nyní několik rodin s variantami v *ADGRB1* a podobným fenotypem, jejichž klinický význam bude jeho tým funkčně ověřovat. Do spolupráce se zapojil i Dr. Randy Hall, odborník na GPCR receptory, jehož laboratoř zahájila testování funkčního dopadu variant *ADGRB1* naší pacientky *in vitro*.
Rodiče souhlasili se sdílením sekvenačních dat v mezinárodní databázi **PhenomeCentral** s cílem umožnit párování genotypu a fenotypu s dalšími pacienty. Poslední reanalýza WGS proběhla v květnu 2026, zatím bez nové informace. I přes aktuální klasifikaci variant jako VUS bylo rodičům v případě další gravidity doporučeno zvážit asistovanou reprodukci s preimplantačním genetickým testováním monogenních onemocnění (PGT-M). Toto doporučení vycházelo z odborné diskuse v rámci tzv. DYSMO klubu, celorepublikového setkání klinických a lékařských genetiků zaměřeného na diagnosticky nejasné a závažné případy. Případ ilustruje typickou situaci v diagnostice neobjasněných onemocnění, kdy je k potvrzení kauzality kandidátního genu nezbytná nezávislá evidence v podobě dalšího pacienta se shodnou variantou a fenotypem nebo data z funkčních experimentů. GeneMatcher v tomto případě umožnil navázání mezinárodní spolupráce vedoucí k funkčnímu ověření patogenity nalezených variant a ve svém důsledku možná v budoucnu k definici nového syndromu.

4.5 Platforma pro repurposing léčiv

Repurposing léčiv představuje hledání nového terapeutického využití již schválených nebo klinicky prověřených léčiv mimo jejich původní indikaci. U vzácných genetických onemocnění je tento

přístup významný zejména proto, že vývoj zcela nového léčiva bývá vzhledem k malému počtu pacientů časově, finančně i organizačně obtížný, zatímco u známých léčiv jsou již dostupné informace o jejich farmakologických vlastnostech, bezpečnosti a dávkování (viz kap. 1.8).

Námi vyvíjená platforma pro repurposing léčiv (spolupráce CREATIC a Biologický ústav LF MU/CEITEC MU/Přírodovědecká fakulta MU) je koncipována jako individualizovaná translační pipeline určená nikoli obecně pro určité onemocnění, ale pro konkrétního pacienta, jeho konkrétní gen a kauzální variantu (Obr. 8). Proces začíná klinickým posouzením potenciálního přínosu cílené intervence. Případy bez reálného terapeutického potenciálu jsou vyřazeny při první klinické triáži (první dropout). Následně je nutné nalézt vhodný funkční test a vytvořit relevantní buněčný nebo tkáňový model, který umožní zachytit důsledky dané varianty a objektivně měřit odpověď na léčbu. Celý tento proces, včetně výběru terapeutických kandidátů a jejich experimentálního ověření, musí být dokončen do 12 měsíců, aby mohl mít výsledek přímý význam pro daného pacienta. Pokud není pravděpodobné, že se to v tomto časovém rámci podaří získat přesvědčivá experimentální data, je případ při druhé laboratorní triáži ukončen (druhý dropout). Kandidátní léčiva jsou vyhledávána pomocí výpočetních metod a umělé inteligence (AI repurposing) nebo prostřednictvím vysokokapacitního screeningu (HTS). Kandidátní léčiva dále posoudí a prioritizuje farmakologický tým ve spolupráci s infrastrukturami CREATIC, CZECRIN a CAATS (bezpečnostní profil, dostupnost léčiva v ČR, přiměřenost očekávaného přínosu vůči rizikům, průchod hematoencefalickou bariérou apod.) a prioritizovaní kandidáti jsou následně testováni na buňkách pacienta. V případě, že žádný kandidát není doporučen, případ je ukončen (třetí dropout). Pokud se repurposing známých léčiv ukáže jako nevhodný, může širší platforma v budoucnu zahrnovat také vývoj individualizovaných antisense oligonukleotidů nebo genové terapie v čistých prostorách CREATIC. Výsledkem celého procesu je strukturovaný protokol předaný klinickému týmu jako podklad pro rozhodnutí o dalším individuálním terapeutickém postupu. Prvním pacientem, který je touto platformou modelově řešen, je pacient popsaný v kap. 4.2.



Obrázek 8. Schéma platformy na repurposing léčiv.

VLASTNÍ PŘÍNOS A KOMENTÁŘ K RELEVANTNÍM PUBLIKACÍM, kapitola 4

Hlavní přínos v oblasti funkční genomiky a translační precizní medicíny spočívá ve vytvoření a koordinaci integrované platformy zaměřené na diagnostiku a hledání terapeutických možností u dětí s ultra-vzácnými a dosud neobjasněnými onemocněními. Tato platforma propojuje klinický UDP program Pediatrické kliniky FN Brno a LF MU s výzkumnou skupinou Ultra-vzácná onemocnění a nediagnostikovaní dětští pacienti v centru excelence CREATIC. Jejím cílem je převádět výsledky komplexních genomických analýz do konkrétních diagnostických závěrů, funkčně ověřovat klinicky relevantní varianty a v indikovaných případech hledat možnosti cílené terapie.

Realizace tohoto programu vyžaduje koordinaci řady odborně rozdílných pracovišť a výzkumných infrastruktur. Zahrnuje spolupráci klinických genetiků, pediatrů, molekulárních biologů, bioinformatiků, strukturních biologů, farmakologů a odborníků na klinické studie. Významnou součástí je rovněž rozvoj individualizované platformy pro repurposing léčiv, která není zaměřena obecně na určitou diagnózu, ale na konkrétního pacienta, jeho kauzální gen a konkrétní variantu. Hlavním úkolem lékaře je zde identifikovat klinicky vhodné případy, formulovat biologicky a klinicky relevantní otázky, koordinovat jednotlivé analytické a experimentální kroky a integrovat jejich výsledky do podoby využitelné pro diagnostické nebo terapeutické rozhodování.

Praktický význam tohoto přístupu dokládají dvě relevantní publikované práce. V případě pacienta se spastickou paraplegií typu 56 umožnilo propojení klinického zhodnocení, strukturního modelování a buněčných a enzymatických experimentů objasnit funkční dopad variant genu *CYP2U1*. U varianty p.Arg186His byla prokázána ztráta enzymatické aktivity při zachované expresi proteinu, zatímco varianta p.Pro459Leu vedla k jeho nestabilitě. Výsledky podpořily reklasifikaci původní varianty nejasného významu, potvrdily molekulární diagnózu a vytvořily předpoklad pro další úvahy o cílené léčbě (Příloha 8).

Druhá práce se týká de novo varianty p.Gly1007Arg v genu *ADAR*. Molekulární modelování lokalizovalo variantu do bezprostřední blízkosti katalytického centra ADAR1 a podpořilo hypotézu jejího dominantně negativního účinku prostřednictvím narušení vazby RNA, katalytické aktivity nebo poškozením tvorby funkčních proteinových komplexů. Obě publikace ilustrují přístup, v němž klinická charakterizace pacienta určuje směr navazujícího laboratorního výzkumu a výsledky funkční genomiky se následně vracejí zpět do diagnostické a potenciálně terapeutické péče (Příloha 7).

5. Baby Fox, národní program rychlé genomiky u kriticky nemocných dětí

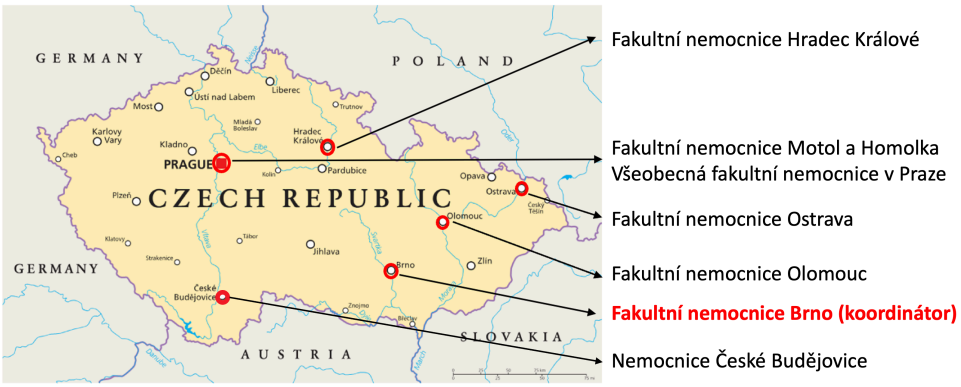
5.1 Zdůvodnění a design studie

Genetická onemocnění představují jednu z hlavních příčin mortality u novorozenců a dětských pacientů na jednotkách intenzivní péče. Metaanalýza 44 studií (Kingsmore et al. 2024 [69]) prokázala, že rychlé celogenomové sekvenování jako diagnostická metoda první volby vede u kriticky nemocných dětí k nové diagnóze u 37 % pacientů a ke změně léčebného postupu u 26 %, při současné úspoře nákladů (Dimmock et al. 2021, projekt Baby Bear: 14 265 USD/dítě [65]).

Na tuto klinickou evidenci navazuje český projekt Baby Fox, klinicky i laboratorně koordinovaný v rámci UDP programu FN Brno, který si klade za cíl vytvořit důkazy z reálné praxe o klinické využitelnosti rWGS v rámci českého zdravotního systému.

Tabulka 15. Design a parametry studie Baby Fox.

Parametr	Hodnota
Design	Trio rWGS (dítě + oba rodiče)
Plánovaný počet pacientů	120
Období	09/2024–12/2026
Zapojená centra	FN Brno/LF MU (koordinační a sekvenační centrum), FN Motol a Homolka, VFN Praha, FN Olomouc, FN Ostrava, FN Hradec Králové, Nemocnice České Budějovice
Cílový TAT	< 7 dní od odběru
Vstupní kritéria	Suspekce na geneticky podmíněné onemocnění; hospitalizace na JIP/NJIP; věk < 18 let
Vylučovací kritéria	Potvrzená genetická diagnóza; jasně negenetická příčina (HIE, sepse s odpovědí na terapii, izolovaná prematurita, izolovaná nekonjugovaná hyperbilirubinémie, apod.); odmítnutí podpisu informovaného souhlasu zákonnými zástupci
Sekvenační platforma	Illumina NovaSeq 6000 (krátké čtení); doplňkově long-read TruPath pro fázování
Bioinformatický pipeline	Dragen, Emedgene a fenotypově řízená analýza na základě HPO kódů; standardizovaný reporting
Podpora	Illumina Inc. (spotřební materiál, bioinformatické nástroje)
Mezinárodní zasazení	Neformální konsorcium GIICS (Genomics in infantile Intensive Care Setting) spolu se zástupci Baby Bambi – Izrael, Baby Lion – Německo, Baby Lynx – Španělsko, Baby Wolf – Itálie, a dalšími)



Obrázek 9. Mapa sedmi center zapojených do celonárodního českého projektu Baby Fox.

5.2 Průběžné výsledky

Projekt Baby Fox byl zahájen v 09/2024 a jeho ukončení je plánováno na 12/2026 (viz Tabulka 15). Níže uvedená data proto představují průběžné (interim) výsledky uzavřené k datu 8/2026, nikoliv finální zhodnocení celého souboru pacientů. Kompletní analýza bude k dispozici po dosažení plánovaného počtu 120 zařazených pacientů.

Tabulka 16. Interim výsledky projektu Baby Fox k 8/2026 (vlastní data autorky).

Ukazatel	Hodnota
Zařazeno pacientů	**89 / 120 (74,2 % cílového počtu pacientů)** 87 trio (proband plus rodiče) 2 duo (proband plus jeden z rodičů)
Medián věku	35 novorozenců (39,3 %), věk < 90 dní 54 dětí (60,7 %), medián 22,5 měsíce
Poměr pohlaví	43 dívek (48,3 %), 46 chlapců (51,7 %)
Průměrný počet HPO kódů	10 (rozmezí 1–32)
Výsledek do 7 dnů	97,8 % případů (2 případy 8–9 dní, porucha sekvenátoru)
Průměrná doba od odběru krve do vydání výsledkového protokolu (TAT)	5 dní (rozmezí 2–9)
Průměrná doba od doručení vzorku do laboratoře do vydání výsledkového protokolu	4 dny (rozmezí 2–8)
Diagnostická výtěžnost (ACMG třída 4/5)	**39 pacientů (43,8 %)**
VUS (třída 3)	12 pacientů (13,5 %)
Negativní	38 pacientů (42,7 %)
Celková klinická výtěžnost (třída 4/5 + klinicky relevantní kandidátní VUS)	57,3 %
Sekundární nálezy	9 pacientů (10,1 %), TNNT2, TTN, BRCA1, BRCA2, PALB2, PMS2, MSH6
Dopad do klinické péče (actionabilita)	**23 pacientů (60 %)** Kategorie klinické využitelnosti (změna medikace, referování na specializované pracoviště, změna sledování, dietetické opatření, chirurgický výkon – indikace/zrušení, přechod na paliativní péči)
Varianty nedetekovatelné WES	7 pacientů (7,9 %), nekódující varianty, CNV
Diagnóza stanovena se zpožděním, mimo rámec rychlého testovaní (reanalýza, doplnění funkčního testu, apod.)	3 pacienti

Diagnostická výtěžnost 43,8 % v rámci projektu Baby Fox je plně srovnatelná s výsledky recentní metaanalýzy (37 %) [69] i výsledky publikovaných zahraničních "Baby" projektů, Baby Bear (40 %) i Baby Bambi (53 %), a potvrzuje robustnost výsledku napříč odlišnými zdravotními systémy. Zvláště významný je nález, že u 7,9 % pacientů (n = 7) by kauzální varianta nebyla detekovatelná standardním WES (2× CNV [1× u AD onemocnění *de novo*, 1× jako druhá alterace u AR onemocnění], 5× hluboká intronová/nekódující varianta [1× u AD onemocnění *de novo*, 3× jako druhá alela u AR onemocnění, 1× homozygotně u AR onemocnění]). Jde o přímý argument pro superioritu využití WGS nad WES u kriticky nemocných dětí a novorozenců.

5.3 Ilustrativní kazuistiky

Kazuistika 6. Jasmína s molekulární diagnózou vedoucí k účinné léčbě kardiomyopatie

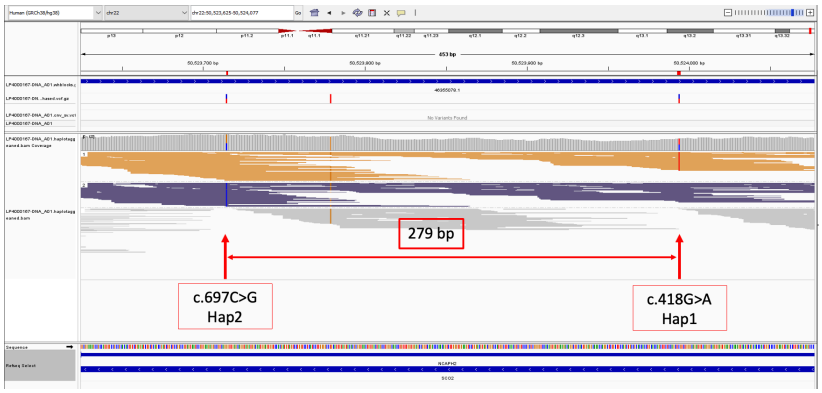
U dívky byl v 6 měsících věku implantován ICD pro komorovou tachyarytmii, echokardiografické vyšetření prokázalo trabekulizaci myokardu. V 18 měsících byla hospitalizována na jednotce intenzivní péče pro „elektrickou bouři" s opakovanými defibrilačními výboji ICD, antiarytmická terapie byla bez efektu; MRI srdce a biopsie s nálezem histiocytoidní kardiomyopatie. Pacientka byla zařazena na waiting list transplantace srdce. Genetické vyšetření klinického exomu provedené v 6 měsících bylo negativní. V 18 měsících byla proto pacientka zařazena do projektu Baby Fox, kde rWGS identifikovalo heterozygotní *de novo* variantu c.370_371del, p.(Arg124AlafsTer29) v genu *NDUFB11* (NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit B11, deficit mitochondriálního komplexu I), klasifikovanou jako pravděpodobně patogenní (třída 4). Přestože je *NDUFB11* v OMIM primárně asociován se syndromem mikroftalmie s lineárními kožními defekty typu 3, v literatuře jsou popsány také pacienti s *NDUFB11*-asociovanou histiocytoidní kardiomyopatií a závažnými komorovými arytmiemi, což odpovídalo fenotypu pacientky. Molekulární nález tak potvrdil diagnózu multisystémového mitochondriálního onemocnění. Na základě diagnózy byla upravena léčba (karvedilol, amiodaron a ketogenní dieta) s následným vymizením recidiv komorových arytmií. Současně vedlo potvrzení multisystémového charakteru onemocnění k přehodnocení indikace k transplantaci srdce a pacientka byla po projednání na indikačním semináři Dětského kardiocentra FN Motol a Homolka z transplantační čekací listiny vyřazena.

Pacientka zařazena do studie Baby Fox ve FN Motol a Homolka (MUDr. Miroslava Balaščaková, Ph.D).

Kazuistika 7. Samuel, kterému sekvenování s dlouhým čtením umožnilo potvrdit diagnózu

Samuel byl ve věku 19 měsíců neurologicky vyšetřen pro globální vývojové opoždění s centrální hypotonií a mozečkovým syndromem. V dalším průběhu se postupně rozvinula akrální spasticita dolních končetin, oboustranná semiptóza, třes a svalová hypotrofie. Ve věku dvou let, kdy byl zařazen do projektu Baby Fox, přetrvávalo významné opoždění psychomotorického vývoje a neprospívání. EMG prokázalo myogenní nález, v mozkomíšním moku byla zjištěna mírně zvýšená koncentrace laktátu a kontrolní MR mozku nově prokázala atrofii mozečku. Kombinace progresivního neurologického fenotypu, svalového postižení a laboratorních nálezů vedla k podezření na mitochondriální onemocnění. Genomovým vyšetřením byly nalezeny dvě varianty v genu *SCO2*, c.418G>A p.(Glu140Lys) a c.697C>G p.(Pro233Ala) (třídy 3 a 4), jedna paternálního původu a druhá de novo. Vzhledem k autozomálně recesivní dědičnosti onemocnění asociovaného s *SCO2* bylo zásadní určit vzájemnou fázi variant. Sekvenování s dlouhým čtením (TruPath, Illumina) potvrdilo jejich polohu v *trans* konfiguraci na rozdílných haplotypech. Diagnózu následně podpořilo vyšetření svalové biopsie s průkazem deficitu cytochrom c oxidázy (COX).

Obrazová dokumentace ke kazuistice 7.



Pacient zařazen do studie Baby Fox ve VFN Praha (prof. MUDr. Tomáš Honzík, Ph.D.).

Kazuistika 8. Tobias, u kterého genetická diagnóza vedla k zahájení paliativní péče

U novorozence se bezprostředně po narození rozvinulo těžké respirační selhání vyžadující umělou plicní ventilaci v režimu HFOV. RTG plic vykazoval obraz intersticiální plicní patologie, současně byla přítomna perzistující plicní hypertenze novorozence s nutností oběhové podpory. Po prvním podání surfaktantu došlo pouze k přechodnému zlepšení, opakovaná aplikace již byla bez efektu. Pro závažný stav bylo indikováno rychlé genomické vyšetření v rámci programu BabyFox. Trio rWGS identifikovalo dvě varianty v genu *ABCA3* v konfiguraci *in trans*: paternálně zděděnou patogenní variantu c.127C>T, p.(Arg43Cys) a maternálně zděděnou pravděpodobně patogenní synonymní variantu c.2883C>T, p.(Gly961=), čímž byla potvrzena diagnóza poruchy metabolismu plicního surfaktantu typu 3. Molekulární diagnóza měla bezprostřední dopad na další vedení péče. Vzhledem k závažnosti onemocnění a nepříznivé prognóze umožnila multidisciplinárnímu týmu společně s rodinou přehodnotit další eskalaci intenzivní léčby a přejít k paliativní péči. Stanovení kauzální diagnózy současně umožnilo cílené genetické poradenství rodině včetně stanovení rizika rekurence a možnosti PGT-M či prenatální diagnostiky v budoucím těhotenství.

Obrazová dokumentace ke kazuistice 8. Fotografie zveřejněna se souhlasem rodičů.



Pacient zařazen do studie Baby Fox ve FN Motol a Homolka (MUDr. Miroslava Balaščaková, Ph.D).

Kazuistika 9. Petřík – od život ohrožujícího stavu k účinné léčbě a příznivé prognóze

Šestitýdenní kojenec byl vyšetřován pro suspektní vrozené selhání kostní dřeně či syndrom kongenitální neutropenie. Klinicky dominovala těžká agranulocytóza s anémií a trombocytopenií, neprospívání, průjem a hepatomegalie, současně byly přítomny neurologické projevy zahrnující křeče, abnormální oční pohyby a axiální hypotonii. Pro závažný multisystémový stav bylo indikováno rychlé genomické vyšetření v rámci programu BabyFox. Během 4 dnů od přijetí vzorku byla identifikována homozygotní varianta c.1195C>T, p.(Arg399Ter) v genu *TCN2*, klasifikovaná jako pravděpodobně patogenní a zděděná od obou rodičů, která vedla ke stanovení diagnózy deficitu transkobalaminu II. Po překladu na specializované metabolické pracoviště byla potvrzena výrazná elevace kyseliny metylmalonové a homocysteinu při téměř neměřitelné hladině aktivního vitamínu B12. Bezprostředně zahájená intramuskulární léčba hydroxokobalaminem vedla k rychlé úpravě hematologických parametrů, zlepšení příjmu potravy i neurologického stavu. Při poslední kontrole v metabolickém centru ve věku 6 měsíců byl neurologický nález prakticky v normě, přetrvávala pouze mírná reziduální axiální hypotonie. Pacient bude vyžadovat celoživotní substituci hydroxokobalaminem. Rychlá molekulární diagnostika tak umožnila včasné zahájení specifické léčby ještě v období, kdy bylo možné zabránit rozvoji závažného a potenciálně ireverzibilního neurologického postižení.

Pacient zařazen do studie Baby Fox ve FN Hradec Králové (MUDr. Jan Malý, Ph.D.)

VLASTNÍ PŘÍNOS A KOMENTÁŘ K RELEVANTNÍM PUBLIKACÍM, kapitola 5

Vlastní přínos spočívá především v iniciaci, koncepčním návrhu a klinické koordinaci programu Baby Fox, prvního celonárodního programu rychlého celogenomového sekvenování určeného kriticky nemocným dětem a novorozencům v České republice. Program vznikl jako další vývojový projekt UDP programu FN Brno a převádí zkušenosti s genomickou diagnostikou nediagnostikovaných pacientů do prostředí dětské intenzivní péče, kde musí být diagnostický výsledek dostupný v řádu dnů, aby mohl bezprostředně ovlivnit léčbu. Dále spočívá v podílu na vytvoření klinického a laboratorního designu studie, nastavení indikačních a vylučovacích kritérií, standardizaci fenotypového popisu pomocí HPO termínů a organizaci toku vzorků, dat a výsledků mezi sedmi zapojenými centry. Důležitá je rovněž klinická interpretace nálezů, komunikace výsledků multidisciplinárním týmům a koordinace spolupráce mezi intenzivisty, klinickými genetiky, laboratorními odborníky, bioinformatiky a specialisty jednotlivých oborů. Významný je také mezinárodní rozměr programu prostřednictvím zapojení do neformálního konsorcia GIICS a sdílení zkušeností s obdobnými zahraničními iniciativami.

Projekt navazuje na mezinárodní studie dokládající přínos rychlé genomiky u kriticky nemocných dětí. Metaanalýza Kingsmore et al. [69] uvádí diagnostickou výtěžnost 37 % a změnu léčebného postupu u 26 % pacientů. Průběžná vlastní data programu Baby Fox k srpnu 2026 tyto závěry potvrzují v podmínkách českého zdravotního systému: u 89 zařazených pacientů bylo dosaženo diagnostické výtěžnosti 43,8 %, klinicky relevantního výsledku u 57,3 % a průměrné doby pěti dnů od odběru krve do vydání protokolu. U 60 % diagnostikovaných pacientů nález přímo ovlivnil následnou péči. Zvlášť významné je, že u 7,9 % pacientů byla zachycena kauzální varianta, kterou by standardní WES nebylo možné detekovat, což poskytuje přímý argument pro využití WGS v této klinické situaci.

Klinický význam programu ilustrují jednotlivé případy: identifikace varianty v genu *NDUFB11* vedla ke změně léčby kardiomyopatie a vyřazení pacientky z čekací listiny na transplantaci srdce; kombinace rWGS, sekvenování s dlouhým čtením a funkčního vyšetření umožnila potvrdit diagnózu onemocnění asociovaného s genem *SCO2*; nález variant v genu *ABCA3* poskytl podklad pro informované zahájení paliativní péče; a rychlá diagnostika deficitu transkobalaminu II vedla k okamžitému zahájení účinné léčby. Baby Fox tak dokládá, že hlavním přínosem rychlé genomiky není pouze stanovení diagnózy, ale především její včasný převod do konkrétního klinického rozhodnutí.

6. Závěr

Předkládaná habilitační práce zachycuje vývoj od pilotního výzkumného projektu k vytvoření a propojení komplexního klinicko-výzkumného systému péče o děti se vzácnými a dosud neobjasněnými onemocněními. Program, kterým od jeho zahájení prošlo již více než 350 pacientů bez stanovené diagnózy, se postupně rozvinul od pilotního využití singleton WES v roce 2019 přes ověření klinické využitelnosti genomiky a institucionalizaci multidisciplinární péče o tyto pacienty ve FN Brno až k funkčnímu objasňování variant nejasného významu, hledání individualizovaných terapeutických možností, zavedení celonárodní rychlé genomiky a přenosu získaných zkušeností do zdravotní politiky.

První pilíř tvoří publikačně doložené ověření genomické diagnostiky a jejího klinického dopadu: v pilotní kohortě 58 pacientů dosáhla diagnostická výtěžnost 43 % a klinická využitelnost nálezů 76 %. Tato data nebyla pouze akademickým výsledkem, ale podkladem pro vznik Multioborové indikační komise a první Ambulance pro dětské pacienty bez diagnózy v ČR. Navazující kazuistiky přinesly nové genotypově-fenotypové poznatky a první české případy vybraných jednotek. Druhým pilířem je vybudovaná a koordinovaná translační platforma propojující UDP program FN Brno s centrem excelence CREATIC LF MU a dalšími akademickými centry jako je CEITEC MU, Biologický ústav LF MU nebo Loschmidtovy laboratoře proteinového inženýrství na Přírodovědecké fakultě MU. Publikované práce o *CYP2U1* a *ADAR* ukazují, jak klinická otázka vede k funkčnímu ověření a jak se laboratorní výsledek vrací do diagnostického a potenciálně terapeutického rozhodování. Třetím pilířem je iniciace, koncepční návrh a klinická koordinace programu Baby Fox. Jeho průběžná data u 89 pacientů potvrzují, že rWGS s průměrnou dobou výsledku pět dnů přináší nejen diagnózu, ale u 60 % diagnostikovaných pacientů také přímou změnu péče. Čtvrtým pilířem je systémový dopad: model FN Brno pro nediagnostikované pacienty byl využit v analytické části a při formulaci relevantních opatření a pozitivně reflektován v Národní strategii pro vzácná onemocnění 2026–2035.

Další rozvoj bude směřovat k dokončení a publikaci finálních výsledků projektu Baby Fox, spuštění registru ROADS pro pacienty bez diagnózy, rozšíření diagnostiky založené na sekvenování s dlouhým čtením u nevyřešených případů a k rozvoji platformy pro individualizovaný repurposing léčiv. Hlavním výsledkem dosavadní práce je udržitelný model, v němž se péče o konkrétního pacienta, multidisciplinární klinické rozhodování, pokročilá genomika, funkční genomika a tvorba systému vzájemně posilují.

7. Literatura

1. Evropský parlament a Rada Evropské unie. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 141/2000 ze dne 16. prosince 1999 o léčivých přípravcích pro vzácná onemocnění. Úř. věst. L. 2000;18:1–5. Dostupné z: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2000/141/oj

2. United States. Orphan Drug Act. Pub. L. No. 97-414, 96 Stat. 2049 (Jan 4, 1983). Dostupné z: https://www.govinfo.gov/content/pkg/STATUTE-96/pdf/STATUTE-96-Pg2049.pdf.

3. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. Overview of Orphan Drug Designation: Designation Criteria [Internet]. Tokyo: PMDA; 2026 [cit. 2026-08-15]. Dostupné z: https://www.pmda.go.jp/english/review-services/reviews/0011.html

4. World Health Organization Regional Office for Europe. Final report of the Oslo Medicines Initiative: improving access to novel, high-priced medicines in the WHO European Region. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2022. WHO reference number: WHO-EURO-2022-5984-45749-65873. Dostupné z: https://www.who.int/europe/publications/i/item/WHO-EURO-2022-5984-45749-65873

5. Nguengang Wakap S, Lambert DM, Olry A, et al. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. Eur J Hum Genet. 2020;28(2):165–173.

6. Domaradzki J, Jabkowski P, Walkowiak D. Rare disease, common struggles: quality of life, caregiver burden and financial wellbeing of family caregivers in Poland. Sci Rep. 2025;15:22678.

7. Faye F, Crocione C, Anido de Peña R, et al. Time to diagnosis and determinants of diagnostic delays of people living with a rare disease: results of a Rare Barometer retrospective patient survey. Eur J Hum Genet. 2024;32(9):1116–1126.

8. EURORDIS-Rare Diseases Europe. Rare Barometer 2024 update. Dostupné z: https://www.eurordis.org/rare-barometer-findings-daily-life-survey/

9. Slabá K. Klinické, biochemické a genetické aspekty vzácných onemocnění. Disertační práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, 2024.

10. Ministerstvo zdravotnictví České republiky. Národní strategie pro vzácná onemocnění České republiky 2026–2035. Příloha 1: Analytická část [Internet]. Praha: Ministerstvo zdravotnictví České republiky; 2026 [cit. 2026-08-15]. Dostupné z: https://mzd.gov.cz/wp-content/uploads/2026/04/Priloha-1-Analyticka-cast.pdf

11. Crooke ST. A call to arms against ultra-rare diseases. Nat Biotechnol. 2021; 39(6):671-677.

12. European Commission. Impact assessment report accompanying the proposal for a regulation laying down Union procedures for the authorisation and supervision of medicinal products for human use and establishing rules governing the European Medicines Agency. Brussels: European Commission; 2023. SWD(2023) 192 final. Dostupné z: https://health.ec.europa.eu/system/files/2023-04/swd_2023_192_1-2_ia_en.pdf

13. EveryLife Foundation for Rare Diseases. The Cost of Delayed Diagnosis in Rare Disease. Washington, DC: EveryLife Foundation for Rare Diseases; 2023. Dostupné z: https://everylifefoundation.org/wp-content/uploads/2023/09/EveryLife-Cost-of-Delayed-Diagnosis-in-Rare-Disease_Final-Full-Study-Report_0914223.pdf

14. Whelan AJ, Ball S, Best L, et al. Genetic red flags: clues to thinking genetically in primary care practice. Prim Care. 2004;31(3):497–508.

15. Gahl WA, Markello TC, Toro C, et al. The National Institutes of Health Undiagnosed Diseases Program: insights into rare diseases. Genet Med. 2012;14(1):51–59.

16. Gahl WA, Wise AL, Ashley EA. The Undiagnosed Diseases Network of the National Institutes of Health: A National Extension. JAMA. 2015;314(17):1797–1798.

17. Schoch K, Esteves C, Bican A, et al. Clinical sites of the Undiagnosed Diseases Network: unique contributions to genomic medicine and science. Genet Med. 2021;23(2):259–271.

18. Taruscio D, Groft SC, Cederroth H, et al. Undiagnosed Diseases Network International (UDNI): White paper for global actions to meet patient needs. Mol Genet Metab. 2015;116(4):223–225.

19. Boycott KM, Hartley T, Kernohan KD, et al. Care4Rare Canada: Outcomes from a decade of network science for rare disease gene discovery. Am J Hum Genet. 2022;109(11):1947–1959.

20. Schuermans N, Hemelsoet D, Terryn W, et al. Shortcutting the diagnostic odyssey: the multidisciplinary Program for Undiagnosed Rare Diseases in adults (UD-PrOZA). Orphanet J Rare Dis. 2022;17(1):210.

21. Takahashi Y, Date H, Oi H, et al. Six years' accomplishment of the Initiative on Rare and Undiagnosed Diseases: nationwide project in Japan. J Hum Genet. 2022;67(9):505–513.

22. Kim SY, Lee S, Woo H, et al. The Korean undiagnosed diseases program phase I. Orphanet J Rare Dis. 2022;17(1):372.

23. Bhatia NS, Lim JY, Bonnard C, et al. Singapore Undiagnosed Disease Program: Genomic Analysis aids Diagnosis and Clinical Management. Arch Dis Child. 2021;106(1):31–37.

24. Moosa S, Coetzer KC, Lee E, Seo GH. Undiagnosed disease program in South Africa: Results from first 100 exomes. Am J Med Genet A. 2022;188(9):2684–2692.

25. López-Martín E, Martínez-Delgado B, Bermejo-Sánchez E, Alonso J, SpainUDP Network, Posada M. SpainUDP: The Spanish Undiagnosed Rare Diseases Program. Int J Environ Res Public Health. 2018;15(8):1746.

26. Cloney T, Gallacher L, Pais LS, et al. Lessons learnt from multifaceted diagnostic approaches to the first 150 families in Victoria's Undiagnosed Diseases Program. J Med Genet. 2022;59(8):748–758.

27. 100,000 Genomes Project Pilot Investigators, Smedley D, Smith KR, et al. 100,000 Genomes Pilot on Rare-Disease Diagnosis in Health Care. N Engl J Med. 2021;385(20):1868–1880.

28. Stranneheim H, Lagerstedt-Robinson K, Magnusson M, et al. Integration of whole genome sequencing into a healthcare setting: high diagnostic rates across multiple clinical entities in 3219 rare disease patients. Genome Med. 2021;13(1):40.

29. Slaba K, Pokorna P, Jugas R, et al. Diagnostic efficacy and clinical utility of whole-exome sequencing in Czech pediatric patients with rare and undiagnosed diseases. Sci Rep. 2024;14(1):28780.

30. McWalter K, Torti E, Morrow M, Juusola J, Retterer K. Discovery of over 200 new and expanded genetic conditions using GeneMatcher. Hum Mutat. 2022;43(6):760–764.

31. Osmond M, Hartley T, Johnstone B, et al. PhenomeCentral: 7 years of rare disease matchmaking. Hum Mutat. 2022;43(6):674–681.

32. Slabá K, Macek M ml. Úvod do problematiky vzácných onemocnění a systém organizace péče v České republice a Evropské unii. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2025, s. 1–18. ISBN 978-80-271-5469-2.

33. Evropský parlament a Rada Evropské unie. Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2011/24/EU ze dne 9. března 2011 o uplatňování práv pacientů v přeshraniční zdravotní péči. Úř. věst. L. 2011;88:45–65. Dostupné z: https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2011/24/oj

34. European Commission. European Reference Networks [Internet]. Brussels: European Commission; 2024 [cit. 2026-08-15]. Dostupné z: https://health.ec.europa.eu/european-reference-networks_en

35. Národní koordinační centrum pro vzácná onemocnění. Národní koordinační centrum pro vzácná onemocnění [Internet]. Praha: NKCVO; [cit. 2026-08-15]. Dostupné z: https://nkcvo.cz/

36. Česká asociace pro vzácná onemocnění, z. s. Projekty [Internet]. Praha: Česká asociace pro vzácná onemocnění; [cit. 2026-08-15]. Dostupné z: https://vzacna-onemocneni.cz/projekty/

37. Macek M. Vzácná onemocnění a jejich domácí a mezinárodní kontext v roce 2019. Čas Lék Čes. 2019;158:33–37.

38. Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, et al. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. Nat Genet. 2010;42(1):30–35.

39. Sawyer SL, Hartley T, Dyment DA, et al. Utility of whole-exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey. Clin Genet. 2016;89(3):275–284.

40. Retterer K, Juusola J, Cho MT, et al. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. Genet Med. 2016;18(7):696–704.

41. Stavropoulos DJ, Merico D, Jobling R, et al. Whole Genome Sequencing Expands Diagnostic Utility and Improves Clinical Management in Pediatric Medicine. NPJ Genom Med. 2016;1:15012.

42. Belkadi A, Bolze A, Itan Y, et al. Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(17):5473–5478.

43. Tan TY, Lunke S, Chong B, et al. A head-to-head evaluation of the diagnostic efficacy and costs of trio versus singleton exome sequencing analysis. Eur J Hum Genet. 2019;27(12):1791–1799.

44. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015;17(5):405–424.

45. Liu P, Meng L, Normand EA, et al. Reanalysis of Clinical Exome Sequencing Data. N Engl J Med. 2019;380(25):2478–2480.

46. Conlin LK, Aref-Eshghi E, McEldrew DA, Luo M, Rajagopalan R. Long-read sequencing for molecular diagnostics in constitutional genetic disorders. Hum Mutat. 2022;43(11):1531–1544.

47. Byron SA, Van Keuren-Jensen KR, Engelthaler DM, Carpten JD, Craig DW. Translating RNA sequencing into clinical diagnostics. Nat Rev Genet. 2016;17(5):257–271.

48. Marwaha S, Knowles JW, Ashley EA. A guide for the diagnosis of rare and undiagnosed disease: beyond the exome. Genome Med. 2022;14(1):23.

49. Shashi V, Schoch K, Spillmann R, et al. A comprehensive iterative approach is highly effective in diagnosing individuals who are exome negative. Genet Med. 2019;21(1):161–172.

50. Sullivan JA, Schoch K, Spillmann RC, Shashi V. Exome/Genome Sequencing in Undiagnosed Syndromes. Annu Rev Med. 2023;74:489–502.

51. Cummings BB, Marshall JL, Tukiainen T, et al. Improving genetic diagnosis in Mendelian disease with transcriptome sequencing. Sci Transl Med. 2017;9(386):eaal5209.

52. Merker JD, Wenger AM, Sneddon T, et al. Long-read genome sequencing identifies causal structural variation in a Mendelian disease. Genet Med. 2018;20(1):159–163.

53. Frésard L, Smail C, Ferraro NM, et al. Identification of rare-disease genes using blood transcriptome sequencing and large control cohorts. Nat Med. 2019;25(6):911–919.

54. Lee H, Huang AY, Wang LK, et al. Diagnostic utility of transcriptome sequencing for rare Mendelian diseases. Genet Med. 2020;22(3):490–499.

55. Levy MA, McConkey H, Kerkhof J, et al. Novel diagnostic DNA methylation episignatures expand and refine the epigenetic landscapes of Mendelian disorders. HGG Adv. 2021;3(1):100075.

56. Lunke S, Bouffler SE, Patel CV, et al. Integrated multi-omics for rapid rare disease diagnosis on a national scale. Nat Med. 2023;29(7):1681–1691.

57. Kerkhof J, Squeo GM, McConkey H, et al. Diagnostic utility and reporting recommendations for clinical DNA methylation episignature testing in genetically undiagnosed rare diseases. Genet Med. 2024;26(5):101075.

58. Pucel J, Briere LC, Reuter C, et al. Exome and genome sequencing in a heterogeneous population of patients with rare disease: Identifying predictors of a diagnosis. Genet Med. 2024;26(6):101115.

59. Lagorce D, Lebreton E, Matalonga L, et al. Phenotypic similarity-based approach for variant prioritization for unsolved rare disease: a preliminary methodological report. Eur J Hum Genet. 2024;32(2):182–189.

60. Vollger MR, Korlach J, Eldred CK, et al. Synchronized long-read genome, methylome, epigenome and transcriptome profiling resolve a Mendelian condition. Nat Genet. 2025;57(2):469–479.

61. Splinter K, Adams DR, Bacino CA, et al.; Undiagnosed Diseases Network. Effect of Genetic Diagnosis on Patients with Previously Undiagnosed Disease. N Engl J Med. 2018;379(22):2131–2139.

62. Laurie S, Steyaert W, de Boer E, et al. Genomic reanalysis of a pan-European rare-disease resource yields new diagnoses. Nat Med. 2025;31(2):478–489.

63. Petrikin JE, Cakici JA, Clark MM, et al. The NSIGHT1-randomized controlled trial: rapid whole-genome sequencing for accelerated etiologic diagnosis in critically ill infants. npj Genom Med. 2018;3:6.

64. Farnaes L, Hildreth A, Sweeney NM, et al. Rapid whole-genome sequencing decreases infant morbidity and cost of hospitalization. npj Genom Med. 2018;3:10.

65. Dimmock D, Caylor S, Waldman B, et al. Project Baby Bear: Rapid precision care incorporating rWGS in 5 California children's hospitals. Am J Hum Genet. 2021;108(7):1231–1238.

66. Wu B, Kang W, Wang Y, et al. Application of Full-Spectrum Rapid Clinical Genome Sequencing Improves Diagnostic Rate and Clinical Outcomes in Critically Ill Infants in the China Neonatal Genomes Project. Crit Care Med. 2021;49(10):1674–1683.

67. NICUSeq Study Group; Krantz ID, Medne L, Weatherly JM, et al. Effect of Whole-Genome Sequencing on the Clinical Management of Acutely Ill Infants With Suspected Genetic Disease: A Randomized Clinical Trial. JAMA Pediatr. 2021;175(12):1218–1226.

68. Marom D, Mory A, Reytan-Miron S, et al. National Rapid Genome Sequencing in Neonatal Intensive Care. JAMA Netw Open. 2024;7(2):e240146.

69. Kingsmore SF, Nofsinger R, Ellsworth K. Rapid genomic sequencing for genetic disease diagnosis and therapy in intensive care units: a review. npj Genom Med. 2024;9:17. doi:10.1038/s41525-024-00404-0.

70. Thomas S, Caplan A. The Orphan Drug Act revisited. JAMA. 2019;321(9):833–834.

71. Fermaglich LJ, Miller KL. A comprehensive study of the rare diseases and conditions targeted by orphan drug designations and approvals over the forty years of the Orphan Drug Act. Orphanet J Rare Dis. 2023;18:163.

72. Newton W. Drug development for ultra-rare diseases: what happens when N=1? Clinical Trials Arena [Internet]. 2022 Apr 21 [cit. 2026-08-15]. Dostupné z: https://www.clinicaltrialsarena.com/features/drug-development-for-ultra-rare-diseases-what-happens-when-n1/

73. Gicquel T, Cortial L, Lutsyk K, et al. 2017–2023: state of the art of gene therapies in rare diseases in Europe. Rare Dis Orphan Drugs J. 2023;2:23.

74. Baylot V, Le TK, Taïeb D, et al. Between hope and reality: treatment of genetic diseases through nucleic acid-based drugs. Commun Biol. 2024;7:489.

75. Tesi B, Boileau C, Boycott KM, et al. Precision medicine in rare diseases: what is next? J Intern Med. 2023;294:397–412.

76. Cacoub E, Lefebvre NB, Milunov D, Sarkar M, Saha S. Quantifying hope: an EU perspective of rare disease therapeutic space and market dynamics. Front Public Health. 2025;13:1520467.

77. Chaudhary A, Kumar V. Rare diseases: a comprehensive literature review and future directions. J Rare Dis. 2025;4:33.

78. Hong D, Kesselheim AS. Strategies to advance drug repurposing for rare diseases. DrugRxiv [Preprint]. 2025. doi:10.58647/DRUGARXIV.PR000027.v1.

79. Slaba K, Noskova H, Vesela P, et al. Novel Splicing Variant in the *PMM2* Gene in a Patient With *PMM2*-CDG Syndrome Presenting With Pericardial Effusion: A Case Report. Front Genet. 2020;11:561054.

80. Slabá K, Pálová H, Veselá P, et al. Neurovývojová porucha s mentální retardací spojená s genem *PPP2R5D*, první případ v České republice. Cesk Slov Neurol N. 2021;117(2):205–207.

81. Slaba K, Jezova M, Pokorna P, et al. Two sisters with cardiac-urogenital syndrome secondary to pathogenic splicing variant in the *MYRF* gene with unaffected parents: A case of gonadal mosaicism? Mol Genet Genomic Med. 2023;11(5):e2139.

82. Slabá K, Pálová H, Pokorná P, et al. Syndrom intelektuálního postižení související s *DYRK1A*. Ces-slov Pediat. 2022;77(4):215–218.

83. Slabá K, Pokorná P, Koželková K, et al. ReNU syndrom – nově popsané prevalentní neurovývojové onemocnění, první případ v České republice. Čes-slov Pediat. 2025;80(4):177-181.

84. Sustrova E, Rihova K, Pokorna P, et al. Early-onset hereditary spastic paraplegia type 56 (SPG56): clinical-molecular correlations and functional validation of *CYP2U1* variants. BMC Med Genomics. 2026;19(1):117. doi:10.1186/s12920-026-02394-7.

85. Turan K, Pokorna P, Rihova K, et al. Aicardi-Goutières Syndrome Type 6: Case Report and Structural Prediction Supporting a Dominant-Negative Effect of the *ADAR1* c.3019G>A Variant. Clin Case Rep. 2026;14(4):e72146.

86. Slabá K, Pokorná P, Říhová K, Demlová R, Slabý O. Výzvy a perspektivy diagnostiky dětských pacientů bez diagnózy a přehled léčebných možností u vzácných onemocnění. Neurol Praxi. 2026;27(2):89–95.

8. Seznam zkratek

Zkratka	Význam
AAV	Adeno-Associated Virus, adeno-asociovaný virus (vektor pro genovou terapii)
ABCA3	ATP Binding Cassette Subfamily A Member 3
ACMG/AMP	American College of Medical Genetics and Genomics / Association for Molecular Pathology
AD / AR	Autozomálně dominantní / autozomálně recesivní
ADAR1	Adenosine Deaminase RNA Specific 1
ASO	Antisense Oligonucleotide, antisense oligonukleotid
AZV ČR	Agentura pro zdravotnický výzkum České republiky
BRCA1	BRCA1 DNA Repair Associated
BRCA2	BRCA2 DNA Repair Associated
C-GUIDE™	Clinician-reported Genetic testing Utility InDEx, nástroj hodnocení klinické užitečnosti genetického testu
ČAVO	Česká asociace pro vzácná onemocnění, z. s.
CNV	Copy number variant, varianta v počtu kopií
CREATIC	Central European Advanced Therapy and Immunotherapy Center, Lékařská fakulta, Masarykovy univerzity
CYP2U1	Cytochrome P450 Family 2 Subfamily U Member 1
DMD	Dystrophin
DYRK1A	Dual Specificity Tyrosine Phosphorylation Regulated Kinase 1A
EGA	European Genome-Phenome Archive
EMA	European Medicines Agency, Evropská léková agentura
ERDERA	European Rare Diseases Research Alliance
ERN	European Reference Network, Evropská referenční síť
GIICS	Genomics in the Infantile Intensive Care Setting European Consortium
GT	Genová terapie
HPO	Human Phenotype Ontology
ICD-11	Mezinárodní klasifikace nemocí, 11. revize
JARDIN	evropská iniciativa pro integraci ERN do národních zdravotních systémů
LPVO	Léčivý přípravek pro vzácná onemocnění (orphan drug)
MCM7	Minichromosome Maintenance Complex Component 7
MEGF10	Multiple EGF Like Domains 10
MEKOVO	Mezioborová komise pro vzácná onemocnění
MSH6	MutS Homolog 6
MYRF	Myelin Regulatory Factor
MZČR	Ministerstvo zdravotnictví České republiky
NDUFB11	NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit B11
NICU/PICU	Novorozenecká / dětská jednotka intenzivní péče
NKCVO	Národní koordinační centrum pro vzácná onemocnění
NRVO	Národní registr pro vzácná onemocnění (plánovaný)

NSVO	Národní strategie pro vzácná onemocnění
ONT	Oxford Nanopore Technologies
P/LP	Pathogenic / Likely Pathogenic, patogenní / pravděpodobně patogenní varianta
PALB2	Partner and Localizer of BRCA2
PMM2	Phosphomannomutase 2
PMS2	PMS1 Homolog 2, Mismatch Repair System Component
PPP2R5D	Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit B' Delta
PZP	Přeshraniční zdravotní péče
RNU4-2	RNA, U4 Small Nuclear 2
ROADS	Registry for Patients Without Diagnosis, registr pro pacienty bez diagnózy (ve spolupráci s CREATIC)
RPE65	Retinoid Isomerohydrolase RPE65
rWGS	rapid Whole Genome Sequencing, rychlé celogenomové sekvenování
SCO2	Synthesis Of Cytochrome C Oxidase 2
siRNA	small interfering RNA, malá interferující RNA
SMN1	Survival of Motor Neuron 1, Telomeric
SMN2	Survival of Motor Neuron 2, Centromeric
SNV	Single nucleotide variant
SYPOVO	národní projekt Systém péče o vzácná onemocnění
TAT	Turnaround time, doba od odběru vzorku po vydání výsledku
TCN2	Transcobalamin 2
TNNT2	Troponin T2, Cardiac Type
TTN	Titin
UDN / UDP	Undiagnosed Diseases Network / Program
VILP	Vysoce inovativní léčivý přípravek
VUS	Variant of Uncertain Significance, varianta nejasného významu
WES	Whole Exome Sequencing, celoexomové sekvenování
WGS	Whole Genome Sequencing, celogenomové sekvenování

9. Seznam obrázků

Obr. 1. Rozložení vzácných onemocnění podle prevalenčních pásem. Kap. 1.2.

Obr. 2. Klíčová čísla diagnostické odysey. Kap. 1.3.

Obr. 3. Obecný diagnostický proces v programu pro nediagnostikované pacienty. Kap. 1.6.1.

Obr. 4. Integrovaný diagnostický pipeline pro exom-negativní pacienty (podle Marwaha et al. 2022). Kap. 1.6.3.

Obr. 5. Základní strategie genové terapie. Kap. 1.8.

Obr. 6. Strukturní model proteinu *CYP2U1* s lokalizací mutací. Kap. 4.2.

Obr. 7. Poloha varianty Gly1007Arg vůči katalytickému centru ADAR1. Kap. 4.3.

Obr. 8. Schéma platformy na repurposing léčiv. Kap. 4.5.

Obr. 9. Mapa center zapojených do projektu Baby Fox. Kap. 5.1.

10. Seznam kazuistik

Kazuistika 1. Matěj – 13letá diagnostická odysea s neprospíváním. Str. 23.

Kazuistika 2. Matyáš – multisystémová porucha s progeroidním vzhledem. Str. 24.

Kazuistika 3. Vilík s variantou nejasného významu v genu CYP2U1. Str. 28.

Kazuistika 4. Honzík s jednou chybějící variantou v genu ADAR1. Str. 31.

Kazuistika 5. Nela s variantami v genu s dosud nejasným klinickým významem. Str. 32.

Kazuistika 6. Jasmína s molekulární diagnózou vedoucí k účinné léčbě kardiomyopatie. Str. 37.

Kazuistika 7. Samuel, kterému sekvenování s dlouhým čtením umožnilo potvrdit diagnózu. Str. 38.

Kazuistika 8. Tobias, u kterého genetická diagnóza vedla k zahájení paliativní péče. Str. 38.

Kazuistika 9. Petřík - od život ohrožujícího stavu k účinné léčbě a příznivé prognóze. Str. 39.

11. Seznam příloh, plné texty vlastních publikací

Následující plné texty vlastních publikací autorky jsou přílohou habilitační práce a jsou v textu diskutovány v příslušných kapitolách.

Označení	Publikace
Příloha 1	**Slaba K**, Pokorna P, Jugas R, Palova H, Prochazkova D, Aulicka S, Spanelova K, Danhofer P, Horak O, Tuckova J, Kleiblova P, Gaillyova R, Hrunka M, Jouza M, Pinkova B, Papez J, Konecna P, Zidkova J, Stourac P, Sterba J, Demlova R, Demlova E, Jabandziev P, Slaby O. Diagnostic efficacy and clinical utility of whole-exome sequencing in Czech pediatric patients with rare and undiagnosed diseases. Sci Rep. 2024;14(1):28780.
Příloha 2	**Slaba K**, Noskova H, Vesela P, Tuckova J, Honzik T, Hansikova H, Kleiblova H, Stourac P, Jabandziev P, Slaby O, Prochazkova D. Novel Splicing Variant in the PMM2 Gene in a Patient With PMM2-CDG Syndrome Presenting With Pericardial Effusion: A Case Report. Front Genet. 2020;11:561054.
Příloha 3	**Slabá K**, Pálová H, Veselá P, Aulická Š, Konečná P, Štěrba M, Jabandžiev P, Slabý O, Procházková D. Neurovývojová porucha s mentální retardací spojená s genem *PPP2R5D* — první případ v České republice. Cesk Slov Neurol N. 2021;117(2):205–207.
Příloha 4	**Slaba K**, Jezova M, Pokorna P, Palova H, Tuckova J, Papez J, Prochazkova D, Jabandziev P, Slaby O. Two sisters with cardiac-urogenital syndrome secondary to pathogenic splicing variant in the *MYRF* gene with unaffected parents: A case of gonadal mosaicism? Mol Genet Genomic Med. 2023;11(5):e2139.
Příloha 5	**Slabá K**, Pálová H, Pokorná P, Slabý O, Konečná P, Kolbová L, Jabandžiev P, Procházková D. Syndrom intelektuálního postižení související s *DYRK1A*. Ces-slov Pediat. 2022;77(4):215–218.
Příloha 6	**Slabá K,** Pokorná P, Koželková K, Hloušková E, Jugas R, Kubátová J, Demlová R, Danhofer P, Jabandžiev P, Svatoňová T, Slabý O. ReNU syndrom – nově popsané prevalentní neurovývojové onemocnění, první případ v České republice. Čes-slov Pediat. 2025;80(4):177-181.
Příloha 7	Turan K, Pokorna P, Rihova K, Kubatova J, Kozelkova K, Hlouskova E, Danhofer P, Jabandziev P, Demlova R, Damborsky J, Slaby O, **Slaba K***. Aicardi-Goutières Syndrome Type 6: Case Report and Structural Prediction Supporting a Dominant-Negative Effect of the ADAR1 c.3019G>A Variant. Clin Case Rep. 2026;14(4):e72146.
Příloha 8	Sustrova E, Rihova K, Pokorna P, Havlova V, Stiborek M, Simek Z, Damborsky J, Horak O, Kozelkova K, Hlouskova E, Demlova R, Kubatova J, Slaby O, **Slaba K***. Early-onset hereditary spastic paraplegia type 56 (SPG56): clinical-molecular correlations and functional validation of CYP2U1 variants. BMC Med Genomics. 2026;19(1):117.
Příloha 9	**Slabá K**, Pokorná P, Říhová K, Demlová R, Slabý O. Výzvy a perspektivy diagnostiky dětských pacientů bez diagnózy a přehled léčebných možností u vzácných onemocnění. Neurol Praxi. 2026;27(2):89–95.

** korespondující autorka.*

12. Přílohy

Příloha 1

Slaba K, Pokorna P, Jugas R, Palova H, Prochazkova D, Aulicka S, Spanelova K, Danhofer P, Horak O, Tuckova J, Kleiblova P, Gaillyova R, Hrunka M, Jouza M, Pinkova B, Papez J, Konecna P, Zidkova J, Stourac P, Sterba J, Demlova R, Demlova E, Jabandziev P, Slaby O. Diagnostic efficacy and clinical utility of whole-exome sequencing in Czech pediatric patients with rare and undiagnosed diseases. Sci Rep. 2024;14(1):28780.

scientific reports

Check for updates

OPEN

Diagnostic efficacy and clinical utility of whole-exome sequencing in Czech pediatric patients with rare and undiagnosed diseases

Katerina Slaba[1]✉, Petra Pokorna[2,3], Robin Jugas[2,3], Hana Palova[2], Dagmar Prochazkova[1], Stefania Aulicka[4], Klara Spanelova[4], Pavlina Danhofer[4], Ondrej Horak[4], Jana Tuckova[1], Petra Kleiblova[5,6], Renata Gaillyova[7], Matej Hrunka[1], Martin Jouza[1], Blanka Pinkova[1], Jan Papez[1], Petra Konecna[1], Jana Zidkova[8], Petr Stourac[9,10], Jaroslav Sterba[11], Regina Demlova[12], Eva Demlova[12], Petr Jabandziev[1,2] & Ondrej Slaby[2,3,13]✉

In the last decade, undiagnosed disease programs have emerged to address the significant number of individuals with suspected but undiagnosed rare genetic diseases. In our single-center study, we have launched a pilot program for pediatric patients with undiagnosed diseases in the second-largest university hospital in the Czech Republic. This study was prospectively conducted at the Department of Pediatrics at University Hospital Brno between 2020 and 2023. A total of 58 Czech patients with undiagnosed diseases were enrolled in the study. All children underwent singleton WES with targeted phenotype-driven analysis. We identified 28 variants, including 11 pathogenic, 13 likely pathogenic, and 4 VUS according to ACMG guidelines, as diagnostic of genetic diseases in 25 patients, resulting in an overall diagnostic yield of 43%. Eleven variants were novel and had not been previously reported in any public database. The overall clinical utility (actionability) enabling at least one type of change in the medical care of the patient was 76%, whereas the average number of clinical implications to individual patient care was two. Singleton WES facilitated the diagnostic process in the Czech undiagnosed pediatric population. We believe it is an effective approach to enable appropriate counseling, surveillance, and personalized clinical management.

Keywords Rare genetic diseases, Undiagnosed patients, Whole-exome sequencing

Rare diseases (RD) are clinically heterogeneous, predominantly hereditary, multisystemic diseases with a very low incidence (prevalence) in the general population, which impact on the quality of life and social inclusion of patients or threaten their lives. A disease is defined as rare in the European Union if it affects less than one patient per 2000 individuals. The severity of RD is that there are more than 8000 different RDs, so the cumulative

[1]Department of Pediatrics, University Hospital Brno, Faculty of Medicine, Masaryk University, Cernopolni 9, 613 00 Brno, Czech Republic. [2]Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic. [3]Department of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic. [4]Department of Pediatric Neurology, University Hospital Brno, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic. [5]Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic. [6]Institute of Biology and Medical Genetics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic. [7]Department of Medical Genetics and Genomics, University Hospital Brno, Faculty of Medicine, Masaryk University Brno, Brno, Czech Republic. [8]Centre of Molecular Biology and Genetics, Department of Hematology, Oncology and Internal Medicine, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic. [9]Department of Pediatric Anesthesiology and Intensive Care Medicine, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic. [10]Department of Simulation Medicine, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic. [11]Department of Pediatric Oncology, Faculty of Medicine, University Hospital Brno, Masaryk University, Brno, Czech Republic. [12]Department of Pharmacology/CZECRIN, Masaryk University Faculty of Medicine, Brno, Czech Republic. [13]Center of Precision Medicine, Department of Pathology, University Hospital Brno, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic. ✉email: slaba.katerina@fnbrno.cz; oslaby@med.muni.cz

number of patients is not negligible, estimated to be 1 in 16 people in the general population, despite the low prevalence of individual clinical entities[1].

Because a large proportion of rare diseases have a genetic basis, obtaining an accurate molecular diagnosis is crucial for appropriate clinical management, family, and reproductive counseling and support. However, it has been estimated that at least half of those with rare genetic diseases remain undiagnosed despite 'standard' clinical care, and these patients then undergo a so-called "diagnostic odyssey"[1,2].

Over the last 15 years, Undiagnosed Diseases Programs have emerged to address the significant number of individuals with suspected but undiagnosed rare genetic diseases, integrating research and clinical care to optimize diagnostic outcomes. The first formal Undiagnosed Diseases Program was established in 2008 by the National Institutes of Health (NIH) in the United States, followed by the creation of the NIH-funded Undiagnosed Disease Network (UDN) in 2014[2,3]. Analogous initiatives, programs, and networks for undiagnosed diseases were subsequently created in Canada[4], Great Britain[5], Japan[6], Spain[7], Italy[8], and other countries (for review[1]). In the Czech Republic, no such program for patients with undiagnosed diseases is formally established currently.

Along with developing these specialized programs for patients with undiagnosed diseases, the last decade has seen a rapid shift towards using whole-exome sequencing (WES) and whole-genome sequencing (WGS) as the first-line diagnostic test for patients with suspected genetic disease. However, many physicians still often consider it a last resort. The growing number of WES studies improved diagnostic rate by allowing concomitant examination of genes more comprehensively compared with conventional genetic tests, such as gene panels and chromosomal microarray analysis (CMA)[9–11]. In a recent meta-analysis from 2023, the median diagnostic yield in 13 WES studies on patients with rare diseases was 43%, and the median clinical utility, available in only four studies, was 44%.[12] In addition, the clinical utility of these studies increased by approximately 3% year-on-year, and from a cost-utility perspective, the study concluded that clinical management changes due to WES were cost-saving[12]. This meta-analysis only further confirmed previous data that clearly justified using WES as an essential diagnostic method in patients with rare diseases. Recently, it has been shown that WGS overcomes some of the limitations of WES and allows the detection of other types of variants, especially copy number variations (CNVs), as well as the detection of non-coding variants in regulatory and intronic regions. This has led to an increased diagnostic yield of WGS compared to WES in some studies[13], which was the highest, especially for the trio-based WGS approach[14]; however, it remains unclear how this will be affected by the selection criteria for undiagnosed patients and what the implications will be in terms of additional costs, increased workload and prolonged turnaround time of results.

In our prospective, single-center study, we have launched a pilot program for pediatric patients with undiagnosed diseases in the second-largest university hospital in the Czech Republic, with WES implemented as a first-line test after enrolment in the study as part of the diagnostic workflow. The aim was to evaluate the diagnostic yield and clinical utility of WES in the Czech population of patients with undiagnosed disease.

Methods

Study subjects

This study was prospectively conducted at the Department of Pediatrics at University Hospital Brno (Brno, Czech Republic) between 2020 and 2023. A total of 58 consecutive Czech patients with undiagnosed diseases were enrolled in the study. Exclusion and inclusion criteria were adapted from those used in the Japanese Initiative on Rare and Undiagnosed Diseases (IRUD)[15], which defines a typical cohort remaining undiagnosed after comprehensive clinical assessment. Patients without highly suspected or known disease, who had not previously undergone WES or WGS and fulfilled the following criteria were eligible for enrollment in this study: (1) the patient remains undiagnosed for 6 months or longer (not necessary for infants), and the symptom(s) affects his/her daily life, AND (2.1) there exists an objective sign(s) that cannot be traced to a single organ, OR (2.2) There is a distinct family history suggestive of a genetic etiology (similar symptom(s) found in the patient's relatives). To ensure the accuracy of diagnosis, all clinical information and patient records provided by the referring physicians were evaluated carefully. We further applied the human phenotype ontology (HPO) classification to describe the patient's phenotypes systematically. The study was approved by the University Hospital Brno Ethics Committee (Approvals no. 31-270420 and 12-071222), and informed consent was obtained from all participants or their legal representatives. All methods and analyses were carried out following relevant guidelines and regulations and conducted in accordance with ethical principles and the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki).

Whole-exome sequencing

DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using the QIAmp DNA Micro Kit (Qiagen, Germany). The quantity and purity of the isolated DNA were determined on a NanoDrop 2000c Spectrophotometer and a Qubit 2.0 Fluorometer (ThermoFisher Scientific, MA, USA). Sequencing libraries were prepared using either the TruSeq DNA Exome kit (Illumina, CA, USA) or the KAPA HyperPlus Kit combined with the KAPA HyperExome panel (Roche, Switzerland). Sequencing was performed using the NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 cycles) on the NextSeq 500 platform (Illumina, CA, USA) in paired-end setup and read lengths of 2×75 bp. More than 97% of the target regions showed at least 40-fold coverage.

Data analysis, variant detection and classification

Obtained reads were aligned to the GRCh37 (for libraries prepared with TrueSeq DNA Exome kit) or GRCh38 (for libraries prepared using KAPA HyperExome panel) reference genome using the BWA-MEM algorithm (http://bio-bwa.sourceforge.net/) with default parameters. PCR duplicates were removed using Picard tools (http://broadinstitute.github.io/picard/). The aligned BAM files were sorted and extracted using the statistical metric by SAMtools (v.1.9)[16]. A union approach integrating three variant callers, GATK HaplotypCaller (v.3.8)[17],

VarDict[18], and Strelka[19], was subsequently used for variant calling. Identified variants were filtered so that only non-synonymous single nucleotide substitutions, insertions, and deletions located in coding and adjacent non-coding (splicing) regions showing a population frequency < 1% according to the GnomAD database (https://gnomad.broadinstitute.org/) were evaluated. Verification was performed using Integrative Genomics Viewer (IGV) software[20]. The potential pathogenicity of the identified variants was evaluated with respect to the impact at the protein level, the distinct biochemical properties of the altered codon, the degree of evolutionary conservation, and also using information available in clinical databases of genetic variants, including OMIM (https://www.omim.org), ClinVar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/), or HGMD database (https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php), in population databases (GnomAD and 1000 Genomes, http://www.1000genomes.org/) and in the primary literature. The significance of previously undescribed variants was evaluated using in silico prediction algorithms, such as PolyPhen-2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/), SIFT (https://sift.bii.a-star.edu.sg), Mutation Taster (https://www.mutationtaster.org), or other algorithms integrated into Alamut (https://www.sophiagenetics.com/platform/alamut-visual-plus/) or Varsome tools (https://varsome.com).

Variants were classified according to ACMG recommendations[21] into one of 5 classes (benign, likely benign, variant of uncertain significance - VUS, likely pathogenic, pathogenic). Pathogenic and likely pathogenic variants in syndrome-associated genes corresponding to the observed proband phenotype and the indication for testing were primarily reported. In addition, variants of uncertain significance present in the zygosity corresponding to the mode of inheritance of the associated syndrome whose significance was supported by prediction algorithms and/or whose manifestation matches the proband phenotype were considered. Beyond the indication for testing, pathogenic and likely pathogenic variants in the panel of 78 genes were evaluated as potential incidental findings in accordance with the ACMG SF 3.1 list[22].

Selected variants identified by WES were confirmed by Sanger sequencing. A subset of the identified variants was analyzed using Sanger sequencing of the available family members for segregation analysis. For CNV analysis, candidate genes were visually inspected using the IGV software[20,23], and identified CNVs were confirmed by multiplex ligation-dependent probe amplification. The analysis of the mitochondrial DNA or the WES analysis in the trio was not performed in any of the enrolled patients.

Interpretation of variants in the clinical context

Identified variants were interpreted considering the patient's clinical evaluation to assess causality. The proband's clinical information was transformed to its corresponding standardized HPO terms and assessed to determine the similarity with approximately 7000 rare genetic diseases[24,25]. Variant classification and its predicted functional impact, segregation analysis, and matching with the gene-associated phenotypes known from the literature were considered. A genetic diagnosis was assumed in patients with pathogenic/ likely pathogenic variants and rarely also variants of uncertain significance or their combinations matching the phenotype known from the literature, and these variants were defined as "diagnostic." The remaining patients were considered undiagnosed[26].

Results

Characteristics of the patients

In the period 1/2020–6/2023 - a total of 58 Czech patients (27 females, 31 males) with a median age of five years (range ten days to 38 years) were enrolled in the study at the Department of Pediatrics at University Hospital Brno, Czech Republic. In total, 55 patients (95%) were aged < 18 years. Only three adult patients (25, 27, and 38 years) followed up from the pediatric age as undiagnosed in the Outpatient Clinic for Inherited Metabolic Disorders at our Department were enrolled. No genetic testing was performed before WES in 28 (48%) patients. In the remaining patients, CMA or targeted genetic testing was performed. Most patients ($n = 53$, 91%) were referred directly from the Department of Pediatrics, four patients (7%) were referred from the Department of Pediatric Neurology, and one patient (2%) from the Department of Pediatric Oncology of our hospital. With one exception described below, the patients were unrelated. There were no consanguineous families in our cohort. When dividing patients into groups, based on the major HPO symptoms at the time of the request for WES, abnormality of metabolism/homeostasis (HP:0001939) were the most frequently observed, followed by a global developmental delay (HP:0001263), dysmorphic facial features (HP:0001999), muscular hypotonia (HP:0001252), failure to thrive (HP:0001508), short stature (HP:0004322) and intellectual disability (HP:0001249) (summarized in Table 1). Three cases in our cohort were published in the form of detailed case reports with the respective references provided. Two patients died before or shortly after WES, at three months[27] and 2 years of age. In two cases (sisters), WES was performed post-mortem to elucidate the cause of death associated with multiorgan developmental impairment[28].

Patients with identified diagnostic variants

The detailed clinical characteristics of the 25 patients with a positive diagnosis are given in Table 2, with a summary below. According to ACMG guidelines[21], 28 variants, including 11 pathogenic, 13 likely pathogenic, and 4 VUS, were identified as diagnostic of genetic disorders in 25 patients (Table 2). Inheritance patterns of the 25 patients identified as having causal variants were classified as autosomal dominant ($n = 14$; 56%), autosomal recessive ($n = 10$; 40%), or X-linked ($n = 1$; 4%). Eleven variants were confirmed to be *de novo*. The diagnostic variant was inherited from the symptomatic undiagnosed mother in one autosomal dominant case (Table 2; Case 16). The identical *de novo* event in siblings with healthy, variant-negative parents suggests gonadal mosaicism, which can mimic recessive inheritance (Table 2; Cases 7,8)[28]. Four patients had homozygous autosomal recessive variants, and five were compound heterozygotes. In addition, in one case, an X-linked recessive variant was inherited from an asymptomatic mother. Sanger sequencing was performed on 23 patients (92%) and their family members for segregation analysis, with the exception of cases 24 and 25 (Table 2). A total of 26 variants identified by WES were successfully confirmed by Sanger sequencing, including their zygosity. MLPA was successfully

Characteristics	*N* (%)
Age at analysis, years, median (range)	5 (0–38)
Sex, n (%)	
Male	31 (53%)
Female	27 (47%)
Major symptoms (HPO*), n	
Global developmental delay (HP:0001263)	19 (33%)
Seizures (HP:0001250)	10 (17%)
Intellectual disability (HP:0001249)	11 (19%)
Muscular hypotonia (HP:0001252)	13 (22%)
Dysmorphic facial features (HP:0001999)	19 (33%)
Short stature (HP:0004322)	11 (19%)
Microcephaly (HP:0000252)	7 (12%)
Macrocephaly (HP:0000256)	3 (5%)
Hepatomegaly (HP:0002240)	7 (12%)
Failure to thrive (HP:0001508)	13 (22%)
Abnormality of metabolism/homeostasis (HP:0001939)	29 (49%)
Abnormality of the eye (HP:0000478)	7 (12%)
Others (congenital malformation syndromes, other neuromuscular symptoms, abnormal behavior)	34 (59%)

Table 1. Characteristics of the patients. *HPO, human phenotype ontology, one patient can have more than one phenotype

used to validate the WES-identified homozygous deletion of the NPHP1 gene (case 25), but the parents' DNA was unavailable for testing. Eleven novel variants identified in this study had not been previously reported in any public database or scientific literature, including four missense SNVs, three splicing variants, three single-nucleotide deletions, one nonsense SNV, and one large deletion (these variants are bolded in Table 2). We have already published two of them in case reports[27,28]. In our cohort, no pathogenic variants were detected in genes included in the ACMG recommendations for reporting incidental findings[22].

Diagnostic yield and clinical utility

Of the 58 probands, 28 disease-causing variants were detected in 25 individuals, resulting in an overall diagnostic yield of 43%. The clinical utility (actionability) or the way WES-based diagnosis can affect medical care or the life of the patient could be classified in various ways, but definitely, it should enable a more personalized approach to clinical management. Implications for patient care in our patient cohort were as follows (summarized in Table 2): change in surveillance ($n=15$), referral to specialists ($n=14$), indication or contraindication of investigations ($n=6$), procedures ($n=4$), surgeries ($n=1$), medication change ($n=2$) and lifestyle change (e.g. dietary recommendations, $n=5$). The overall clinical utility enabling at least one type of actionability was 76% (19 patients), whereas the average number of clinical implications to individual patient care was two. If we exclude the two most frequent types of actionability, i.e., referral and surveillance, the medical care or patient lifestyle will be affected in 11 patients (44%). In only 6 (24%) out of 25 children, the WES-based diagnosis did not allow any further intervention and did not affect patient care.

Discussion

The "diagnostic odyssey" is a well-known term in the field of rare and ultra-rare diseases. Undiagnosed conditions include those with rare, difficult-to-identify conditions, atypical presentations of known conditions, and diseases yet to be discovered[1]. Patients and their families can spend years on this diagnostic odyssey and never arrive at a diagnosis. The average length of a diagnostic odyssey is eight years[2]. Therefore, undiagnosed disease programs and networks have emerged to address the significant number of these individuals with suspected but undiagnosed rare genetic diseases to optimize their diagnostic and clinical outcomes.

Diagnostic opportunities for these patients were markedly shifted with the advent of genome-wide sequencing tests, like WES or WGS. Comparing WES and WGS, there is evidence showing the capability of WGS to achieve molecular diagnoses for cases that remain undiagnosed after WES[30,31]. For example, Wu et al. compared the diagnostic yield of WES and WGS and showed that WES missed 10 of 74 (14%) diagnoses because of disease-causing deep intronic, non-coding variants, and structural variants[31]. On the other hand, the diagnostic rate of WGS did not differ significantly from that of WES in the two meta-analyses[12,32]. Therefore, considering the cost-benefit ratio, increased workload, and prolonged turnaround time of results in the case of WGS, we decided to implement WES for our study.

Currently, based on the ACMG recommendations[33], genome-wide sequencing tests should be performed as first- or at least second-tier test in undiagnosed patients with a suspected genetic condition. Although the efficacy of this approach is widely demonstrated in the literature, these guidelines are far from being applied in real-world settings, including the common practice in the Czech Republic.

ID	Age (years)	Sex	Gene (transcript) Variant c., p	ACMG classification	Zygosity	Inheritance	Variant origin	Phenotypes (HPO, Human Phenotype Ontology)	OMIM	Clinical utility*, Ref.**
1	12	M	***ALDOB*** (NM_000035.4) c.448G>C, p.A150P	Class 5	Hom	AR	Maternal Paternal	Hepatomegaly (HP:0002240), recurrent hypoglycemia (HP: 0001988)	Hereditary fructose intolerance (#229600)	L, S
2	25	F	***PPP2R5D*** (NM_006245.4) c.592G>A, p.E198K	Class 5	Het	AD	De novo	Global developmental delay (HP: 0001263), Intellectual disability (HP:0001249), delay speech and language development (HP:0000750), macrocephaly (HP:0000256), central hypotonia (HP:0011398), low-set ears (HP:0000369), frontal bossing (HP: 0002007), strabismus (HP: 0000486), dysmorphic facial features (HP:0001999), seizures (HP: 0001250)	Houge-Janssens syndrome 1 (#616355)	R[29],
3	3 months***	M	***PMM2*** (NM_000303.3) c.691G>A, p.V231M **c.447+3dup**	Class 5 Class 4	Comp. het	AR	Paternal Maternal	Global developmental delay (HP: 0001263), strabismus (HP:0000486), dysmorphic facial features (HP:0001999), inverted nipples (HP: 0003186), coagulopathy (HP:0003256), elevated hepatic transaminases (HP:0002910), failure to thrive (HP:0001508), pericardial effusion (HP:0001698), abnormal fat distribution	Congenital disorder of glycosylation, type Ia (#212065)	None[27],
4	13	F	***EXT1*** (NM_000127.3) **c.1056+1_1056+2dup**	Class 4	Het	AD	De novo	Multiple exostoses (HP:0002762), short stature (HP:0004322), diabetes mellitus type I (HP:0100651)	Exostoses, multiple, type 1 (#133700)	None
5	14 days	F	***KCNQ2*** (NM_172107.4) c.1678C>T, p.R560W	Class 5	Het	AD	De novo	Focal clonic seizures (HP:0002266), central hypotonia (HP:0011398), foot polydactyly (HP:0001829), hyporeflexia (HP:0001265)	Developmental and epileptic encephalopathy 7 (#613720)	R, M
6	2***	F	***MPZ*** (NM_000530.8) **c.640del, p.R214fs**	Class 4	Het	AD	De novo	Central hypotonia (HP:0011398), hyporeflexia (HP:0001265), fatigable weakness of skeletal muscles (HP:0030196), inverted nipples (HP: 0003186), abnormality of cerebellum (HP:0001317)	Hypomyelinating neuropathy, congenital, 2 (#618184)	None
7	10 days	F	***MYRF*** (NM_001127392.3) **c.1388+2T>G**	Class 4	Het	AD	De novo, germinal mozaicism?	Dyspnea (HP:0002094), hyposaturation, pulmonary hypoplasia (HP:0002089), abnormal bronchial branching (HP:0002109), partial anomalous pulmonary venous return (HP:0010773), pulmonary hypertension (HP:0002092), patent ductus arteriosus (HP:0001643)	Cardiac-urogenital syndrome (#618280)	Post-mortem[28]

Continued

ID	Age (years)	Sex	Gene (transcript) Variant c., p	ACMG classification	Zygosity	Inheritance	Variant origin	Phenotypes (HPO, Human Phenotype Ontology)	OMIM	Clinical utility*, Ref.**
8	5 months	F	***MYRF*** (NM_001127392.3) **c.1388+2T>G**	Class 4	Het	AD	De novo, germinal mosaicism?	Dyspnea (HP:0002094), hyposaturation, pulmonary hypoplasia (HP:0002089), abnormal bronchial branching (HP:0002109), partial anomalous pulmonary venous return (HP:0010773), pulmonary hypertension (HP:0002092), coarctation of aorta (HP:0001680), hypoplastic aortic arch (HP:0012304), patent ductus arteriosus (HP:0001643)	Cardiac-urogenital syndrome (#618280)	Post-mortem[28]
9	3	F	***DYRK1A*** (NM_001347721.2) c.586C>T, p.R196*	Class 5	Het	AD	De novo	Global developmental delay (HP:0001263), intellectual disability (HP:0001249), feeding difficulties (HP:0011968), failure to thrive (HP:0001508), microcephaly (HP:0000252), lower limb spasticity (HP:0002061), dysmorphic facial features (HP:0001999)	Intellectual developmental disorder, autosomal dominant 7 (#614104)	R, S
10	12	M	***PHKA2*** (NM_000292.3) c.270C>T, p.R824C	Class 4	Hemizyg	XLR	Maternal	Hepatomegaly (HP:0002240), recurrent mild hypoglycemia (HP: 0001988), elevated hepatic transaminases (HP:0002910), failure to thrive (HP:0001508), hyperlipidemia (HP:0003077)	Glycogen storage disease, type Ixa (#306000)	L, S
11	17	F	***ABCC8*** (NM_000352.6) **c.4104C>G, p.I1368M** c.4008G>C, p.K1336N	Class 4 Class 3	Comp. het	AR	Paternal Maternal	Hypoglycemia (HP:0001943), seizures (HP:0001250)	Hyperinsulinemic hypoglycemia, familial, 1 (#256450)	R, M, S
12	6	F	***SGSH*** (NM_000199.5) c.1167C>A, p.N389K **c.1483T>C, p.C495R**	Class 5 Class 4	Comp. het	AR	Paternal Maternal	Global developmental delay (HP: 0001263), Intellectual disability (HP:0001249), delay speech and language development (HP:0000750), abnormal emotion/ affect behaviour (HP: 0100851), dysmorphic facial features (HP:0001999), coarse facial features (HP:0000280), abnormality of hair texture (HP:010719), short stature (HP:0004322)	Mucopolysaccharidosis type IIIA (Sanfilippo A) (#252900)	R
13	5	F	***FBXO11*** (NM_001190274.2) **c.1810C>T, p.Q604***	Class 4	Het	AD	De novo	Microcephaly (HP:0000252), myopathy (HP:0003198), global developmental delay (HP:0001263), joint hypermobility (HP:0001382), intellectual disability (HP:0001249), dysmorphic facial features (HP:0001999)	Intellectual developmental disorder with dysmorphic facies and behavioral abnormalities (#607871)	None

Continued

ID	Age (years)	Sex	Gene (transcript) Variant c., p	ACMG classification	Zygosity	Inheritance	Variant origin	Phenotypes (HPO, Human Phenotype Ontology)	OMIM	Clinical utilitity*, Ref.**
14	14	M	***MEGF10*** (NM_001256545.2) **c.1562G>C, p.R521P**	Class 3	Hom	AR	Maternal Paternal	Failure to thrive (HP:0001508), fatigable weakness of skeletal muscles (HP:0030196), myopathy (HP:0003198), scoliosis (HP:0002650), high palate (HP:0000218), areflexia (HP:0001284), hypoventilation (HP: 0002791), hypercapnia (HP:0002791)	Congenital myopathy 10B, mild variant (#620249)	R, Su, P, I, M
15	4	M	***PYGL*** (NM_002863.4) c.2017G>A, p.E673K	Class 4	Hom	AR	Maternal Paternal	Hepatomegaly (HP:0002240), elevated hepatic transaminases (HP:0002910), failure to thrive (HP:0001508), hyperlipidemia (HP:0003077), Postnatal growth retardation (HP:0008897), short stature (HP:0004322)	Glycogen storage disease VI (#613741)	L, S, R
16	1	F	***TRIO*** (NM_007118.4) **c.2388del, p.I796fs**	Class 4	Het	AD	Maternal	Microcephaly (HP:0000252), global developmental delay (HP:0001263), dysmorphic facial features (HP:0,001,999), brachycephaly (HP:0000248), premature closure of fontanelles (HP: 0005458), epicantus (HP:0000286), frontal bossing (HP: 0002007), wide nose (HP:0000445)	Intellectual developmental disorder, autosomal dominant 44, with microcephaly (#618825)	None
17	3	M	***NSD1*** (NM_022455.5) c.5127G>A, p.W1709*	Class 5	Het	AD	De novo	Macrocephaly (HP:0000256), tall stature (HP:0000098), neuroblastoma (HP:0003006), dysmorphic facial features (HP:0001999), deeply set eye (HP:0000490), low-set ears (HP:0000369), frontal bossing (HP: 0002007), elevated hepatic transaminases (HP:0002910), intellectual disability (HP:0001249)	Sotos syndrome (#117550)	S
18	1 month	M	***RARS2*** (NM_020320.5) c.1679G>A, p.R560H **c.1157G>A, p.R386Q**	Class 4 Class 3	Comp. het	AR	Paternal Maternal	Microcephaly (HP:0000252), global developmental delay (HP:0001263), seizures (HP:0001250), central hypotonia (HP:0011398), feeding difficulties (HP:0011968), high lactate level, dysmorphic facial features (HP:0001999)	Pontocerebellar hypoplasia, type 6 (#611523)	S, M, I
19	1	F	***GBE1*** (NM_000158.4) c.691+2T>C **c.113T>G, p.L38W**	Class 5 Class 3	Comp. het	AR	Paternal Maternal	Hepatomegaly (HP:0002240), elevated hepatic transaminases (HP:0002910), failure to thrive (HP:0001508), central hypotonia (HP:0011398), global developmental delay (HP: 0001263), short stature (HP:0004322)	Glycogen storage disease IV (#232500)	R, L, S

Continued

ID	Age (years)	Sex	Gene (transcript) Variant c., p	ACMG classification	Zygosity	Inheritance	Variant origin	Phenotypes (HPO, Human Phenotype Ontology)	OMIM	Clinical utility*, Ref.**
20	1 month	F	***GRIN2B*** (NM_000834.5) c.2065G>A, p.G689S	Class 5	Het	AD	De novo	Dysmorphic facial features (HP:0001999), global developmental delay (HP: 0001263), central hypotonia (HP:0011398), short stature (HP:0004322), failure to thrive (HP:0001508), feeding difficulties (HP:0011968), strabismus (HP:0000486)	Intellectual developmental disorder, autosomal dominant 6, with or without seizures (#613970)	R, S
21	9	F	***GNAO1*** (NM_020988.3) c.625C>T, p.R209C	Class 5	Het	AD	De novo	Seizures (HP:0001250), global developmental delay (HP: 0001263), intellectual disability (HP:0,001,249), central hypotonia (HP:0011398), failure to thrive (HP:0001508), dystonia (HP:0001332), dyskinesias (HP: 0100660), spastic tetraparesis (HP:0001285)	Neurodevelop—mental disorder with involuntary movements (#617493)	P, S
22	3 weeks	M	***G6PC1*** (NM_000151.4) c.247C>T, p.R83C	Class 5	Hom	AR	Paternal Maternal	Fasting hypoglycemia (HP:0003162), hepatomegaly (HP:0002240), elevated hepatic transaminases (HP:0002910), lactic acidosis (HP:0003128)	Glycogen storage disease Ia (#232200)	R, S, L, P
23	6 weeks	F	***KMT2D*** (NM_003482.4) c.5124_5125del, p.R1709fs	Class 5	Het	AD	De novo	Seizures (HP:0001250), hypoglycemia (HP: 0001943), Mondini malformation HP:0000376, dysmorphic facial features (HP:0001999), wide nose (HP:0000445), hypertelorism (HP:0000316), long palpebral fissures (HP:0000637), blue sclerae (HP:0000592), iris coloboma (HP:0000612), suspect visual impairment (HP:0000505)	Kabuki syndrome 1 (#147920)	R, S

Continued

ID	Age (years)	Sex	Gene (transcript) Variant c., p	ACMG classification	Zygosity	Inheritance	Variant origin	Phenotypes (HPO, Human Phenotype Ontology)	OMIM	Clinical utilitity*, Ref.**
24	14	M	***NFIB*** (NM_001190737.2) **c.701del, p.G234fs**	Class 4	Het	AD	Unknown	Global developmental delay (HP: 0001263), Intellectual disability (HP:0001249), delayed speech and language development (HP:0000750), macrocephaly (HP:0000256), strabismus (HP: 0000486), abnormal emotion/affect behaviour (HP: 0100851), dysmorphic facial features (HP:0001999), coarse facial features (HP:0000280), thick eyebrown (HP:0000574), short stature (HP:0004322)	Macrocephaly, acquired, with impaired intellectual development (#618286)	none
25	8	M	***NPHP1*** deletion exon 1–20	Pathogenic	Hom	AR	Unknown	Amblyopia (HP:0000646), astigmatism (HP: 0000529), visual impairment (HP:0000505), renal insuficiency (HP:0000083)	Senior-Loken syndrome-1 (#266900)	P, R, S

Table 2. Summary of disease-causing variants detected by whole-exome sequencing, phenotypes, diagnosis, and clinical utility of findings. *Clinical utility is defined as a change in the clinical management following a causative diagnosis by WES, including, but not limited to, surveillance (S), referral to specialists (R), and indication or contraindication of investigations (I), procedures (P), surgeries (Su), medications (M) and lifestyle change (L). Genetic counseling and reproductive planning were not included in clinical utility because they were assumed to apply to all diagnostic tests. **Ref., reference to publication if already published as a case report. *** Patient died before or shortly after WES. Bolded variants are the novel variants identified in this study that had not been previously reported in any public database.

In the present study, WES was implemented as the first genetic test after inclusion in the study as part of the diagnostic workflow in the cohort of 58 Czech pediatric patients with undiagnosed disease. Regarding ACMG recommendations, 48% of patients in our cohort had no previous genetic testing performed, and WES presented a first-tier test. In the remaining patients, it was a second-tier genetic test after CMA or targeting gene testing. All patients fulfilled the criteria of the Japanese Initiative on Rare and Undiagnosed Diseases (IRUD), which we adapted for our study. The IRUD criteria differ from those used by the US UDN network because they do not specify a minimum number of specialist examinations a patient must undergo to be enrolled in the program[14].

Overall diagnostic yield and clinical utility achieved in our cohort were 43% and 76%, respectively. This diagnostic yield is consistent with the one calculated in the recently published meta-analysis, where the median diagnostic rate of WES in a subset of 13 high-quality studies (as assessed by QUADAS-2)[34] was 43% (95% CI 0.35–0.51, $n=2612$)[12]. In the same meta-analysis, the median clinical utility of WES observed in the four available high-quality studies was 44% (95% CI 0.30–0.58, $n=723$)[12], which is much lower than the one observed in our study. However, meta-analysis also shows that the clinical utility of WES ranges from 2 to 100% in the diagnosed patients when all 62 evaluated cohorts are included. Such a wide range of clinical utility rates across studies can be explained by the inconsistent definitions used for clinical utility and its categories in the various studies. Here, we used the most common classification of clinical utility into the following categories: changes in surveillance, referral to specialists, lifestyle changes and diet, indication or contraindication of investigations, procedures, surgeries, and medication changes.

Sanger sequencing is recommended to be used for verification of WES-findings to avoid false-positive variant calls[26]. In our study, all 28 diagnostic variants were successfully validated by Sanger sequencing. Family member testing by Sanger sequencing and segregation analysis was performed in 23 (92%) out of 25 patients with identified diagnostic variants, which enabled clarification of the inheritance pattern and carrier status in family members. When using WES, copy number variations (CNVs) can be identified by analyzing read depth and coverage across exon regions. However, the accuracy of CNVs estimation in targeted or exome sequencing is constrained by the considerable variability in sequencing coverage and read depth across different regions[23]. Therefore, the only gene deletion (case 25) identified by WES in our cohort was successfully validated by MLPA.

Our study has several limitations. First, the small number of patients enrolled did not allow statistical evaluation of the diagnostic yield and clinical utility of singleton WES in various subgroups of patients stratified by major symptoms. Further, the use of trio WES may increase diagnostic yields compared with singleton WES, especially when we consider the potential diagnostic variants of uncertain significance. Despite its advantages, WES also has some of the aforementioned limitations regarding the types of variants that can be detected. Some

of these limitations may explain why 57% of our cohort failed to obtain a genetic diagnosis even after WES. In some of the undiagnosed cases, trio WES, WGS, or trio WGS could probably provide a molecular diagnosis.

Conclusion

In conclusion, our study provides evidence, for the first time in the Czech population, that genome-wide sequencing tests, such as WES, enable high diagnostic yield and clinical utility in pediatric patients with undiagnosed diseases. In our cohort, we achieved the upper limits of diagnostic yields and clinical utility published in analogous studies from other countries where WES was applied in undiagnosed pediatric patients. Of the 28 diagnostic variants identified, twelve were novel and had not been previously reported in any public database.

Data availability

Sequence data has been deposited at the European Genome-phenome Archive (EGA), under accession number EGAS50000000442.

Received: 27 June 2024; Accepted: 13 November 2024
Published online: 20 November 2024

References

1. Curic, E. et al. International Undiagnosed Diseases Programs (UDPs): Components and outcomes. *Orphanet. J. Rare Dis.* **18**, 348 (2023).
2. Macnamara, E. F., D'Souza, P. & Tifft, C. J. The undiagnosed diseases program: Approach to diagnosis. *Transl. Sci. Rare Dis.* **4**, 179–188 (2019).
3. Taruscio, D. et al. Undiagnosed Diseases Network International (UDNI): White paper for global actions to meet patient needs. *Mol. Genet. Metab.* **116**, 223 (2015).
4. Boycottm, K. M. et al. Care4Rare Canada: Outcomes from a decade of network science for rare disease gene discovery. *Am. J. Hum. Genet.* **109**, 1947–1959 (2022).
5. Smedley, D. et al. 100,000 genomes pilot on rare-disease diagnosis in health care—Preliminary report. *N. Engl. J. Med.* **20**, 1868–1880 (2021).
6. Takahashi, Y. et al. Six years' accomplishment of the initiative on rare and undiagnosed diseases: Nationwide project in Japan to discover causes, mechanisms, and cures. *J. Hum. Genet.* **67**, 505–513 (2022).
7. López-Martín, E., Martínez-Delgado, B., Bermejo-Sánchez, E., Alonso, J. & Posada, M. SpainUDP: The Spanish undiagnosed rare diseases program. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* **15**, 1746 (2018).
8. Salvatore, M. et al. Improving diagnosis for rare diseases: The experience of the Italian undiagnosed rare diseases network. *Ital. J. Pediatr.* **46**, 130 (2020).
9. Dillon, O. J. et al. Exome sequencing has higher diagnostic yield compared to simulated disease-specific panels in children with suspected monogenic disorders. *Eur. J. Hum. Genet.* **26**, 644–651 (2018).
10. Posey, J. E. Genome sequencing and implications for rare disorders. *Orphanet J. Rare Dis.* **14**, 153 (2019).
11. Rosina E. *et al*. Comparison of first-tier whole-exome sequencing with a multi-step traditional approach for diagnosing paediatric outpatients: An Italian prospective study. *Molecular Genetics & Genomic Medicine.* e2316 (2023).
12. Chung, C. C. Y. et al. Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of exome and genome sequencing in pediatric and adult patients with rare diseases across diverse populations. *Genet. Med.* **25**, 100896 (2023).
13. Burdick, K. J. et al. Limitations of exome sequencing in detecting rare and undiagnosed diseases. *Am. J. Med. Genet. A.* **182**, 1400–1406 (2020).
14. Kingsmore, S. F. et al. A randomized, controlled trial of the analytic and diagnostic performance of singleton and trio, rapid genome and exome sequencing in Ill infants. *Am. J. Hum. Genet.* **105**, 719–733 (2019).
15. Adachi, T. et al. Japan's initiative on rare and undiagnosed diseases (IRUD): Towards an end to the diagnostic odyssey. *Eur. J. Hum. Genet.* **25**, 1025–1028 (2017).
16. Li, H. et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079 (2009).
17. McKenna, A. et al. The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **20**, 1297–1303 (2010).
18. Lai, Z. et al. VarDict: A novel and versatile variant caller for next-generation sequencing in cancer research. *Nucleic Acids. Res.* **44**, e108 (2016).
19. Kim, S. et al. Strelka2: Fast and accurate calling of germline and somatic variants. *Nat. Methods.* **15**, 591–594 (2018).
20. Robinson, J. T. et al. Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* **29**, 24–26 (2011).
21. Richards, S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **17**, 405–424 (2015).
22. Miller, D. T. et al. ACMG SF v3.1 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: A policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet. Med.* **24**, 1407–1414 (2022).
23. Gabrielaite, M. et al. A comparison of tools for copy-number variation detection in germline whole exome and whole genome sequencing data. *Cancers (Basel)* **13**, 6283 (2021).
24. Greene, D., BioResource, N. I. H. R., Richardson, S. & Turro, E. Phenotype similarity regression for identifying the genetic determinants of rare diseases. *Am. J. Hum. Genet.* **98**, 490–499 (2016).
25. Robinson, P. N. & Mundlos, S. The human phenotype ontology. *Clin. Genet.* **77**, 525–534 (2010).
26. Lee, J. Y., Oh, S. H., Keum, C., Lee, B. L. & Chung, W. Y. Clinical application of prospective whole-exome sequencing in the diagnosis of genetic disease: Experience of a regional disease center in South Korea. *Ann. Hum. Genet.* https://doi.org/10.1111/ahg.12530 (2023).
27. Slaba, K. et al. Novel splicing variant in the PMM2 gene in a patient with PMM2-CDG syndrome presenting with pericardial effusion: A case report. *Front. Genet.* **11**, 561054 (2020).
28. Slaba, K. et al. Two sisters with cardiac-urogenital syndrome secondary to pathogenic splicing variant in the MYRF gene with unaffected parents: A case of gonadal mosaicism?. *Mol. Genet. Genomic. Med.* **11**, e2139 (2023).
29. Slaba, K. et al. PPP2R5D-related intellectual disability and neurodevelopmental delay—The first case in the Czech Republic. *Cesk. Slov. Neurol. N.* **117**, 205–207 (2021).
30. Bertoli-Avella, A. M. et al. Successful application of genome sequencing in a diagnostic setting: 1007 index cases from a clinically heterogeneous cohort. *Eur. J. Hum. Genet.* **29**, 141–53 (2021).

31. Wu, B. et al. Application of full-spectrum rapid clinical genome sequencing improves diagnostic rate and clinical outcomes in critically ill infants in the China neonatal genomes project. *Crit. Care. Med.* **49**, 1674–1683 (2021).
32. Clark, M. M. et al. Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases. *npj Genom. Med.* **3**, 16 (2018).
33. Manickam, K. et al. Exome and genome sequencing for pediatric patients with congenital anomalies or intellectual disability: An evidence-based clinical guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet. Med.* **23**, 2029–2037 (2021).
34. Whiting, P. F. et al. QUADAS-2: A revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Ann. Intern. Med.* **155**, 529–536 (2011).

Acknowledgements
The authors thank all the participants of the study. We gratefully acknowledge the Core Facility Genomics, supported by the NCMG research infrastructure (project LM2023067 funded by MEYS CR), and Core Facility Bioinformatics of CEITEC Masaryk University for their support with obtaining of the scientific data presented in this paper.

Author contributions
KS and OS designed the study and drafted the manuscript. PP, HP, RJ, JZ, KS, PK and OS performed the genetic analysis and evaluation of variants. KS, SA, KS, OH, PD, JT, RG, MH, MJ, BP, JP, PS, RD, PKo, DP, JS, RD, ED and PJ acquired and analyzed the clinical data. OS, KS, RJ, RD, PJ, and DP provided interpretation of the data. KS, PP, SA, KS, OH, PD, JT, RG, MH, MJ, BP, JP, PS, RD, ED, PK, DP and PJ commented on the manuscript draft. All authors reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding
This work was supported by the Ministry of Health, Czech Republic, Conceptual Development of Research Organization (FNBr, 65269705) and by the project CREATIC funded from European Union's Horizon Europe Coordination and Support Action under the Grant agreement number 101059788

Declarations

Competing interests
The authors declare no competing interests.

Ethics approval and consent to participate
The study was approved by the University Hospital Brno Ethics Committee (approvals no. 31-270420 and 12-071222), and informed consent was obtained from all participants or their legal representatives. The participants' legal representatives provided written informed consent to participate in this study.

Consent for publication
Informed consent to publish de-identified data was received from all participants and/or participants' legal representatives who participated in the study.

Additional information
Correspondence and requests for materials should be addressed to K.S. or O.S.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2024

Příloha 2

Slaba K, Noskova H, Vesela P, Tuckova J, Honzik T, Hansikova H, Kleiblova H, Stourac P, Jabandziev P, Slaby O, Prochazkova D. Novel Splicing Variant in the PMM2 Gene in a Patient With PMM2-CDG Syndrome Presenting With Pericardial Effusion: A Case Report. Front Genet. 2020;11:561054.

frontiers in Genetics

CASE REPORT
published: 07 October 2020
doi: 10.3389/fgene.2020.561054

Novel Splicing Variant in the *PMM2* Gene in a Patient With PMM2-CDG Syndrome Presenting With Pericardial Effusion: A Case Report

*Katerina Slaba[1], Hana Noskova[2], Petra Vesela[2], Jana Tuckova[1], Hana Jicinska[1], Tomas Honzik[3], Hana Hansikova[3], Petra Kleiblova[4], Petr Stourac[5], Petr Jabandziev[1,2], Ondrej Slaby[2,6] and Dagmar Prochazkova[1,7]**

[1] Department of Pediatrics, University Hospital Brno, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czechia, [2] Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czechia, [3] Department of Pediatrics and Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czechia, [4] Institute of Biology and Medical Genetics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czechia, [5] Department of Pediatric Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, University Hospital Brno, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czechia, [6] Department of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czechia, [7] Institute of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czechia

OPEN ACCESS

Edited by:
Alessio Branchini, University of Ferrara, Italy

Reviewed by:
Gerarda Cappuccio, University of Naples Federico II, Italy
Michelle M. Monasky, IRCCS Policlinico San Donato, Italy

***Correspondence:**
Dagmar Prochazkova
Prochazkova.Dagmar@fnbrno.cz

Specialty section:
This article was submitted to Genetics of Common and Rare Diseases, a section of the journal Frontiers in Genetics

Received: *11 May 2020*
Accepted: *17 September 2020*
Published: *07 October 2020*

Citation:
Slaba K, Noskova H, Vesela P, Tuckova J, Jicinska H, Honzik T, Hansikova H, Kleiblova P, Stourac P, Jabandziev P, Slaby O and Prochazkova D (2020) Novel Splicing Variant in the PMM2 Gene in a Patient With PMM2-CDG Syndrome Presenting With Pericardial Effusion: A Case Report. Front. Genet. 11:561054. doi: 10.3389/fgene.2020.561054

Congenital disorders of glycosylation (CDG) are a rapidly growing family of genetic diseases with the phosphomannomutase 2 (PMM2)-CDG being the most common form of CDG. Most of these monogenic diseases are autosomal recessive and have multi-systemic manifestations, mainly psychomotor retardation, facial dysmorphisms, characteristic distribution of the fat pads, and variable coagulation abnormalities. The association of fetal hydrops with CDG has been reported, and pericardial effusion was also rarely observed in patients with PMM2-CDG. Here we describe an infant boy with PMM2-CDG. The diagnosis was suspected based on inverted nipples, fat pads, and combined coagulopathy. However, the primary symptom was progressive pericardial effusion leading to patient death at the age of 3 months. Screening for CDG performed by the use of isoelectric focusing of serum transferrin showed a typical PMM2-CDG pattern. Exome sequencing revealed one common pathogenic variant (c.691G > A/p.Val231Met) and one novel variant (c.447 + 3dupA) in the *PMM2* gene. Both *PMM2* variants were further confirmed by Sanger sequencing in both the proband and the parents' DNA. The novel variant was predicted to result in loss of donor splice site, and the analysis at mRNA level confirmed that it leads to exon five skipping (r.348_447del) and causes premature termination of translation to the protein (p.G117Kfs*4), therefore is classified as likely pathogenic. Although there is no curative therapy for the PMM2-CDG at the moment, the other supportive care options are available to be offered. The definite diagnosis of PMM2-CDG can also assist in the process of genetic counseling, family planning, and preimplantation genetic diagnosis.

Keywords: PMM2-CDG, pericardial effusion, whole exome sequencing, novel splicing variant, phosphomannomutase 2

INTRODUCTION

Congenital disorders of glycosylation (CDG) are a genetically and clinically heterogeneous group of > 130 disorders characterized by genetic defects in the synthesis and attachment of glycoprotein and glycolipid glycans (Chang et al., 2018). The most common form of CDG is phosphomannomutase 2 (PMM2)-CDG (formerly known as CDG-Ia) (OMIM 212065), a multisystem disease with a wide range of clinical presentation and the phenotype ranging from mild adulthood form to very severe neonatal form (Peanne et al., 2018). PMM2-CDG is an autosomal recessive disorder, caused by mutations in the PMM2 gene localized on chromosome 16p13 (MIM 601785), with the prevalence ranging from 1/20,000 in Dutch populations and 1/77,000 in Estonia based on isolated reports (Schollen et al., 2000; Vals et al., 2018).

From the pathophysiological point of view, PMM2-CDG is a disorder of protein N-glycosylation characterized by genetic defects leading to deficiency/dysfunction of PMM2, the enzyme responsible for the conversion of mannose-6-phosphate into mannose-1-phosphate (Matthijs et al., 2000). Mannose-1-phosphate is a precursor of guanosine diphosphate mannose (GDP-Man) and dolichol-P-mannose (Dol-Man). Deficiency of GDP-Man and Dol-P-Man causes hypoglycosylation of numerous glycoproteins, including serum glycoproteins (lysosomal enzymes and transport proteins) and membrane glycoproteins. This results in multi-organ involvement, whereas the variability of disease severity and course are not fully understood (Altassan et al., 2019).

Here, we describe a novel splicing mutation in a case of PMM2-CDG, presented with pericardial effusion, with typical dysmorphic facial features, inverted nipples, failure to thrive, and psychomotor retardation.

CASE PRESENTATION

A Czech boy was born as a first child of unrelated parents. He was diagnosed with hemodynamically insignificant pericardial effusion in the 22nd week of pregnancy. Amniocentesis was performed with no evidence of aneuploidy. There was an aberration of unknown significance Xp22.33 × 3 and three copies of the CYP21A2 gene in combination with a pathogenic variant p.Gln319* detected hypothetically associated with congenital adrenal hyperplasia; however, the determination for 17-hydroxyprogesterone in amniotic fluid provided a negative result. Routine testing of the mother for toxoplasmosis, parvovirus B19, CMV, and HSV infections was negative. Family history was unremarkable. Labor was induced in 40 weeks of pregnancy for intrauterine growth retardation and oligohydramnios. Delivery was by forceps-assisted vaginal delivery due to fetal heart rate deceleration. A birth weight of the boy was 2390 g (z-score = −1.83), length of 48 cm, and occipital frontal circumference 34 cm. His postnatal adaptation was normal, but he was noted to be highly dysmorphic. Initially, due to swallowing difficulties nasogastric tube was used for feeding.

At the age of 4 weeks pericardial effusion further progressed and the boy was referred to our department for complex evaluation and assessment. At this time, we observed a notable psychomotor retardation, significant central hypotonia, limited spontaneous movement, poor eye contact, no reaction on noise, significant failure to thrive (with only 90 g gain in 2 weeks). Arthrogenic contractures limiting the range of joins mobility were observed mainly in knee joints, ankle joints and elbow joints. His dysmorphic features included dolichocephaly, bossing forehead, dysmorphic low set ears (**Figure 1A**), enlarged fontanelle, wider philtrum, broad nasal root, prominent nares, hypertelorism, retrognathia (**Figure 1B**), inverted nipples (**Figure 1C**), abnormal fat distribution over his thighs, buttocks and suprapubic regions (**Figure 1D,E**), pilonidal sinus and hammertoes (**Figure 1F**).

Laboratory analyses at that time revealed an altered biochemical profile with findings of hypoproteinemia, hypoalbuminemia (23.1 g/l), severe combined coagulopathy with coagulation and anti-coagulation pathways alterations (aPTT 1.86R, INR 1.3, antithrombin III 20%, Factor IX 31%, fibrinogen 1.72 g/l, severe deficiency of Factor XI 5%, D-Dimer: 1.37 mg/l, Factor VII 66% and protein C bellow 5%). Other laboratory findings included mild hepatopathy with elevated levels of AST (140.96 IU/l), ALT (77.11 IU/l) and ALP (611.45 IU/l), mild elevation of lactate dehydrogenase, creatine kinase, and TSH. Infectious disease screening was negative.

Abdominal ultrasonography showed hyperechogenicity of kidneys, mild renal pelvis dilatation, ascites and small pleural effusion. There were no laboratory signs of nephropathy. The patient underwent cardiac examination. Cardiac anatomy and function were normal; however, a chronic pericardial effusion was detected by echocardiography. Initially mild to moderate pericardial effusion slowly progressed despite the administration of the diuretic (furosemide at 1mg/kg/day). The patient showed also intermittent eyelid edema and swelling of the arms and legs. Repeated infusions of albumin and plasma substitutes always led to the improvement of clinical symptoms including partial regression of pericardial effusion and peripheral edema.

Clinical symptoms and laboratory findings led to the strong suspicion of PMM2-CDG. Screening for CDG performed by the use of isoelectric focusing of serum transferrin showed pronounced increases in disialotransferrin and asialotransferin with a corresponding reduction in tetrasialotransferrin. This pattern supports the diagnosis of PMM2-CDG.

To further confirm the genetic cause of the disease exome sequencing was performed. Library for whole-exome capture and sequencing was prepared using TruSeq Exome Kit. Prepared library was loaded onto NextSeq 500/550 Mid Output Kitv2.5 (150 cycles) and sequenced on the NextSeq 500 instrument (all Illumina, CA, United States). Sequencing coverage for exomes was > 20 × at > 90% of captured regions. The variants were filtered to include those with low frequency and a predicted effect on the protein. The frequency-filter removed variants with prevalence > 1% in GnomAD or 1000 Genomes databases. The predicted effect filter excluded synonymous and non-coding variants unless they were located within 20 bp from the end of an exon. Variants annotated in ClinVar as pathogenic/likely



FIGURE 1 | Dysmorphic features of our patient. Dolichocephaly, bossing forehead, dysmorphic low set ears **(A)**, facial dysmorphism **(B)**, bilateral inverted nipples **(C)**, abnormal fat distribution **(D,E)**, and hammertoes **(F)**.

pathogenic were retained regardless of their frequency/function. The variants found in the proband's sample that were considered to be significant to CDG were c.691G > A/p.Val231Met in the *PMM2* gene known to be disease-causing (Matthijs et al., 1997;) and classified as class 5-pathogenic accordingly to ACMG/AMG system (Richards et al., 2015) and novel variant c.447 + 3dupA in the PMM2 gene (NM_000303.2, intron 5). We did not detect any other class 5 or 4 variants in the genes for which incidental findings are reported based on the ACMG guidelines. Confirming the results of the exome sequencing, the Sanger sequencing was done in the proband and his parents. As it was expected, results confirmed both variants in the proband and showed that c.691G > A/p.Val231Met variant was inherited from father (**Figure 2A**) and c.447 + 3dupA variant from mother (**Figure 2B**), presenting the typical autosomal recessive mode of inheritance.

The c.447 + 3dupA variant causes single-nucleotide duplication of the third intronic nucleotide after exon 5. Three different bioinformatic tools (MaxEntScan, NNSPLICE, and SpliceSiteFinder) integrated in the Alamut Visual 2.11 software predict a loss of donor splice site (Interactive Biosoftware, France) with confidence 75%. To confirm the impact of this variant to the mRNA splicing process, we have performed RNA sequencing. Total RNA from peripheral leukocytes was used to prepare the sequencing library with NEBNext Ultra II Directional Library Prep Kit (New England Biolabs, MA, United States). The library was loaded onto NextSeq 500/550 High Output Kit (75 cycles) and sequenced on the NextSeq 500 instrument (both – Illumina, CA, United States). The results of RNA sequencing were visualized by the IGV software[1] using Sashimi plots for individual exon–exon splicing events present in the transcript. We have confirmed that c. 447 + 3dupA variant causes a loss of donor splice site, leads to exon five skipping (r.348_447del100), and causes premature termination of translation and protein truncation (p.G117Kfs*4; **Figure 2C,D**), and therefore, it can be classified as a class 4—likely pathogenic.

The diagnosis of PMM2-CDG was confirmed by clinical, biochemical, and genetic findings.

At the age of 3 months, the patient was admitted to the intensive care unit for low food intake and clinical deterioration. He presented significant failure to thrive with weight being 3060 g (below 0.1 percentile, SD −5.15), length of 52 cm (below 0.1 percentile, SD −5.31), and fronto-occipital circumference 38.5 cm (below 0.1 percentile, SD −3.93). The child showed tachypnea and dyspnea becoming worse with feeding. Pericardial effusion further progressed (**Figure 3**) and finally required pericardiocentesis. Pericardial fluid was considered to be a transudate and serosanguineous. The patient was clinically deteriorating, respiratory and circulatory failure progressed. Despite all efforts, the patient died due to obstructive cardiogenic shock at the age of 3 months.

[1]http://software.broadinstitute.org/software/igv/

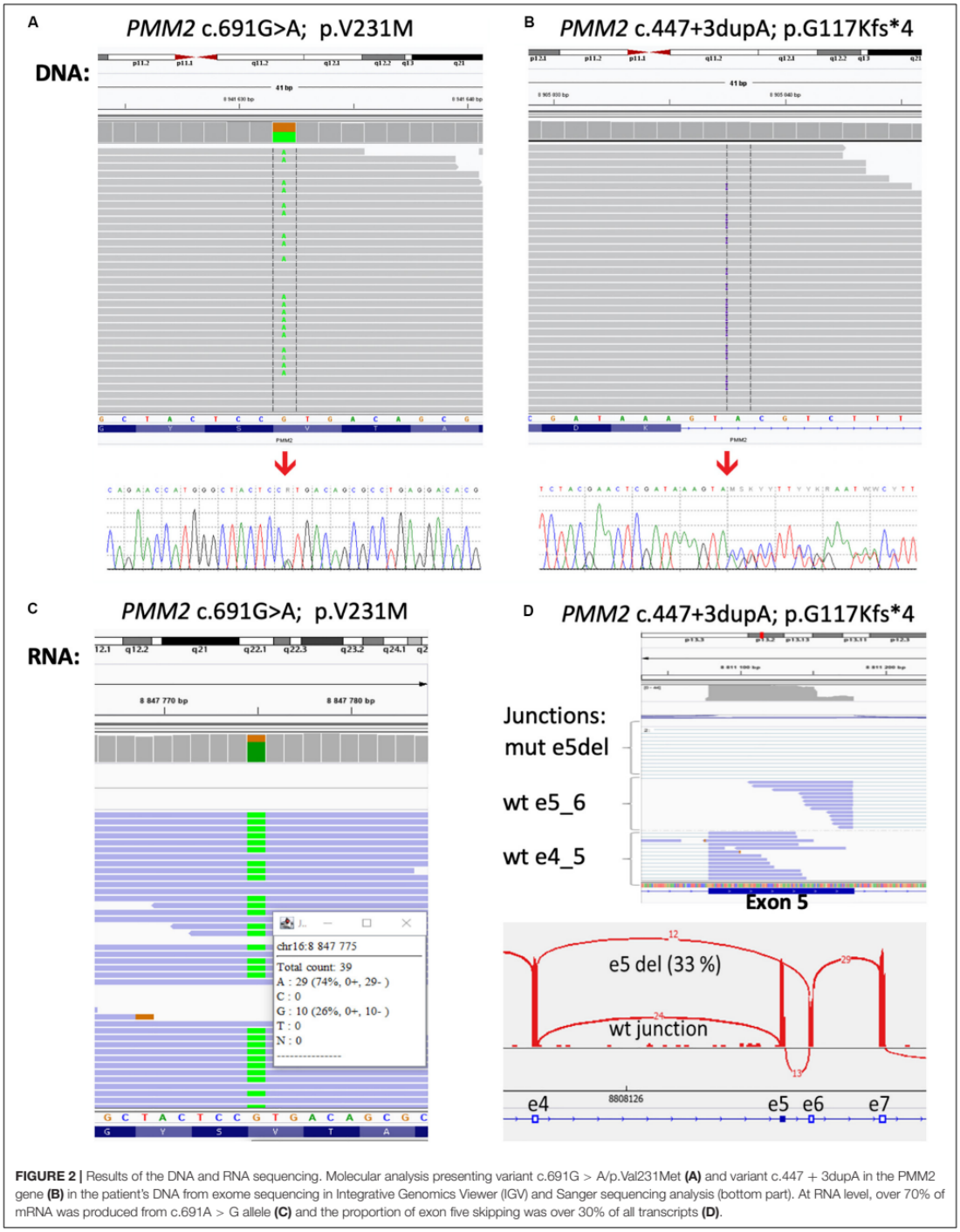


FIGURE 2 | Results of the DNA and RNA sequencing. Molecular analysis presenting variant c.691G > A/p.Val231Met **(A)** and variant c.447 + 3dupA in the PMM2 gene **(B)** in the patient's DNA from exome sequencing in Integrative Genomics Viewer (IGV) and Sanger sequencing analysis (bottom part). At RNA level, over 70% of mRNA was produced from c.691A > G allele **(C)** and the proportion of exon five skipping was over 30% of all transcripts **(D)**.



FIGURE 3 | Transthoracic echocardiogram (4-chamber view) showing a large pericardial effusion in our patient.

DISCUSSION

High clinical heterogeneity of various CDG types, and even within one particular CDG type, is considered to be the main reason behind underdiagnosis or late diagnosis of this disease (Giurgea et al., 2005). Alterations in glycosylation patterns are usually determined by isoelectric focusing of serum transferrin and apolipoprotein C III. The analytical performance of the isoelectric focusing of serum transferrin, which is a biomarker of N-glycosylation, is not satisfactory with only 60% of CDG cases being accurately found to be positive. Further, this test cannot reliably identify the subtype of CDG, and not all types can be detected by this approach (Altassan et al., 2019). A similar test to help diagnose O-linked disorders and combined N- and O-glycosylation CDGs is performed on apolipoprotein-CIII which has a single O-linked glycan which only captures abnormalities of core-1mucin type O-glycosylation. The diagnosis of PMM2-CDG can then be confirmed by measurement of PMM2 activity in either peripheral blood leukocytes or cultured skin fibroblasts (Francisco et al., 2019). The majority of PMM2-CDG patients have residual PMM2 activity below 10%, whereas in their asymptomatic parents the enzyme activity is about 50% (Francisco et al., 2019).

The variants found in the patient DNA by exome sequencing and confirmed by Sanger sequencing were a common variant c.691G > A/p.Val231Met (Altassan et al., 2019) and a novel variant c.447 + 3dupA in the *PMM2* gene. The novel mutation, inherited from mother, causes single-nucleotide duplication of the third intronic nucleotide after exon 5 and is predicted to result in loss of donor splice site indicating a novel splicing variant of the *PMM2* gene. Although three predictive algorithms predict the role of this novel variant in splicing, it has to be further experimentally confirmed to have predicted impact on the *PMM2* transcript splicing.

The variant p.Val231Met, despite being the second most frequent mutation in the *PMM2* gene with a prevalence of 10%, has only been reported so far as a compound heterozygote (Altassan et al., 2019) as in our case, where this allele was inherited from father. V231 is in the interior of the core domain, and a mutation in this residue is detrimental to its native protein structure (Silvaggi et al., 2006; Citro et al., 2018). The folding and stability defect of the Val231Met allele contributes to its reported reduced *in vitro* enzymatic activity of 38.5% (Kjaergaard et al., 1999).

Most of the PMM2-CDG patients are born with hypotonia, craniofacial dysmorphisms, and strabismus. Common are inverted nipples and a characteristic distribution of the fat pads especially in the gluteal and suprapubic regions and thighs. Clinical spectrum of PMM2-CDG further includes psychomotor retardation and mild to severe intellectual disability. PMM2-CDG patients typically show different degrees of cerebellar atrophy on MRI, mostly vermian atrophy (Serrano et al., 2015). In our patient, MRI was not feasible due to clinical deterioration. Cerebellar atrophy was not confirmed post-mortem, because

parents declined an autopsy. In the small percentage of the patients, there is a prenatal generalized edema and abnormal accumulation of fluid in two or more fetal compartments, hydrops fetalis, or accumulation of fluid in one specific compartment as in our patient with prenatal pericardial effusion.

Up to 15% of non-immune hydrops fetalis cases may be due to inborn errors of metabolism, and a large proportion of cases linked to metabolic disorders remains undiagnosed. The pathophysiology of fetal hydrops, edema, and pericardial effusions in inherited metabolic diseases is not fully understood. The fluid accumulation is due to an unbalanced interstitial fluid production and lymphatic return. The etiology of these symptoms in CDG appears to be multifactorial, frequently occurring due to a decreased plasma albumin concentration secondary to enteral and renal protein loss and a decreased synthetic function of the liver (Truin et al., 2008). There are additional factors leading to fluid leakage to pericardial and peritoneal spaces. Focal mixed inflammatory changes with mesothelial proliferation and a damaged pericardial protein barrier have been suggested in PMM2-CDG patients previously (Kristiansson et al., 1998). Truin et al. (2008) described three patients with severe *PMM2* mutations, who developed life-threatening accumulation of pericardial and abdominal fluids. In two cases this severe extravascular fluid accumulation progressed to decompensation and death.

Abnormal glycosylation of cell surface proteins in PMM2-CDG patients may result in disequilibrium of normal fluid balance and protein transport through the pericardial and peritoneal membranes and may cause life-threatening complications (Isikay et al., 2014).

CONCLUSION

In this case report, the patient's non-specific but uncommon findings of pericardial effusion, inverted nipples, fat pads, and combined coagulopathy pointed us toward an early clinical suspicion of a PMM2-CDG disease. Consequent targeted biochemical analysis and genetic findings led to the confirmation of the PMM2-CDG. We identified one common pathogenic variant and one novel variant predicted to result in loss of donor splice site, leading to exon five skipping and causing premature termination of translation to the protein. There is no curative therapy for the PMM2-CDG at the moment, but other supportive care options were available to be offered. The definite diagnosis of PMM2-CDG can also assist in the process of genetic counseling, family planning, and preimplantation genetic diagnosis.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The study was reviewed and approved by the Ethics Committee of University Hospital Brno. Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian. Written informed consent was obtained from the minor(s)' legal guardian/next of kin for the publication of any potentially identifiable images or data included in this article.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

KS, OS, and DP designed the study and drafted the manuscript. HN, PV, PK, and OS performed the genetic analysis and evaluation of variants. KS, JT, DP, TH, PS, HJ, and PJ conducted the clinical evaluations. HH and TH performed the biochemical analysis. All authors approved the final manuscript.

FUNDING

This work was supported by the Ministry of Health, Czech Republic, Conceptual Development of Research Organization (FNBr, 65269705). TH and HH were supported by the Ministry of Health of the Czech Republic (MZ CR-RVO VFN64165). This study was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic by the Czech Health Research Council (Project No. NV18-03-00024).

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the CF Genomics of CEITEC supported by the NCMG research infrastructure (LM2015091 funded by MEYS CR) for their support with obtaining scientific data presented in this article.

REFERENCES

Altassan, R., Peanne, R., Jaeken, J., Barone, R., Bidet, M., Borgel, D., et al. (2019). International clinical guidelines for the management of phosphomannomutase 2-congenital disorders of glycosylation: diagnosis, treatment and follow up. *J. Inherit. Metab. Dis.* 42, 5–28. doi: 10.1002/jimd.12024

Chang, I. J., He, M., and Lam, C. T. (2018). Congenital disorders of glycosylation. *Ann. Transl. Med.* 6, 477.

Citro, V., Cimmaruta, C., Monticelli, M., Riccio, G., Hay Mele, B., Cubellis, M. V., et al. (2018). The analysis of variants in the general population reveals that PMM2 is extremely tolerant to missense mutations and that diagnosis of PMM2-CDG can benefit from the identification of modifiers. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2218. doi: 10.3390/ijms19082218

Francisco, R., Marques-da-Silva, D., Brasil, S., Pascoal, C., Dos Reis Ferreira, V., Morava, E., et al. (2019). The challenge of CDG diagnosis. *Mol. Genet. Metab.* 126, 1–5. doi: 10.1016/j.ymgme.2018.11.003

Giurgea, I., Michel, A., Le Merrer, M., Seta, N., and de Lonlay, P. (2005). Underdiagnosis of mild congenital disorders of glycosylation type Ia. *Pediatr. Neurol.* 32, 121–123. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2004.06.021

Isikay, S., Baspinar, O., and Yilmaz, K. (2014). A case of congenital disorder of glycosylation ia presented with recurrent pericardial effusion. *Iran. J. Pediatr.* 24, 652–654.

Kjaergaard, S., Skovby, F., and Schwartz, M. (1999). Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1A: expression and characterisation of wild type and mutant PMM2 in E. coli. *Eur. J. Hum. Genet.* 7, 884–888. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200398

Kristiansson, B., Stibler, H., Conradi, N., Eriksson, B. O., and Ryd, W. (1998). The heart and pericardial effusions in CDGS-I (carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I). *J. Inherit. Metab. Dis.* 21, 112–124. doi: 10.1023/a:1005387408009

Matthijs, G., Schollen, E., Pardon, E., Veiga-Da-Cunha, M., Jaeken, J., Cassiman, J. J., et al. (1997). Mutations in PMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate-deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome). *Nat. Genet.* 16, 88–92. doi: 10.1038/ng0597-88

Matthijs, G., Schollen, E., Bjursell, C., Erlandson, A., Freeze, H., Imtiaz, F., et al. (2000). Mutations in PMM2 that cause congenital disorders of glycosylation, type Ia (CDG-Ia). *Hum. Mutat.* 16, 386–394. doi: 10.1002/1098-1004(200011)16:5<386::aid-humu2>3.0.co;2-y

Peanne, R., de Lonlay, P., Foulquier, F., Kornak, U., Lefeber, D. J., Morava, E., et al. (2018). Congenital disorders of glycosylation (CDG): quo vadis? *Eur. J. Med. Genet.* 61, 643–663. doi: 10.1016/j.ejmg.2017.10.012

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., 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. *Genet. Med.* 17, 405–424. doi: 10.1038/gim.2015.30

Schollen, E., Kjaergaard, S., Legius, E., Schwartz, M., and Matthijs, G. (2000). Lack of Hardy-Weinberg equilibrium for the most prevalent PMM2 mutation in CDG-Ia (congenital disorders of glycosylation type Ia). *Eur. J. Hum. Genet.* 8, 367–371. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200470

Serrano, M., de Diego, V., Muchart, J., Cuadras, D., Felipe, A., Macaya, A., et al. (2015). Phosphomannomutase deficiency (PMM2-CDG): ataxia and cerebellar assessment. *Orphanet J. Rare Dis.* 10, 138.

Silvaggi, N. R., Zhang, C., Lu, Z., Dai, J., Dunaway-Mariano, D., and Allen, K. N. (2006). The X-ray crystal structures of human alpha-phosphomannomutase 1 reveal the structural basis of congenital disorder of glycosylation type 1a. *J. Biol. Chem.* 281, 14918–14926. doi: 10.1074/jbc.m601505200

Truin, G., Guillard, M., Lefeber, D. J., Sykut-Cegielska, J., Adamowicz, M., Hoppenreijs, E., et al. (2008). Pericardial and abdominal fluid accumulation in congenital disorder of glycosylation type Ia. *Mol. Genet. Metab.* 94, 481–484. doi: 10.1016/j.ymgme.2008.05.005

Vals, M. A., Pajusalu, S., Kals, M., Magi, R., and Ounap, K. (2018). The prevalence of PMM2 CDG in estonia based on population carrier frequencies and diagnosed patients. *JIMD Rep.* 39, 13–17. doi: 10.1007/8904_2017_41

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Slaba, Noskova, Vesela, Tuckova, Jicinska, Honzik, Hansikova, Kleiblova, Stourac, Jabandziev, Slaby and Prochazkova. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Příloha 3

Slabá K, Pálová H, Veselá P, Aulická Š, Konečná P, Štěrba M, Jabandžiev P, Slabý O, Procházková D. Neurovývojová porucha s mentální retardací spojená s genem PPP2R5D — první případ v České republice. Cesk Slov Neurol N. 2021;117(2):205–207.

proLékaře.cz | 15.8.2026

doi: 10.48095/cccsnn2021205

Neurovývojová porucha s mentální retardací spojená s genem *PPP2R5D* – první případ v České republice

PPP2R5D-related intellectual disability and neurodevelopmental delay – the first case in the Czech Republic

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.
The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

K. Slabá[1], H. Pálová[2], P. Veselá[2], Š. Aulická[2,3], P. Konečná[1], M. Štěrba[1], P. Jabandžiev[1,2], O. Slabý[2,4], D. Procházková[1,5]

[1] Pediatrická klinika, LF MU a FN Brno
[2] CEITEC, MU, Brno
[3] Klinika dětské neurologie, LF MU a FN Brno
[4] Biologický ústav, LF MU, Brno
[5] Ústav lékařské genetiky a genomiky, LF MU a FN Brno

✉
doc. MUDr. Dagmar Procházková, Ph.D.
Pediatrická klinika
LF MU a FN Brno
Černopolní 9
625 00 Brno
e-mail:
prochazkova.dagmar@fnbrno.cz

Přijato k recenzi: 9. 1. 2021
Přijato do tisku: 25. 2. 2021

Vážená redakce,
diferenciální diagnostika opožděného psychického a motorického vývoje u dětí je velmi široká a náročná. Příčinami psychomotorické retardace mohou být perinatální asfyxie vyúsťující do hypoxické encefalopatie, endokrinní poruchy, poruchy výživy, dědičné poruchy metabolizmu či degenerativní poruchy CNS a v neposlední řadě také řada genetických syndromů. Diferenciální diagnostika u genetických syndromů je často velmi obtížná vzhledem ke skutečnostem, že řada onemocnění s postižením intelektu nemá vždy specifický fenotyp a pro přesnou diagnózu je nezbytné genetické laboratorní testování. Naše pacientka byla vzhledem k neobjasněné příčině psychomotorické retardace a již vyčerpaným diagnostickým možnostem zařazena do studie k provedení celoexomového sekvenování. Teprve díky této komplexní genetické analýze se podařilo nalézt kauzální mutaci v genu *PPP2R5D* (*PPP2R5D*-related intellectual disability and neurodevelopmental delay, MIM 601646) a stanovit diagnózu. V současnosti je celosvětově popsáno přibližně 100 pacientů s tímto onemocněním [1]. V naší kazuistice představujeme první pacientku s touto diagnózou v ČR.

Dnes již 27letá žena se narodila v termínu jako eutrofický novorozenec. V 7. měsíci těhotenství byla matce provedena cerkláž děložního hrdla. Po porodu byla pro zkalenou plodovou vodu novorozenci nasazena antibiotická léčba. Rodinná anamnéza nevykazovala žádné pozoruhodnosti. Má jednoho staršího, nevlastního, zdravého sourozence. Od prvního týdne po narození byla sledována pro centrální hypotonický syndrom a novorozenecké křeče s dosažením plné kompenzace v 6 týdnech věku. Vzhledem k opakovanému výskytu hypoglykémie v kojeneckém věku bylo pomýšleno na dědičnou poruchu metabolizmu, avšak opakovaná biochemická, hematologická i specifická laboratorní vyšetření byla bez významných patologických nálezů. Na CT mozku byla v kojeneckém věku popsána lehká atrofie mozku, pozdější vyšetření MR tento nález nepotvrdilo. U pacientky byla



Obr. 1. Fotografie pacientky ve 4 měsících a v 8 letech věku poskytnuté jejími rodiči. Patrná kraniofaciální dysmorfie: makrocefalie, prominující čelo, hypertelorismus, nízce posazené uši, strabismus.

Fig. 1. Photographs of the patient taken when she was 4 months and 8 years old provided by her parents. Craniofacial dysmorphic features include macrocephaly, bossing forehead, hypertelorism, low set ears and strabism.

neurologie.cz | 15.8.2026



Obr. 2. Výsledky sekvenačních analýz. (A) Celoexomové sekvenování DNA pacientky ukazující patogenní variantu c.592G>A/p.E198K v genu *PPP2R5D* v programu Integrative Genomics Viewer (Broad Institute and the Regents of the University of California, USA). (B) Část sekvence genu *PPP2R5D* s heterozygotní variantou c.592G>A/p.E198K potvrzená u pacientky Sangerovým sekvenováním.

Fig. 2. Results of the sequencing analysis. (A) Exome sequencing of the patient's DNA presenting pathogenic variant c.592G>A/p.E198K in the *PPP2R5D* gene visualized using the Integrative Genomics Viewer software (Broad Institute and the Regents of the University of California, USA). (B) Part of the *PPP2R5D* gene sequence showing heterozygous variant c.592G>A/p.E198K confirmed in the patient by Sanger sequencing.

od novorozeneckého věku pozorována kraniofaciální dysmorfie – široké vysoké čelo, prominence frontálních hrbolů, makrocefalie, hypertelorizmus, strabizmus, nízce posazené uši a gotické patro (obr. 1). Byla sledována na ortopedii pro hyperkyfózu hrudní páteře a pedes planovalgi. Psychomotorický vývoj byl od počátku velmi zpomalený. I přes intenzivní rehabilitační péči byla schopna samostatné chůze až ve 3 letech věku. Stagnovaly mentální vývoj i vývoj řeči. Dle psychologického vyšetření v dospělém věku se výše intelektu pacientky pohybuje v pásmu těžké až hluboké mentální retardace (IQ < 35), pacientka není schopna verbální ani neverbální komunikace. Je zcela nesoběstačná a závislá na péči své matky. Od časné dospělosti rodiče pozorují prvky agresivního chování, poruchu spánku, bruxizmus a známky sociální fobie, např. obavu z doteku cizích lidí. Antropometrické parametry naší probandky byly v dětství v normě, finální výška postavy činí 163 cm, index tělesné hmotnosti 25,21, tj. je na hranici nadváhy. Vzhledem k neob-

onkáčka.cz | 15.8.2026

jasněné příčině psychomotorické retardace byla pacientka zařazena do studie k provedení celoexomového sekvenování.

DNA pacientky byla izolována z periferní krve. Celoexomové sekvenování (Truseq Exome kit) bylo provedeno na plaftormě NextSeq 500 s využitím NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 cycles) (vše Illumina, CA, USA). Minimálně 90 % cílových oblastí vykazovalo alespoň dvacetinásobné pokrytí. Identifikovali jsme heterozygotní variantu c.592G>A/p.E198K v genu *PPP2R5D* (obr. 2A). Tato varianta byla již dříve popsána jako patogenní (třída 5) a způsobující neurovývojovou poruchu asociovanou s genem *PPP2RD5*, některými autory označovanou jako Jordanin syndrom (MIM 616355) [1,2]. U DNA pacientky a DNA jejích rodičů byla následně provedena přímá DNA analýza kodonu 198 exonu 5 genu *PPP2R5D* – polymerárová řetězová reakce následovaná Sangerovým sekvenováním (obr. 2B). V DNA ani jednoho z rodičů se patogenní varianta nevyskytovala. U pacientky byl potvrzen výskyt *de novo* varianty c.592G>A/p.E198K v genu *PPP2R5D* v heterozygotním stavu. Tento nález umožnil stanovení diagnózy.

Neurovývojová porucha s mentální retardací spojená s genem *PPP2R5D* je onemocnění s autozomálně dominantním typem dědičnosti vznikající na základě zárodečných *de novo* mutací v genu *PPP2R5D* a ovlivňující prenatální i postnatální vývoj CNS [3]. Některými autory je onemocnění nazýváno podle první diagnostikované pacientky Jordan Margaret Langové jako Jordanin syndrom (Jordan's syndrome) [2]. Klinické příznaky zahrnují mentální retardaci různého stupně, centrální hypotonii, opoždění vývoje řeči a motorických dovedností. Vyskytovat se také mohou poruchy autistického spektra charakterizované zhoršenou komunikační zdatností a sociální interakcí [4]. Téměř 50 % pacientů trpí epileptickými záchvaty. Dále jsou u pacientů popisovány skeletální malformace, vývojové vady srdce a onemocnění očního aparátu. Typický je také nadměrný růst (overgrowth syndrome) a dysmorfické rysy – makrocefalie, hypertelorizmus, prominující čelo [5].

Gen *PPP2R5D* leží na chromozomu 6 a kóduje protein PPP2R5D složený z 602 amikokyselin, známý jako delta podjednotka B56 (B56δ), která je izoformou podjednotky B56 serintreoninové proteinfosfatázy 2A (PPA2). PPA2 je jedna ze čtyř hlavních serintreoninových fosfatáz a je zapojena do negativní kontroly buněčného růstu a dělení. Protein je tvořen společným heteromerním jaderným enzymem, který je složen z katalytické podjednotky a konstantní regulační podjednotky interagující s řadou regulačních podjednotek. Protein B56δ se nachází především v centrální nervové soustavě, kde hraje klíčovou roli při vývoji neuronů a regulaci neuronální signalizace [6]. Předpokládá se, že patogenní varianty genu *PPP2R5D* vedou ke tvorbě pozměněného proteinu B56δ, a tím snižují aktivitu PP2A. Abnormální aktivita PPA2 narušuje signální dráhy v neuronech a ovlivňuje jejich normální vývoj a funkci.

Varianta c.592G>A/p.E198K v genu *PPP2R5D* (NM_006245.3, exon 5) je opakovaně popsána v databázích HGMD (CM153575) a ClinVar (RCV000202079.2) jako patogenní ve vztahu k vývojovým poruchám. Primárně byla popsána Fitzgeraldem et al v roce 2015 [7] a patogenita varianty byla potvrzena řadou dalších autorů, kteří ji popsali ve spojitosti s charakteristickými fenotypovými projevy (autizmus, overgrowth syndrome, opoždění řeči, hypotonie aj.) [1,3,8]. Prevalence tohoto onemocnění není zatím známá. Lze ji odhadnout ze studie Shanga et al, kteří identifikovali patogenní varianty v genu *PPP2R5D* pomocí celoexomového sekvenování u celkem 7 z 2 790 jedinců s neurovývojovou retardací, což v tomto případě činí 0,25 % [8].

Až u 50–75 % případů psychomotorické retardace se ani přes pokročilé diagnostické možnosti etiologie na individuální úrovni nepodaří objasnit [9]. U naší pacientky jsme stanovili diagnózu díky lepší dostupnosti necílených genomických metod, jako je celoexomové sekvenování. V současné době není u popsaného syndromu k dispozici žádná kauzální terapie. Stejně jako u jiných monogenně podmíněných chorob jsou však studovány možnosti genové terapie, která je do budoucna jedinou možnou kauzální léčbou [10].

Grantová podpora

Podpořeno MZ ČR – RVO (FNBr, 65269705).

Konflikt zájmů

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádný konflikt zájmů.

Literatura

1. Biswas D, Cary W, Nolta JA. *PPP2R5D*-related intellectual disability and neurodevelopmental delay: a review of the current understanding of the genetics and biochemical basis of the disorder. Int J Mol Sci 2020; 21(4): 1286. doi: 10.3390/ijms21041286.

2. Jordan's Guardian Angels. [online]. Available from URL: https://jordansguardianangels.org/the-history-of-jordans-syndrome/.

3. Reynhout S, Jansen S, Haesen D et al. De novo mutations affecting the catalytic Ca subunit of PP2A, PPP2CA, cause syndromic intellectual disability resembling other PP2A-related neurodevelopmental disorders. Am J Hum Genet 2019; 104(1): 139–156. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.12.002.

4. Houge G, Haesen D, Vissers LE et al. B56d-related protein phosphatase 2A dysfunction identified in patients with intellectual disability. J Clin Invest 2015; 125(8): 3051–3062. doi: 10.1172/JCI79860.

5. Loveday C, Tatton-Brown K, Clarke M et al. Mutations in the PP2A regulatory subunit B family genes *PPP2R5B*, *PPP2R5C* and *PPP2R5D* cause human overgrowth. Hum Mol Genet 2015; 24(17): 4775–4779. doi: 10.1093/hmg/ddv182.

6. Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. Biochem J 2001; 353(Pt 3): 417–439. doi: 10.1042/0264-6021:3530417.

7. Shang L, Henderson LB, Cho MT et al. De novo missense variants in *PPP2R5D* are associated with intellectual disability, macrocephaly, hypotonia, and autism. Neurogenetics 2016; 17(1): 43–49. doi: 10.1007/s10048-015-0466-9.

8. Fitzgerald TW, Gerety SS, Jones WD et al. Deciphering Developmental Disorders Study. Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. Nature 2015; 519(7542): 223–228. doi: 10.1038/nature14135.

9. Hladíková A, Grečmalová D, Černá D et al. Nové možnosti diagnostiky příčin mentální retardace u dětí. Pediatr praxi 2011; 12(6): 380–384.

10. Ilyas M, Mir A, Efthymiou S et al. The genetics of intellectual disability: advancing technology and gene editing. F1000Res 2020; 9: 22. doi: 10.12688/f1000research.16315.1.

Příloha 4

Slaba K, Jezova M, Pokorna P, Palova H, Tuckova J, Papez J, Prochazkova D, Jabandziev P, Slaby O. Two sisters with cardiac-urogenital syndrome secondary to pathogenic splicing variant in the MYRF gene with unaffected parents: A case of gonadal mosaicism? Mol Genet Genomic Med. 2023;11(5):e2139.

Check for updates

Received: 12 October 2022 | Revised: 16 December 2022 | Accepted: 10 January 2023

DOI: 10.1002/mgg3.2139

Molecular Genetics & Genomic Medicine Open Access WILEY

CLINICAL REPORT

Two sisters with cardiac-urogenital syndrome secondary to pathogenic splicing variant in the *MYRF* gene with unaffected parents: A case of gonadal mosaicism?

Katerina Slaba[1] | **Marta Jezova**[2] | **Petra Pokorna**[3] | **Hana Palova**[3] | **Jana Tuckova**[1] | **Jan Papez**[1] | **Dagmar Prochazkova**[1,4] | **Petr Jabandziev**[1,2] | **Ondrej Slaby**[3,5]

[1]Department of Pediatrics, University Hospital Brno, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

[2]Department of Pathology, University Hospital Brno, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

[3]Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

[4]Institute of Medical Genetics and Genomics, University Hospital Brno, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

[5]Department of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Correspondence
Ondrej Slaby, Department of Biology, Faculty of Medicine, Central European Institute of Technology (CEITEC), Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic.
Email: oslaby@med.muni.cz

Funding information
Ministry of Health, Czech Republic, Conceptual Development of Research Organization, Grant/Award Number: 65269705; National Institute for Cancer Research, Grant/Award Number: Programme EXCELES, ID Project No. LX22NPO5102; European Union—Next Generation EU

Abstract

Background: Cardiac-urogenital syndrome [MIM # 618280] is a newly described very rare syndrome associated with pathogenic variants in the myelin regulatory factor (*MYRF*) gene that leads to loss of protein function. MYRF is a transcription factor previously associated only with the control of myelin-related gene expression. However, it is also highly expressed in other tissues and associated with various organ anomalies. The clinical picture is primarily dominated by complex congenital cardiac developmental defects, pulmonary hypoplasia, congenital diaphragmatic hernia, and urogenital malformations.

Case Presentation: We present case reports of two siblings of unrelated parents in whom whole-exome sequencing was indicated due to familial occurrence of extensive developmental defects. A new, previously undescribed splicing pathogenic variant c.1388+2T>G in the *MYRF* gene has been identified in both patients. Both parents are unaffected, tested negative, and have another healthy daughter. The identical de novo event in siblings suggests gonadal mosaicism, which can mimic recessive inheritance.

Conclusions: To our knowledge, this is the first published case of familial cardiac-urogenital syndrome indicating gonadal mosaicism.

KEYWORDS

cardiac-urogenital syndrome, familiar occurrence, *MYRF* gene, Scimitar syndrome, whole-exome sequencing

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
© 2023 The Authors. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* published by Wiley Periodicals LLC.

1 | BACKGROUND

Cardiac-urogenital syndrome [MIM # 618280] is a rare disease with autosomal dominant inheritance caused by pathogenic variants in the *MYRF* gene that lead to loss of protein function. Together with encephalitis/encephalopathy (MIM # 608329) (Kurahashi et al., 2018), these are the only syndromes in the MIM database associated with MYRF deficiency. It is mainly characterized by complex congenital heart defects, pulmonary hypoplasia, congenital diaphragmatic hernia, and urogenital malformations (Pinz et al., 2018). However, clinical manifestations can be highly variable with varying degrees of severity. To date, more than 30 cases of MYRF deficiency have been described in the literature, but many more patients with similar phenotypic manifestations, including clinically fully expressed cardiac-urogenital syndrome, have been presented without an established diagnosis by *MYRF* genetic testing (Gupta et al., 2022; Pinz et al., 2018; Qi et al., 2018; Rossetti et al., 2019). So far, no case of familial occurrence associated with gonadal mosaicism has been described.

Haploinsufficiency of the *MYRF* gene is associated with developmental heart defects in up to 94% of patients (Rossetti et al., 2019). The cardiac findings most often included hypoplasia of the left heart (in 44% of patients), infantile Scimitar syndrome with partial or even total anomalous return of the pulmonary veins (31%) (Dupuis et al., 1993; Wang et al., 2018), as well as Fallot's tetralogy, dysplasia or aplasia of the heart valves (aortic, mitral, and tricuspid), and ventricular and atrial septal defect in some patients.

Urogenital anomalies are the second most common structural congenital disability seen in MYRF-deficient individuals, with approximately 75% affected individuals. Cryptorchidism, micropenis, hypospadias, persistent urachus, and Swyer syndrome have been described in one case (Rossetti et al., 2019). One patient was missing internal genitalia and had a blindly ending vagina (Qi et al., 2018). Approximately two-thirds of the patients had a diaphragmatic hernia (63%), which led to hepatopulmonary fusion in some patients. Hypoplasia of the right lung has been described in approximately 44% of patients (Rossetti et al., 2019). Other anomalies observed include intestinal malrotation, Meckel's diverticulum, splenic cleft, thymic involution, and thyroid fibrosis (Chitayat et al., 2018; Pinz et al., 2018).

In our report, we present two patients (sisters) who were referred for genetic examination and whole-exome sequencing (WES) due to the extensive multiple developmental defects of the heart, lungs, and diaphragm; the second patient also had a developmental defect of the urogenital system.

2 | CASE 1

Family history has been unremarkable so far. The elder of the sisters was born in 2016 to unrelated healthy parents from the first pregnancy, monitored from 27 weeks due to ventricular septal defect, right ventricular hypertrophy, and greater cardiothoracic ratio. Delivery was at 38 weeks gestation after premature amniotic fluid outflow; birth weight was 2700 g (4th percentile) and length was 50 cm (5th percentile). Postpartum adaptation was difficult, developing tachydyspnoea with hyposaturation at around 90%. Slight craniofacial dysmorphism was described—low-set, backward rotated auricles, markedly wide neck.

The chest X-ray described a right hemithorax opacification and an undifferentiated right diaphragm. Chest ultrasound revealed relaxation of the right diaphragm with eventration of the liver into the chest, subsequently confirmed by a chest and epigastrium CT scan.

Furthermore, the CT scan described abnormal bronchial branching, hypoplasia of the right lung and partial anomalous pulmonary venous drainage on the right, marked dilatation of the right atrium, and a more spacious right ventricle.

On the day of birth, surgery was performed under general anesthesia—plication of the right and then the left half of the diaphragm. According to the echocardiographic examination, high diaphragm on the right side, right-sided pulmonary veins converging to the inferior vena cava at the level of the diaphragm, dilatation of the right-sided compartments, and severe pulmonary hypertension with hypoplasia of the right lung and diaphragmatic bilateral dysfunction/paresis (surgical plication performed) were present, tricuspid regurgitation with a large pressure gradient, perimembranous ventricular septal defect of 7 mm, small foramen ovale, patent ductus arteriosus, and predominant left-to-right shunt. The patient was referred to the Department of Cardiosurgery for evaluation of the findings. At 11 weeks of age, catheterization closure, two aortopulmonary collaterals from the truncus coeliacus, and abdominal aorta to the right lung were performed. More extensive cardiac surgery was contraindicated because of marked pulmonary hypertension. She died of heart failure at 12 weeks of age.

Autopsy findings (summarized in Table 1) included dextroposition of the heart, partial anomalous return of the right pulmonary veins into the vena cava inferior, perimembranous ventricular septal defect, and a large atrial septal defect as well as, persistent ductus arteriosus, hypoplasia of the right-sided arteria pulmonalis, and hypoplasia of the right lung (Figure 1a). Hypertrophy of the right heart corresponded to clinically described pulmonary hypertension, the manifestations of which were also detected microscopically (grade 2 according to Heath-Edwards). The lungs were bilateral unilobar. A rare rhabdomyomatous dysplasia

23249269, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mgg3.2139 by Cochrane Czech Republic, Wiley Online Library on [15/08/2026]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

TABLE 1 Summary of autopsy findings

Autopsy findings	Case 1 *2016 3 months	Case 2 *2020 10 days
Right pulmonary veins	Anomalous drainage to inferior vena cava, above the diaphragm (partial coil embolization performed)	Anomalous drainage—intrahepatic
Right lung	Hypoplasia (21 g) Rhabdomyomatous dysplasia	Extreme hypoplasia (8 g) Hepatopulmonary fusion
Left lung	Unilobar (45 g)	Unilobar (25 g)
Right main pulmonary artery	Hypoplasia	Agenesis
Aortopulmonary collaterals	Branches from thoracic aorta and abdominal aorta/coeliac trunk (coil embolization)	Branches from thoracic aorta
Heart position in the chest	Dextroposition	Dextroposition
Heart defect	PDA Large ASD VSD	Aortic coarctation Hypoplastic aorta Small/stiff left ventricle Small ASD PDA
Right ventricle	Hypertrophy (pulmonary hypertension grade II Heath-Edwards)	Hypertrophy
Diaphragm	Bilateral dysfunction/paresis (surgical plication performed)	Right eventration
Urogenital system	—	Double uterus and vagina Hypoplastic ovaries Splenogonadal fusion (discontinuous type)
Other	Meckel's diverticulum Accessory spleen	

Abbreviations: ASD, atrial septal defect; PDA, patent ductus arteriosus; VSD, ventricular septal defect.

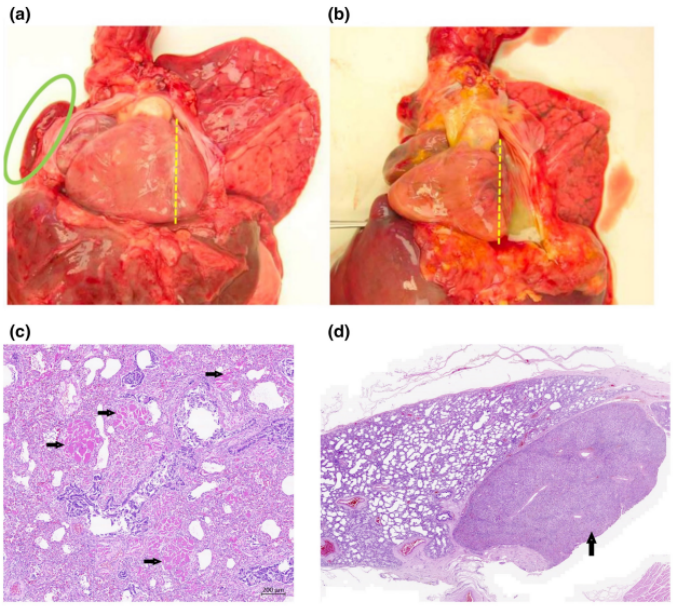


FIGURE 1 Heart and lung and histological findings. Dextroposition, right lung hypoplasia, and right ventricular hypertrophy were observed in both cases (a) Case 1 and (b) Case 2, indicated by circular and line markers). (c) Rhabdomyomatous dysplasia of the lung observed in Case 1 (indicated by arrows). (d) Hepatopulmonary fusion observed in Case 2 (indicated by arrow).

23249269, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mgg3.2139 by Cochrane Czech Republic, Wiley Online Library on [15/08/2026]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

of the right lung was found (Figure 1c). In addition, histologically described traces of dispersed myocardial fibrosis, especially subendocardial, were found. Besides, multiple anomalies of internal organs were found—Meckel's diverticulum of ileum and accessory spleen. The girl did not exhibit malformations of the urogenital system. The diagnosis was concluded as Scimitar syndrome, infantile type.

3 | CASE 2

The younger sister was born 4 years later, in 2020. She was from the third pregnancy that was monitored for aortic coarctation and a smaller left ventricular size. Delivery was at 38 weeks gestation, birth weight of 2960 g (14th percentile), and length of 49 cm (29th percentile). Postpartum adaptation was mildly difficult, with initial oxygen saturation of 70%, spontaneous adjustment after 10 minutes without needing oxygen therapy, and spontaneously ventilated. Prostaglandin E therapy was started for a ductus-dependent developmental heart defect.

The chest X-ray again described right-sided obscuration of the pulmonary wing and undifferentiated contour of the diaphragm, as well as non-specific spherical obscuration in the central region. The finding was clarified by an angiographic CT scan of the chest, which described an abnormality of the vascular system of the examined area, dominated by a tight coarctation of the aorta, hypoplastic aortic arch, wide-open ductus arteriosus, aplasia of the right pulmonary artery, hypoplasia of the right lung, anastomoses of the several arterial branches of the truncus coeliacus with the branches of the portal vein, and some branches of the truncus coeliacus pass through the diaphragm into the right lung wing. Additional abdominal sonographic examination showed intrathoracic herniation of the liver and portosystemic shunt. The cardiological examination further revealed a hypoplastic mitral valve and left ventricle. The cardiac defect was assessed as inoperable, and the decision was taken to proceed to palliative care. The patient died of cardiac failure at 10 days of age.

The autopsy findings in the second sister were very similar (see Table 1) and described a complex cardiac defect with dextroposition of the heart and mediastinal shift to the right with extreme right-sided pulmonary hypoplasia (Figure 1b) with anomalous vascular supply—agenesis of the right branch of the pulmonary artery, aortopulmonary collaterals from the thoracic aorta (and according to angio CT also from the abdominal aorta), and veins with intrahepatic drainage into the intrahepatic part of the vena cava inferior. Furthermore, eventration of the diaphragm and pulmohepatic fusion of the right lung with the liver was described (Figure 1d). Hepatic hemosiderosis was diagnosed. The left lung with anomalous lobation was of adequate size. The cardiac findings showed atrial septal defect, mildly hypoplastic ascending aorta with preductal coarctation, patent ductus arteriosus (post-prostaglandin E therapy), borderline small left ventricle with hypoplastic papillary muscles, and hypertrophy of the right ventricle, especially its inflow portion. A small pericardial effusion was present. This patient also had a developmental defect in the urogenital system. Specifically, multiple defects of the internal genitalia—hypoplastic ovaries, duplication of the internal genitalia (uterus didelphys and vagina duplex), left-sided splenogonadal fusion (discontinuous) (Figure S1), and accessory spleen—were also present. These complex autopsy findings led to a suspicion of cardiac-urogenital syndrome.

4 | GENETIC TESTING OF BOTH CASES

Due to the repeated occurrence of multiple developmental defects in the family, both girls were indicated for genetic examination. Genealogical examination with family history was performed, then normal female karyotypes were confirmed, and DNA microarrays were indicated—all with a negative result. Based on the negative results of the primary genetic examination, both patients were referred to WES after the parents signed the informed consent form. A pathogenic splicing variant c.1388+2T>G was identified in the myelin regulatory factor (*MYRF*) gene (see Figure 2a). The variant is localized to two nucleotides downstream of the boundary between exon 9 and intron 9 and has not previously been described in both clinical or population databases of genetic variants and scientific literature. According to the available splicing prediction algorithms MaxEnt (Yeo & Burge, 2004), NNSPLICE (Reese et al., 1997), and SSF (Shapiro & Senapathy, 1987), there is a 100% probability that the donor splice site is altered, and the abnormally spliced mRNA is produced. The presence of this variant in both patients and its absence in the parents were confirmed by Sanger sequencing (see Figure 2b). The occurrence of identical de novo events in siblings suggests gonadal mosaicism, which can mimic recessive inheritance in the pedigree (see Figure 2c). Non-paternity was excluded using STR-based analysis of 17 ENFSI-recommended STR loci. As the molecular analyses of the affected siblings were carried out postmortem, we were unable to perform RNAseq-based analysis to assess the variant's effect on splicing due to a lack of suitable biological material.

5 | DISCUSSION

The *MYRF* gene encodes a transcription factor that autoproteolytically cleaves to directly activate myelin

23249269, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mgg3.2139 by Cochrane Czech Republic, Wiley Online Library on [15/08/2026]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

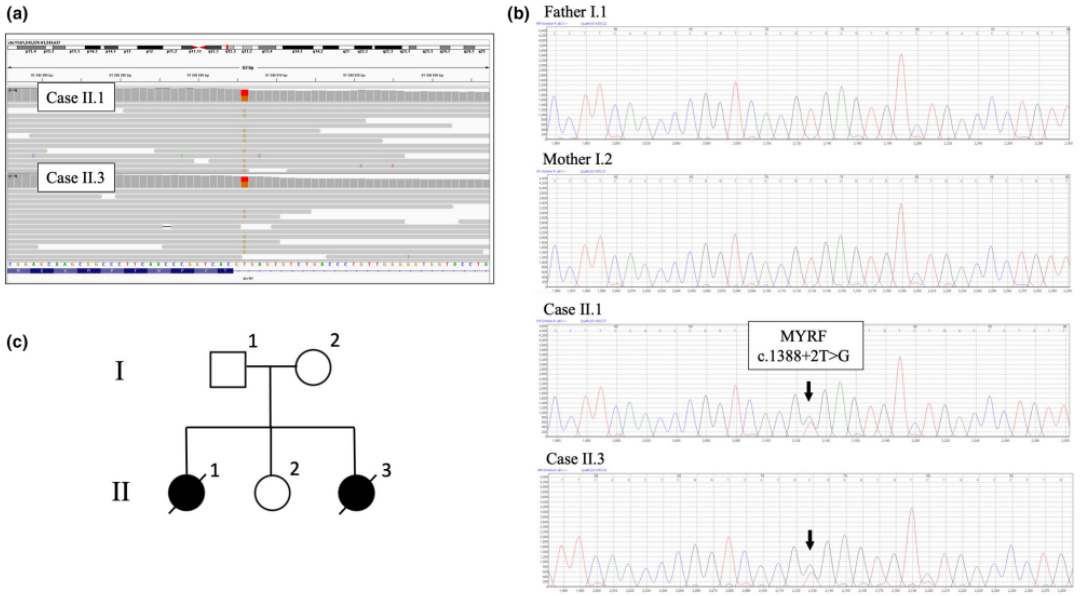


FIGURE 2 Results of the sequencing analysis of both sisters (case 1 = II.1, case 2 = II.3). (a) Exome sequencing of the patients' DNA presenting pathogenic splicing variant c.1388+2T>G in the MYRF gene was visualized using the Integrative Genomics Viewer software (Broad Institute and the Regents of the University of California, USA). (b) Part of the MYRF gene sequence showing heterozygous pathogenic variant was confirmed to be present in both cases and absent in the parents by Sanger sequencing. (c) The identical de novo events in siblings are consistent with gonadal mosaicism, which can mimic recessive inheritance in the pedigree.

genes (Bujalka et al., 2013; Kim et al., 2021) and as such is essential for myelination of the central nervous system (Emery et al., 2009). Recently, functional mechanisms linking pathogenic mutations in the DNA-binding domain and intramolecular chaperone auto-processing (ICA) domain of the *MYRF* gene and birth defects have been described in detail (An et al., 2020; Fan et al., 2021). Variants in the *MYRF* gene have been associated with many diseases as the *MYRF* gene is widely expressed in other tissues such as the stomach, small intestine, and lung (Pinz et al., 2018). Although the function of the MYRF protein outside the nervous system is not well characterized, there is increasing evidence that heterozygous loss-of-function variants of *MYRF* can lead to abnormalities in the development of the heart, urogenital tract, diaphragm, and lung (Rossetti et al., 2019). Kurahashi et al. published cases of nine individuals with the same heterozygous variant in the *MYRF* gene who developed encephalopathy and reversible vacuolization of myelin (Kurahashi et al., 2018). In some of these patients with heterozygous loss of function, variants in *MYRF* were also observed as structural abnormalities in various organs, mainly the heart, lung, diaphragm, and genitals (Kurahashi et al., 2018). Since *MYRF* is also expressed in the retinal pigment epithelium, some variants in the *MYRF* gene are associated with ocular disorders such as nanophthalmos (Huang et al., 2021).

The term cardiac-urogenital syndrome was first used in 2018 in two clinical reports describing three patients with similar phenotypes and *MYRF* gene haploinsufficiency. First, Pinz et al. identified de novo variants in two patients with this disease, and one of these variants (c.2366+1G>A) affected the splice site (Rossetti et al., 2019). Later, Chitayat et al. reported another patient with a heterozygous de novo variant of the *MYRF* gene and a similar phenotype (Chitayat et al., 2018). In the same year, Qi et al. analyzed patients with diaphragmatic herniation and identified a pathogenic variant in the *MYRF* gene in 10 patients with complex cardiopathy and urogenital malformation in a cohort of 362 patients (Qi et al., 2018). In 2020, Alves et al. presented a patient with a confirmed heterozygous pathogenic variant in the *MYRF* gene at 17 years of age with a fully expressed cardiac-urogenital syndrome. He was further described to have cognitive impairment with an intelligence quotient score of 20. At 4 years of age, brain magnetic resonance imaging showed signs of delayed myelination (Alves & Leão, 2020). The patient's neurological impairment was reported as well by Pinz et al., who described one patient with speech delay who lived until

23249269, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mgg3.2139 by Cochrane Czech Republic, Wiley Online Library on [15/08/2026]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

18 months, and Qi et al., who reported a 2-year-old with intellectual disability and motor delay (Pinz et al., 2018; Qi et al., 2018). The prognosis for patients with cardio-urogenital syndrome is unfavorable, and, in most cases, patients die early in neonatal or early infancy. Three of the reported patients who reached older age (two toddlers and one adolescent) also developed neurological clinical signs with developmental delay.

In the presented cases, there are differences in the autopsy findings of both siblings. In our first patient, among others, a very rare rhabdomyomatous dysplasia of the lung (presence of striated muscle in the lung parenchyma) was described, which is associated with significant malformations involving the heart and lungs. Drut et al. (1988) described the autopsy findings of three neonates with rhabdomyomatous pulmonary dysplasia in great detail (Drut et al., 1988). Other findings described in two of these three patients were phenotypically very similar to the cardiac-urogenital syndrome. Rhabdomyomatous lung dysplasia is a severe disorder and is probably compatible with long-term survival only if the histological changes are limited to one lung and if no other life-limiting malformations are associated (Lienicke et al., 2002).

The occurrence of MYRF-associated cardiac-urogenital syndrome has not yet been described in a single family. Based on our findings, it seems that in the familial form of cardiac-urogenital syndrome, the same pathogenic alteration in the *MYRF* gene can be manifested with variable expressivity. In the first girl, no urogenital anomalies were described in the autopsy findings, and in the second girl, full cardiac-urogenital syndrome was present. Of the 17 published children with MYRF deficiency, urogenital tract changes were not expressed in a total of 4 children, approximately one-quarter of the cases (Pinz et al., 2018).

The occurrence of two identical de novo variants observed in our cases is improbable. Both parents are not affected and tested negative. As we excluded non-paternity, we assume that gonadal mosaicism is involved in this case. Gonadal mosaicism is known to give the impression of autosomal recessive inheritance when recurrence of an autosomal-dominant condition among offspring of phenotypically normal parents is observed (Figure 2c). Gonadal mosaicism has been extensively documented for several genetic conditions including Duchenne muscular dystrophy, osteogenesis imperfecta, or paternal age-associated disorders. These reports suggest the need for awareness when discussing the risk of recurrence in clinically and phenotypically normal parents with an affected offspring. The parents had a healthy girl in 2018, cardiological examination showed no pathology, psychomotor development is completely normal, and the girl is doing well. So far, the parents have declined further examination of the daughter, including genetic testing. They have also declined genetic testing of the gametes to confirm the gonadal mosaicism we suspect. The lack of direct confirmation of gonadal mosaicism and lack of WES data from parents, which prevents the possibility of bioinformatic prediction of mosaicism, are the weaknesses of our report.

6 | CONCLUSIONS

We reported two siblings with postmortem diagnosed cardiac-urogenital syndrome and elucidated the molecular basis of the disease. To our knowledge, this is the first published case of familial cardiac-urogenital syndrome with potential gonadal mosaicism. The identical de novo pathogenic event in siblings with unaffected and negatively tested parents suggests gonadal mosaicism mimicking recessive inheritance. The extensive developmental malformations were not compatible with life in both cases. In the case of another planned pregnancy, parents can be offered pre-implantation genetic testing to increase the probability of having a healthy child.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

KS, MJ, and OS wrote the main manuscript. PP, HP, KS, JP, PJ, MJ, and DP acquired and analyzed the data. PP, HP, KS, JP, MJ, and DP provided interpretation of the data. PJ, DP, JT, and PP commented on the manuscript draft. All authors reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank all the participants of the study.

FUNDING INFORMATION

This work was supported by the Ministry of Health, Czech Republic, Conceptual Development of Research Organization (FNBr, 65269705), and the project National Institute for Cancer Research (Programme EXCELES, ID Project No. LX22NPO5102)—Funded by the European Union—Next Generation EU.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no competing interests.

ETHICS APPROVAL AND PATIENT CONSENT

This study was performed according to the Declaration of Helsinki. Written informed consent to participate in the study was obtained from all the participants and/or from parents/legal guardians of the participant. The research was approved by the Medical Ethics Committee of the University Hospital Brno, Brno, Czech Republic.

23249269, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mgg3.2139 by Cochrane Czech Republic, Wiley Online Library on [15/08/2026]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data are available on request from the authors.

ORCID

Ondrej Slaby https://orcid.org/0000-0002-8450-0584

REFERENCES

Alves, D., & Leão, M. (2020). The clinical overlap between cardiac-urogenital syndrome, Meacham syndrome, and PAGOD syndrome. Report of a new patient with cardiac-urogenital syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *182*(6), 1532–1534. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61551

An, H., Fan, C., Sharif, M., Kim, D., Poitelon, Y., & Park, Y. (2020). Functional mechanism and pathogenic potential of MYRF ICA domain mutations implicated in birth defects. *Scientific Reports*, *10*(1), 814. https://doi.org/10.1038/s41598-020-57593-8

Bujalka, H., Koenning, M., Jackson, S., Perreau, V. M., Pope, B., Hay, C. M., Mitew, S., Hill, A. F., Lu, Q. R., Wegner, M., Srinivasan, R., Svaren, J., Willingham, M., Barres, B. A., & Emery, B. (2013). MYRF is a membrane-associated transcription factor that autoproteolytically cleaves to directly activate myelin genes. *PLoS Biology*, *11*(8), e1001625. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001625

Chitayat, D., Shannon, P., Uster, T., Nezarati, M. M., Schnur, R. E., & Bhoj, E. J. (2018). An additional individual with a De novo variant in myelin regulatory factor (MYRF) with cardiac and urogenital anomalies: Further proof of causality: Comments on the article by Pinz et al. (2018). *American Journal of Medical Genetics Part A*, *176*(9), 2041–2043. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.40360

Drut, R. M., Quijano, G., Drut, R., & Las, H. J. (1988). Rhabdomyomatous dysplasia of the lung. *Pediatric Pathology*, *8*(4), 385–390. https://doi.org/10.3109/15513818809041572

Dupuis, C., Charaf, L. A., Brevière, G. M., & Abou, P. (1993). "Infantile" form of the scimitar syndrome with pulmonary hypertension. *The American Journal of Cardiology*, *71*(15), 1326–1330. https://doi.org/10.1016/0002-9149(93)90549-r

Emery, B., Agalliu, D., Cahoy, J. D., Watkins, T. A., Dugas, J. C., Mulinyawe, S. B., Ibrahim, A., Ligon, K. L., Rowitch, D. H., & Barres, B. A. (2009). Myelin gene regulatory factor is a critical transcriptional regulator required for CNS myelination. *Cell*, *138*(1), 172–185. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.031

Fan, C., An, H., Sharif, M., Kim, D., & Park, Y. (2021). Functional mechanisms of MYRF DNA-binding domain mutations implicated in birth defects. *The Journal of Biological Chemistry*, *296*, 100612. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100612

Gupta, N., Endrakanti, M., Gupta, N., Dadhwal, V., Naini, K., Manchanda, S., Khan, R., & Jana, M. (2022). Diverse clinical manifestations and intrafamilial variability due to an inherited recurrent MYRF variant. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, *188*(7), 2187–2191. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62744

Huang, H., Zhou, F., Zhou, S., & Qiu, M. (2021). MYRF: A mysterious membrane-bound transcription factor involved in myelin development and human diseases. *Neuroscience Bulletin*, *37*(6), 881–884. https://doi.org/10.1007/s12264-021-00678-9

Kim, D., An, H., Fan, C., & Park, Y. (2021). Identifying oligodendrocyte enhancers governing Plp1 expression. *Human Molecular Genetics*, *30*(23), 2225–2239. https://doi.org/10.1093/hmg/ddab184

Kurahashi, H., Azuma, Y., Masuda, A., Okuno, T., Nakahara, E., Imamura, T., Saitoh, M., Mizuguchi, M., Shimizu, T., Ohno, K., & Okumura, A. (2018). MYRF is associated with encephalopathy with reversible myelin vacuolization. *Annals of Neurology*, *83*(1), 98–106. https://doi.org/10.1002/ana.25125

Lienicke, U., Hammer, H., Schneider, M., Heling, K., Wauer, R. R., Mau, H., & Vogel, M. (2002). Rhabdomyomatous dysplasia of the newborn lung associated with multiple congenital malformations of the heart and great vessels. *Pediatric Pulmonology*, *34*(3), 222–225. https://doi.org/10.1002/ppul.10114

Pinz, H., Pyle, L. C., Li, D., Izumi, K., Skraban, C., Tarpinian, J., Braddock, S. R., Telegrafi, A., Monaghan, K. G., Zackai, E., & Bhoj, E. J. (2018). De novo variants in myelin regulatory factor (MYRF) as candidates of a new syndrome of cardiac and urogenital anomalies. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *176*(4), 969–972. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38620

Qi, H., Yu, L., Zhou, X., Wynn, J., Zhao, H., Guo, Y., Zhu, N., Kitaygorodsky, A., Hernan, R., Aspelund, G., Lim, F. Y., Crombleholme, T., Cusick, R., Azarow, K., Danko, M. E., Chung, D., Warner, B. W., Mychaliska, G. B., Potoka, D., … Shen, Y. (2018). De novo variants in congenital diaphragmatic hernia identify MYRF as a new syndrome and reveal genetic overlaps with other developmental disorders. *PLoS Genetics*, *14*(12), e1007822. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007822

Reese, M. G., Eeckman, F. H., Kulp, D., & Haussler, D. (1997). Improved splice site detection in genie. *Journal of Computational Biology*, *4*, 311–323. https://doi.org/10.1089/cmb.1997.4.311

Rossetti, L. Z., Glinton, K., Yuan, B., Liu, P., Pillai, N., Mizerik, E., Magoulas, P., Rosenfeld, J. A., Karaviti, L., Sutton, V. R., Lalani, S. R., & Scott, D. A. (2019). Review of the phenotypic spectrum associated with haploinsufficiency of MYRF. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *179*(7), 1376–1382. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61182

Shapiro, M. B., & Senapathy, P. (1987). RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: Sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Research*, *15*, 7155–7174. https://doi.org/10.1093/nar/15.17.7155

Wang, H., Kalfa, D., Rosenbaum, M. S., Ginns, J. N., Lewis, M. J., Glickstein, J. S., Bacha, E. A., & Chai, P. J. (2018). Scimitar syndrome in children and adults: Natural history, outcomes, and risk analysis. *The Annals of Thoracic Surgery*, *105*(2), 592–598. https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2017.06.061

Yeo, G., & Burge, C. B. (2004). Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *Journal of Computational Biology*, *11*, 377–394. https://doi.org/10.1089/1066527041410418

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Slaba, K., Jezova, M., Pokorna, P., Palova, H., Tuckova, J., Papez, J., Prochazkova, D., Jabandziev, P., & Slaby, O. (2023). Two sisters with cardiac-urogenital syndrome secondary to pathogenic splicing variant in the *MYRF* gene with unaffected parents: A case of gonadal mosaicism? *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, *11*, e2139. https://doi.org/10.1002/mgg3.2139

23249269, 2023, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mgg3.2139 by Cochrane Czech Republic, Wiley Online Library on [15/08/2026]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Příloha 5

Slabá K, Pálová H, Pokorná P, Slabý O, Konečná P, Kolbová L, Jabandžiev P, Procházková D. Syndrom intelektuálního postižení související s DYRK1A. Ces-slov Pediat. 2022;77(4):215–218.

DOI:10.55095/CSPediatrie2022/035 Ces-slov Pediat 2022; 77(4): 215–218

KAZUISTIKA

Syndrom intelektuálního postižení související s *DYRK1A*

DYRK1A-related intellectual disability syndrome

Kateřina Slabá[1], Hana Pálová[2], Petra Pokorná[2], Ondřej Slabý[2,3], Petra Konečná[1], Lucie Kolbová[1], Petr Jabandžiev[1,2], Dagmar Procházková[1,4]

[1]Pediatrická klinika, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

[2]CEITEC, Masarykova univerzita, Brno

[3]Biologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

[4]Ústav lékařské genetiky a genomiky, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

SOUHRN

Slabá K, Pálová H, Pokorná P, Slabý O, Konečná P, Kolbová L, Jabandžiev P, Procházková D. Syndrom intelektuálního postižení souvisejícího s *DYRK1A*

Syndrom intelektuálního postižení související s *DYRK1A* (*DYRK1A*-related intellectual disability syndrome) je autozomálně dominantní onemocnění charakterizované středním až těžkým intelektuálním postižením, zpožděním vývoje řeči, poruchou autistického spektra a mikrocefalií. Typické jsou kraniofaciální dysmorfie, potíže s krmením, malý vzrůst, hypertonie, poruchy chůze. V kojeneckém věku bývají často febrilní záchvaty, později vývoj epilepsie. Cílem našeho kazuistického sdělení je prezentace 3leté pacientky s tímto syndromem. U naší pacientky bylo vzhledem k vyčerpaným diagnostickým možnostem a neobjasněné příčině intelektuálního postižení provedeno celoexomové sekvenování (WES). Pomocí této metody jsme nalezli heterozygotní patogenní variantu p.R205* v genu *DYRK1A*, což umožnilo rychlé stanovení kauzální diagnózy. Lze tedy říct, že WES představuje účinný diagnostický nástroj pro detekci mutací, které jsou příčinou různých syndromů spojených s intelektuálním postižením.

Klíčová slova: intelektuální postižení, *DYRK1A* syndrom, celoexomové sekvenování

SUMMARY

Slabá K, Pálová H, Pokorná P, Slabý O, Konečná P, Kolbová L, Jabandžiev P, Procházková D. *DYRK1A*-related intellectual disability syndrome

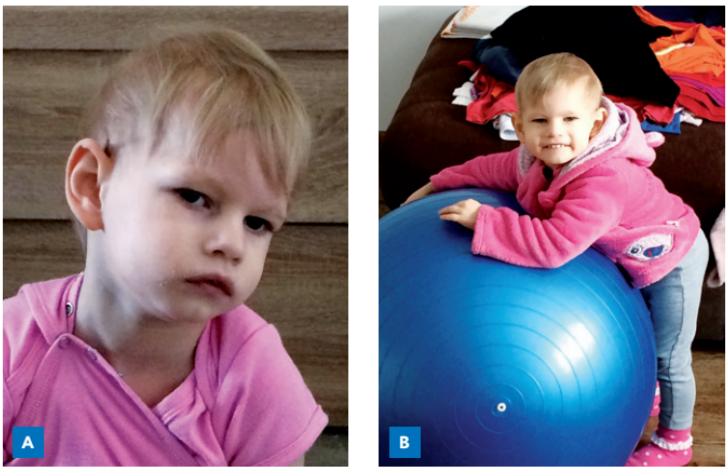
DYRK1A-related intellectual disability syndrome is an autosomal dominant disorder characterized by intellectual disability including impaired speech development, autism spectrum disorder, and microcephaly. Affected individuals often have a clinically recognizable phenotype including typical craniofacial dysmorphism, feeding problems, hypertonia, short stature, gait disturbances, and foot anomalies. Other medical concerns relate to febrile seizures in infancy with later development of epilepsy. This case report aims to present a case of a three-year-old girl with *DYRK1A* syndrome. Since there were no additional diagnostic methods available and the cause of the intellectual disability remained unexplained, we decided to perform whole-exome sequencing (WES). WES led to the identification of heterozygous pathogenic variant p.R205* in *DYRK1A* gene and enabled us to reach a causal diagnosis in a reasonable time frame. We can conclude, that WES is an efficient diagnostic approach to identify causative genetic variants for syndromes associated with intellectual disability.

Key words: intellectual disability, *DYRK1A* syndrome, whole-exome sequencing

Korespondence
doc. MUDr. Dagmar Procházková, Ph.D.
Pediatrická klinika LF MU a FN Brno
Černopolní 9
625 00 Brno
Prochazkova.Dagmar@fnbrno.cz

ÚVOD

Syndrom intelektuálního postižení související s *DYRK1A* (*DYRK1A* syndrom) je vzácné autozomálně dominantní onemocnění charakterizované intelektuálním postižením různého stupně, zpožděním vývoje řeči, poruchou autistického spektra včetně stereotypních projevů v chování. Stupeň intelektuálního postižení se nejčastěji uvádí v rozmezí středně těžkého až těžkého, bylo však popsáno i několik jedinců pouze s mírným postižením.[1] Do typických



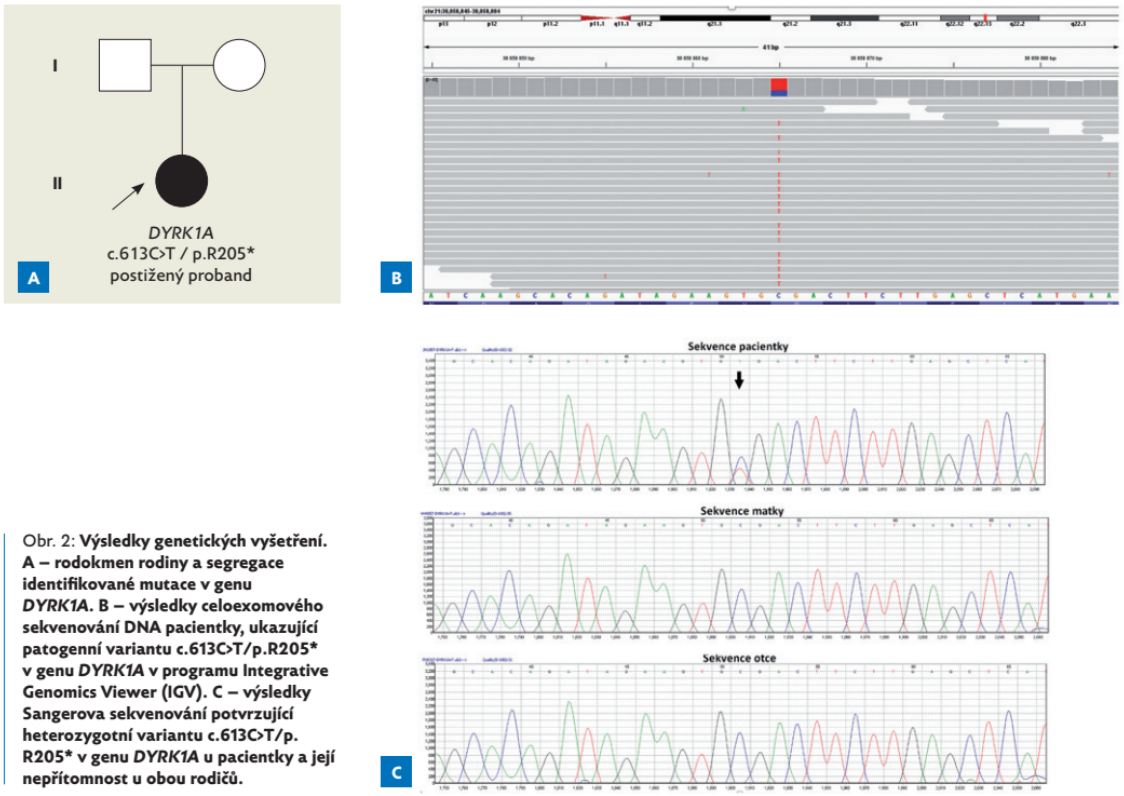
Obr. 1: **Fotografie pacientky ve dvou a třech letech z archivu rodinných fotografií. Patrná je kraniofaciální dysmorfie – velké ušní boltce, hluboko posazené oči, mikrognatie.**

fenotypových znaků již dříve popisovaných v souvislosti s *DYRK1A* syndromem dále patří intrauterinní růstová retardace, mikrocefalie, mozkové abnormality, opoždění vývoje řeči, záchvaty, problémy s chováním, potíže s krmením a neprospívání, hypertonie, chůze o široké bázi a kraniofaciální dysmorfie (velké ušní boltce, ustupující malá brada, hluboce posazené oči). V kojeneckém věku se často vyskytují febrilní křeče (až u 77 % pacientů), u poloviny pacientů dochází k rozvoji epilepsie a kosterních abnormalit typu skoliózy, kyfózy nebo pectus excavatum či anomálii chodidla. Asi třetina pacientů je malého vzrůstu. Dále se mohou vyskytovat zubní, oftalmologické a srdeční anomálie či poruchy endokrinního systému. Předpokládá se, že 0,1–0,5 % jedinců s intelektuálním postižením a/nebo autismem trpí *DYRK1A* syndromem.[2,3] Případy pacientů s touto diagnózou v České republice nebyly dosud v odborné literatuře popsány.

KAZUISTIKA

Dívka se narodila nepříbuzným rodičům z první gravidity sledované pro intrauterinní růstovou retardaci plodu. Porod proběhl spontánně záhlavím ve 35. týdnu těhotenství pro předčasný odtok plodové vody. Matka je heterozygot pro Leidenskou mutaci, ostatní rodinná anamnéza je bez nápadností. Porodní hmotnost činila 1950 g (3.–10. percentil), délka 42 cm (3. percentil), obvod hlavy 28 cm (pod 3. percentilem). Poporodní adaptace byla lehce ztížená s nutností krátkodobé oxygenoterapie. Od začátku dominovaly potíže s krmením, pro které byla přechodně podávána parenterální výživa, poté výživa nazogastrickou sondou. Do domácí péče byla propuštěna ve 3 týdnech věku s adekvátním perorálním příjmem. Pro neprospívání a přetrvávající potíže s krmením byla přijata ve věku 3,5 měsíce k hospitalizaci na Pediatrickou kliniku FN Brno k celkovému došetření stavu. V klinickém obrazu byla patrná mikrocefalie (obvod hlavy 35 cm, hluboce pod 3. percentilem, SD −3,69), mírná kraniofaciální dysmorfie s hluboko posazenýma očima, velkými ušními boltci a menší ustupující bradou (obr. 1). Neurologem byl diagnostikován spastický syndrom s akcentací na dolních končetinách s perzistencí novorozeneckých vývojových reflexů, EEG vyšetření bylo v normě. Laboratorní parametry včetně vyšetření dědičných metabolických poruch byly bez patologického nálezu. Oční vyšetření odhalilo parciální atrofii papily optického nervu, pro kterou je sledovaná oftalmologem, aby se snížilo riziko oční komorbidity, která může mít další dopad na učení, chování a kvalitu života. V kojeneckém věku a časném batolecím věku se febrilní stavy u dívky opakovaně komplikovaly křečemi. Magnetická rezonance mozku se zaměřením na optické dráhy byla s normálním nálezem. Genetické vyšetření potvrdilo heterozygocii Leidenské mutace, karyotyp a array CGH byla bez abnormit. Samostatné chůze o široké bázi byla schopná až ve 26 měsících. Aktuálně 3letá dívka spadá do pásma středně těžkého intelektuálního postižení. Dle psychologického vyšetření vykazuje opoždění o půl roku věku ve všech složkách. Je zcela bez řečového projevu, jsou pouze hrdelní zvuky, hlasitý smích, občas se objeví reduplikované slabiky. Vzhledem k vyčerpaným diagnostickým možnostem a neobjasněné příčině intelektuálního postižení byla pacientka zařazena do studie k provedení celoexomového sekvenování (WES). Rodiče podepsali informovaný souhlas se zařazením do studie zahrnující genetické vyšetření a také souhlas s publikováním fotografií.

DNA byla izolována z periferní krve. Celoexomové sekvenování (Truseq Exome kit) bylo provedeno na platformě NextSeq 500 s využitím NextSeq 500/550 MidOutput Kit v2.5 (150 cycles) (vše Illumina, CA, USA). Pomocí celoexomového sekvenování jsme identifikovali a pomocí Sangerova sekvenování verifikovali heterozygotní *de novo* variantu c.613C>T/p.R205* v genu *DYRK1A* (NM_001396.3, exon 6) (obr. 2), jejímž důsledkem je vytvoření předčasného stop kodonu a tvorba zkráceného proteinu. Tato varianta je opakovaně popsána v databázích HGMD (CM1413207) a ClinVar



Obr. 2: **Výsledky genetických vyšetření. A – rodokmen rodiny a segregace identifikované mutace v genu *DYRK1A*. B – výsledky celoexomového sekvenování DNA pacientky, ukazující patogenní variantu c.613C>T/p.R205* v genu *DYRK1A* v programu Integrative Genomics Viewer (IGV). C – výsledky Sangerova sekvenování potvrzující heterozygotní variantu c.613C>T/p.R205* v genu *DYRK1A* u pacientky a její nepřítomnost u obou rodičů.**

(VCV000162153.7) jako patogenní ve vztahu k syndromu intelektuálního postižení souvisejícího s *DYRK1A* (také známého jako mentální retardace typu 7).

DISKUSE

Gen *DYRK1A* (dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation-regulated kinase 1A) je vysoce konzervovaný gen lokalizovaný v tzv. kritické oblasti Downova syndromu, což je oblast chromozomu 21 (21q22), která je zodpovědná za většinu fenotypových rysů Downova syndromu. Kóduje kinázu 1A, která spadá do rodiny fosforylací regulovaných tyrosinkináz s dvojí specificitou. Protein je tvořen signální sekvencí pro transport do jádra, proteinkinázovou doménou, motivem leucinového zipu a vysoce konzervovanou oblastí třináct opakujících se histidinů. *DYRK1A* je široce exprimován ve vyvíjejícím se nervovém systému a ovlivněním signalizace vedoucím k buněčné proliferaci hraje významnou roli ve vývoji mozku a jeho funkce závisí na genové dávce.[4] Zatímco trialelický *DYRK1A* je zapojen do patogeneze Downova syndromu,[5] jeho haploinsuficience způsobuje vzácný syndrom intelektuálního postižení související s *DYRK1A* (také známý jako mentální retardace typu 7).[2,3] Dávkově závislá funkce *DYRK1A* pravděpodobně souvisí s jeho zapojením do různých multimerních enzymatických a regulačních komplexů, jejichž sestavování je narušeno jak v případě nedostatku, tak v případě nadbytku proteinu DYRK1A. Přesný mechanismus těchto procesů ovšem není znám.[2,5] Námi nalezená varianta p.R205* byla primárně popsána kolektivem autorů Redin et al. (2014), kteří analyzovali kohortu 106 pacientů s mentální retardací nejasné etiologie.[4] Funkční charakterizaci této varianty přinesla až práce Dang et al. (2018), kteří pomocí WES vyšetřili celkem 892 pacientů s intelektuálním postižením nebo poruchou autistického spektra, z nichž v 9 případech identifikovali patogenní variantu v genu *DYRK1A*.[6]

Základní fenotypové znaky syndromu pozorované u naší pacientky patřily v doposud publikovaných studiích mezi ty nejčastější: intelektuální postižení s opožděným vývojem řeči (vyjádřeno ve 100 % případů), mikrocefalie (95 %), typické obličejové rysy (90 %),[7] potíže s krmením a neprospívání (93 %) a oční abnormality (62 %).[8–11] Diagnóza syndromu intelektuálního postižení související s *DYRK1A* je tak u pacientky podpořena nejen genetickým nálezem, ale také širokým spektrem fenotypových projevů.

ZÁVĚR

Příčiny intelektuálního postižení zůstávají do značné míry neznámé díky jeho rozsáhlé klinické a genetické heterogenitě. *De novo* mutace představují častou příčinu intelektuálního postižení a WES může být použito jako účinný diagnostický nástroj pro jejich detekci.[12] Přítomnost více fenotypových znaků kromě vlastního intelektuálního postižení, zvláště pak je-li přítomna porucha autistického spektra či anomálie vnějšího ucha, je spojena s vyšší diagnostickou výtěžností metody WES u této skupiny onemocnění. |

LITERATURA

1. **van Bon BWM, Coe BP, de Vries BBA, Eichler EE.** *DYRK1A* Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. (eds.). GeneReviews®. [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle 1993–2021.
2. **Earl RK, Turner TN, Mefford HC, et al.** Clinical phenotype of ASD-associated *DYRK1A* haploinsufficiency. Mol Autism 2017; 8: 54.
3. **Arbones ML, Thomazeau A, Nakano-Kobayashi A, et al.** *DYRK1A* and cognition: A lifelong relationship. Pharmacol Ther 2019; 194: 199–221.
4. **Redin C, Gérard B, Lauer J, et al.** Efficient strategy for the molecular diagnosis of intellectual disability using targeted high-throughput sequencing. J Med Genet 2014; 51(11): 724–736.
5. **Park J, Song WJ, Chung KC.** Function and regulation of *DYRK1A*: towards understanding Down syndrome. Cell Mol Life Sci 2009; 66(20): 3235–3240.
6. **Dang T, Duan WY, Yu B, et al.** Autism-associated *DYRK1A* truncation mutants impair neuronal dendritic and spine growth and interfere with postnatal cortical development. Mol Psychiatry 2018; 23(3): 747–758.
7. **van Bon BW, Coe BP, Bernier R, et al.** Disruptive de novo mutations of *DYRK1A* lead to a syndromic form of autism and ID. Mol Psychiatry 2016; 21(1): 126–132.
8. **Méjécase C, Way CM, Owen N, Moosajee M.** Ocular Phenotype Associated with *DYRK1A* Variants. Genes (Basel) 2021; 12(2): 234.
9. **Ernst J, Alabek ML, Eldib A, et al.** Ocular findings of albinism in *DYRK1A*-related intellectual disability syndrome. Ophthalmic Genet 2020; 41(6): 650–655.
10. **Meissner LE, Macnamara EF, D'Souza P, et al.** *DYRK1A* pathogenic variants in two patients with syndromic intellectual disability and a review of the literature. Mol Genet Genomic Med 2020; 8(12): e1544.
11. **Luco SM, Pohl D, Sell E, et al.** Case report of novel *DYRK1A* mutations in 2 individuals with syndromic intellectual disability and a review of the literature. BMC Med Genet 2016; 17: 15.
12. **Hiraide T, Yamoto K, Masunaga Y, et al.** Genetic and phenotypic analysis of 101 patients with developmental delay or intellectual disability using whole-exome sequencing. Clin Genet 2021; 100(1): 40–50.

Příloha 6

Slabá K, Pokorná P, Koželková K, Hloušková E, Jugas R, Kubátová J, Demlová R, Danhofer P, Jabandžiev P, Svatoňová T, Slabý O. ReNU syndrom – nově popsané prevalentní neurovývojové onemocnění, první případ v České republice. Čes-slov Pediat. 2025;80(4):177-181.

DOI:10.55095/CSPediatrie2025/029 Ces-slov Pediat 2025; 80(4): 177–181

KAZUISTIKA

ReNU syndrom – nově popsané prevalentní neurovývojové onemocnění, první případ v České republice

ReNU syndrome – a newly described prevalent neurodevelopmental disorder: first case in the Czech Republic

Kateřina Slabá[1,2,4,5], Petra Pokorná[3,4], Kateřina Koželková[3], Eliška Hloušková[3], Robin Jugas[3], Jana Kubátová[5,7], Regina Demlová[4,5,7], Pavlína Danhofer[4,5,6], Petr Jabandžiev[1], Tereza Svatoňová[2,5], Ondřej Slabý[3,4,5]

[1]Pediatrická klinika, Fakultní nemocnice Brno, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

[2]Ústav lékařské genetiky a genomiky, Fakultní nemocnice Brno, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

[3]Biologický ústav, Lékařská fakulta, CEITEC, Masarykova univerzita, Brno

[4]Centrum precizní medicíny, Fakultní nemocnice Brno

[5]CREATIC, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

[6]Klinika dětské neurologie, Fakultní nemocnice Brno, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

[7]Farmakologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

Poděkování
Podpořeno MZ ČR – RVO (FNBr, 65269705) a grantem LF MU MUNI/A/1591/2023. Studii BabyFox podporuje společnost Illumina Inc., která poskytuje reagencie a bioinformatická řešení.

SOUHRN

Slabá K, Pokorná P, Koželková K, Hloušková E, Jugas R, Kubátová J, Demlová R, Danhofer P, Jabandžiev P, Svatoňová T, Slabý O. ReNU syndrom – nově popsané prevalentní neurovývojové onemocnění, první případ v České republice

Předkládáme případ 5,5letého chlapce s těžkým globálním vývojovým opožděním, hypotonií, malým proporcionálním vzrůstem, neprospíváním, kraniofaciální dysmorfií a dalšími potížemi, u kterého se podařilo stanovit diagnózu pomocí celogenomového sekvenování (WGS). Diagnostika byla realizována v rámci českého národního projektu BabyFox, který se zaměřuje na zhodnocení diagnostické a klinické využitelnosti rapidního celogenomového sekvenování (rapid trioWGS) u dětí hospitalizovaných na jednotkách intenzivní péče s podezřením na geneticou podstatu jejich potíží. U pacienta byla identifikována patogenní varianta v genu *RNU4-2*, která je od roku 2024 spojována s prevalentním onemocněním RNU4-2 syndromem neurovývojového opoždění, také známým pod názvem ReNU syndrom. Ačkoli se jedná o nově popsané onemocnění, je ReNU syndrom jedním z nejrozšířenějších monogenních neurovývojových onemocnění, přičemž se odhaduje, že patogenní varianty v genu *RNU4-2* jsou příčinou přibližně 0,4 % všech neurovývojových poruch. Tento gen nekóduje protein, ale malou jadernou RNA U4, díky čemuž jeho sekvence není stanovována při standardním celoexomovém sekvenování ani v rámci cílených sekvenačních panelů. Jeho význam tak zůstával až do roku 2024 přehlížen. Případ ReNU syndromu zdůrazňuje význam celogenomového sekvenování pokrývajícího i nekódující části genomu v diagnostice vzácných genetických onemocnění a ukazuje, jak implementace moderních genomických metod může přispět k ukončení diagnostické odysey pacientů s dosud neobjasněnými neurovývojovými poruchami.

Klíčová slova: neurovývojové onemocnění, diagnostická odysea, celogenomové sekvenování, nekódující varianta, ReNU syndrom, gen *RNU4-2*

SUMMARY

Slabá K, Pokorná P, Koželková K, Hloušková E, Jugas R, Kubátová J, Demlová R, Danhofer P, Jabandžiev P, Svatoňová T, Slabý O. ReNU syndrome – a newly described prevalent neurodevelopmental disorder: first case in Czech Republic

We present the case of a 5 and half year-old boy with severe global developmental delay, hypotonia, severe growth failure, failure to thrive, craniofacial dysmorphism, and other difficulties, who was diagnosed by whole genome sequencing (WGS). The diagnosis was carried out within the Czech national project BabyFox. A pathogenic variant in the *RNU4-2* gene was identified in the patient, which has been associated with the prevalent disorder known as RNU4-2 neurodevelopmental delay syndrome, also known as ReNU syndrome since 2024. Although it is a newly described diseases, ReNU syndrome is one of the most prevalent monogenic neurodevelopmental disorder, with pathogenic variants in the RNU4-2 gene estimated to cause approximately 0.4% of all neurodevelopmental disorders. This gene does not encode a protein but rather a small nuclear RNA U4, which means its sequence is not captured by standard whole-exome sequencing or targeted sequencing panels. As a result, its significance remained overlooked until 2024. The case of ReNU syndrome highlights the importance of whole-genome sequencing, which covers non-coding regions of the genome, in the diagnosis of rare genetic disorders. It also demonstrates how the implementation of modern genomic methods can help end the diagnostic odyssey for patients with previously unexplained neurodevelopmental disorders.

Key words: neurodevelopmental disorder, diagnostic odyssey, whole-genome sequencing, non-coding variant, ReNU syndrome, *RNU4-2* gene.

Korespondující autor:
prof. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.
Univerzitní kampus Bohunice
Biologický ústav LF MU
Kamenice 5
625 00 Brno
oslaby@med.muni.cz

ÚVOD

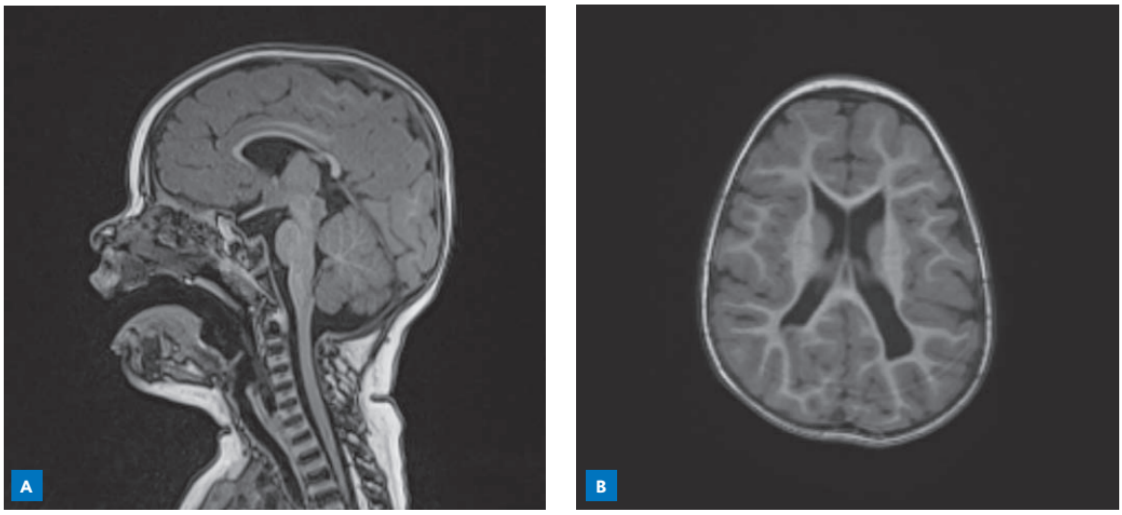
V roce 2024 byly pomocí dvou rozsáhlých studií využívajících celogenomové sekvenování identifikovány patogenní varianty v genu *RNU4-2* pro spliceozomální malou jadernou RNA (snRNA) 4 jako příčina prevalentní autozomálně dominantní syndromické neurovývojové poruchy, tzv. ReNU syndomu či RNU4-2 syndromu neurovývojového opoždění (MIM: 620851).[1,2] Toto nově popsané onemocnění se vyznačuje širokým spektrem klinických projevů. Chen et al. detailně fenotypově zpracovali 49 pacientů s ReNU synromem ze 115 diagnostikovaných s mediánem věku v době stanovení diagnózy 10 let (rozmezí 2–38 let). Mezi nejčastější příznaky patří hypotonie a středně těžké až těžké globální opoždění vývoje se závažně postiženým vývojem intelektu. Hypotonie se obvykle s věkem zlepšuje a většina dětí ve věku 5 let je schopna samostatné chůze. Typickým projevem je také porucha vývoje řeči, většina pacientů je nonverbální či používá pouze několik funkčních slov. Přibližně u poloviny pacientů je diagnostikována porucha autistického spektra. Časté jsou potíže s příjmem potravy, neprospívání a gastroezofageální reflux již od novorozeneckého či časného kojeneckého věku. Mnoho pacientů s ReNU syndromem má malý vzrůst a mikrocefalii (ve většině případů vrozenou). U většiny probandů jsou zaznamenány mozkové abnormality (ventrikulomegalie, dysgeneze corpus callosum, opožděná myelinizace, postupný úbytek bílé hmoty, abnormity adenohypofýzy, hypoplazie mozečku).[3] Epilepsie se vyskytuje přibližně u 70 % pacientů, přičemž medián nástupu je tři roky s variabilním rozmezím od prvního roku života až po 10 let a zahrnuje různé typy záchvatů včetně infantilních spazmů, fokálních, generalizovaných tonicko-klonických záchvatů či febrilních křečí.[2] Většina dětí má oftalmologické potíže, nejčastěji myopii či hypermetropii, strabismus, nystagmus. U menší části dětí byla zaznamenána hypoplazie zrakového nervu a kortikální zraková porucha (CVI). V menší míře se u jedinců vyskytují potíže se sluchem, endokrinopatie (hypotyreóza, deficit růstového hormonu či panhypopituitarismus) či kostní změny, dysplazie kyčelních kloubů a sialorea.[3] Je popisována kraniofaciální dysmorfie společná pro většinu probandů – výrazné čelo, hluboko posazené oči, široký kořen nosu, epikanty, hluboké filtrum, myopatický vzhled obličeje s otevřenými ústy a ústními koutky směřujícími dolů, široké rty, plné tváře, větší ušní boltce.[3–6] Nejčastější klinické projevy s procentuálním zastoupením jsou shrnuty v tabulce 1. Případy pacientů s touto diagnózou v České republice nebyly dosud v odborné literatuře popsány.

Tab. 1: **Prevalence typických znaků popisovaných u pacientů s ReNU syndromem, upraveno dle[2]**

Klinický znak		Procento případů
Růst	IUGR	18 %
	malý vzrůst	76 %
	mikrocefalie (většinou vrozená)	77 %
Neurologické abnormality	globální neurovývojové opoždění (obvykle středně těžké až těžké)	100 %
	mentální postižení (obvykle středně těžké až těžké)	100 %
	různé typy záchvatů	77 %
	porucha autistického spektra	48 %
	potíže s chováním	67 %
	hypotonie	87 %
	schopnost chůze (u dětí nad 5 let)	83 %
	porucha vývoje řeči (většinou nonverbální)	94 %
	porucha spánku	47 %
	anomálie mozku zjištěné na MRI	91 %
Gastrointestinální potíže	zácpa	66 %
	gastroezofageální reflux	49 %
	potíže s krmením	79 %
Porucha sluchu		22 %
Potíže se zrakem		79 %
Endokrinologické potíže		44 %
Kosterní anomálie		64 %
Kraniofaciální dysmorfie		94 %

KAZUISTIKA

Aktuálně 5,5letý chlapec se narodil z druhé gravidity nepříbuzných rodičů jako gemellus A. Jeho starší bratr je sledován pro vývojovou expresivní dysfázii, sestra, gemellus B, je zcela zdravá. Intrauterinně byla u chlapce zjištěna stopová trikuspidální regurgitace, ostatní screeningová vyšetření biochemická i vrozených vývojových vad byla negativní. Od 20. týdne gravidity byl sledován pro intrauterinní růstovou restrikci. Narodil se v 37. týdnu s porodní váhou 2000 g, délkou 44 cm a obvodem hlavy 30 cm (všechny parametry pod 3. percentilem). Porod i poporodní adaptace byly zcela bez komplikací.



Obr. 1: **Magnetická rezonance mozku ve věku 12 měsíců s popisem gracilních frontálních laloků a lehkou dysgenezí corpus callosum**

Ve 4 měsících věku byl hospitalizován k došetření mikrocefalie, psychomotorického opoždění a neprospívání i přes zavedenou fortifikaci stravy. Laboratorní vyšetření odhalila zvýšenou hladinu tyreotropinu (TSH 20,2 mU/l) při normálních hodnotách periferních hormonů štítné žlázy. Ostatní laboratorní výsledky včetně selektivního screeningu dědičných poruch metabolismu nevykazovaly žádné specifické odchylky. Psychomotorický vývoj odpovídal úrovni novorozence, přetrvávalo flekční držení končetin a také některé novorozenecké reflexy v neurologickém nálezu. Kardiologické vyšetření, oční vyšetření, EEG, UZ mozku a břicha byly s normálním nálezem. Genetickým vyšetřením v kojeneckém věku byl stanoven normální mužský karyotyp, bylo provedeno vyšetření metodou arrayCGH (array-based comparative genomic hybridization) k detekci submikroskopických změn chromozomů a vyšetření MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification), zaměřené na nejčastější mikrodeleční syndromy, avšak bez vysvětlení příčiny potíží.

Na MR mozku ve 12 měsících věku byly popsány gracilní frontální laloky, lehká dysgeneze corpus callosum a gracilní adenohypofýza (obr. 1). Myelinizace bílé hmoty odpovídala věku. V klinickém nálezu dominoval centrální hypotonický syndrom s hypotonií převážně axiální, mikrocefalie (obvod hlavy 41 cm, < 0,1 percentil, SDS –3,88), malý proporcionální vzrůst (délka 66,3 cm, < 0,1 percentil, SDS –3,37) a opožděný psychomotorický vývoj, který dosahoval úrovně začátku 2. trimenonu. Kontrolní MR mozku ve 26 měsících byla se stacionárním nálezem. Samostatný sed byl zaznamenán ve 23. měsíci věku a od 25. měsíce byl chlapec schopen samostatně stát, od 4 let je schopen chůze s přidržováním. Ve 4 letech bylo genetické vyšetření rozšířeno a provedeno celoexomové sekvenování v režimu trio (trioWES, vyšetření probanda a jeho rodičů), včetně analýzy mitochondriálního genomu. Nebyla nalezena žádná patogenní varianta, pravděpodobně patogenní varianta ani varianta nejasného významu, která by korelovala s fenotypem chlapce. S odstupem jednoho roku byla provedena bioinformatická reanalýza dat WES také s negativním nálezem. Pro poruchu růstu a nízkou hladinu IGF1 byly ve věku 5 let provedeny funkční endokrinologické testy, které odhalily parciální deficit růstového hormonu a ACTH. U chlapce byla kromě substituce hormonů štítné žlázy zavedena také terapie růstovým hormonem a substituce hydrokortizonem v zátěžových situacích (především v průběhu febrilních stavů). Kromě již výše zmiňovaných potíží byly u chlapce nutné opakované hospitalizace na jednotkách intenzivní péče z důvodu dehydratace, iontového rozvratu a metabolické acidózy, které se velmi rychle rozvinuly během banálních virových infektů se zvracením. Poslední hospitalizace proběhla v listopadu 2024 na jednotce intenzivní péče pro středně těžkou dehydrataci při akutní gastroenteritidě. Výsledky krevních odběrů ukázaly hypernatremii (Na 151 mmol/l) a středně těžkou metabolickou acidózu (pH 7,19; HCO_3 10,7; BE –19,4). Na základě dosud negativních genetických vyšetření a hospitalizace na jednotce intenzivní péče byli chlapec a jeho rodiče po podepsání informovaného souhlasu zařazeni do českého národního projektu BabyFox, a bylo tak možné provést celogenomové sekvenování v rapidním režimu (rapid trioWGS). Byla identifikována *de novo* patogenní varianta n.64_65insG v genu *RNU4-2* v heterozygotním stavu a stanovena diagnóza ReNU syndrom již 7 dní od odběru periferní krve. Aktuálně v 5 a půl letech chlapec měří 96,5 cm (< 0,1 percentil, SDS –3,2), váží 12,5 kg (poměr hmotnost/výška 2,9 percentil, SDS –1,89), obvod hlavy činí 44,5 cm (< 0,1 percentil, SDS –4,79). Není schopen samostatné chůze, je nonverbální, porozumění řeči je výrazně omezené, rozumí pouze některým základním pokynům. Má kraniofaciální dysmorfii, která



Obr. 2: **Kraniofaciální dysmorfie popsaná u probanda – hluboko posazené oči, naznačený hypotelorismus, širší kořen a hřbet nosu, hluboké krátké filtrum, myopatický vzhled obličeje s pootevřenými ústy, plné tváře a větší normálně posazené ušní boltce**

zahrnuje hluboko posazené oči, hypotelorismus, širší kořen a hřbet nosu, hluboké krátké filtrum, pootevřená ústa s ústními koutky směřujícími dolů, větší normálně posazené ušní boltce (obr. 2). Je multioborově sledován na neurologii, endokrinologii, gastroenterologii, v oční ambulanci pro astigmatismus a suspekci na centrální postižení zraku, dále na ortopedii pro valgozitu kotníků a subluxaci levé kyčle. Dle posledního psychologického vyšetření v lednu 2025 jeho vývoj odpovídá hlubokému mentálnímu postižení s mentálním věkem přibližně 6 měsíců. Svým chováním se částečně podobá pacientům s Angelmannovým syndromem, je velmi veselý, kontaktní, má rád hudební hračky, zvukové knížky, lesklé předměty, je fascinován vodou. Rodiče se díky stanovení diagnózy mohli propojit s jinými rodiči prostřednictvím facebookové skupiny „RNU4-2/ReNU Syndrome Family Connect“, která má aktuálně 330 členů, převážně rodičů dětí z USA, Velké Británie, Francie a Španělska. V červenci 2025 se v New Yorku uskuteční první konference na téma ReNU syndrom, kterou rodiče plánují navštívit.

DISKUSE

Sekvenování nové generace se dnes běžně používá jako diagnostický nástroj při výzkumu a diagnostice vzácných onemocnění. Přesto zůstává přibližně 60 % osob s neurovývojovými poruchami bez definitivní diagnózy i po genetickém testování.[7,8] Současné klinické molekulárně genetické testy se téměř výhradně zaměřují na protein kódující geny, protože většina známých monogenních genetických poruch je spojena s patogenními variantami v těchto oblastech. Protein kódující sekvence, označované jako exom, tvoří přibližně 1,5 % lidského genomu. Naopak význam nekódujících oblastí, které představují zbývajících 98,5 % genomu, v patogenezi genetických onemocnění zůstává dosud málo probádaný.[2] Díky rozsáhlým národním iniciativám a rostoucímu využití celogenomového sekvenování (WGS) namísto sekvenování celoexomového (WES), především v rámci výzkumných projektů, se však význam nekódujících oblastí postupně více odhaluje.

Varianty v nekódujících oblastech genomu jsou již dlouho známy jako příčina chorob s mendelovskou dědičností a mohou způsobovat neurovývojová onemocnění prostřednictvím různých mechanismů, například porušením konzervovaných cis-regulačních elementů (enhancery, promotory) nebo narušením exprese či funkce nekódujících RNA (např. miRNA, piRNA, snRNA). Nekódující RNA, které nejsou překládány do struktury proteinů, se podílejí na řadě esenciálních buněčných procesů, jako jsou sestřih, translace nebo regulace genové exprese.[8,9]

Malé jaderné RNA (small nuclear RNA, snRNA) jsou specifickou třídou nekódujících RNA, které hrají klíčovou roli při odstraňování intronů během sestřihu pre-mRNA (prekurzorové messengerové RNA). Ten je v eukaryotických buňkách zajišťován velkým ribonukleoproteinovým komplexem, který je označován jako spliceozom.[9] Poruchy na úrovni jednotlivých komponent spliceozomu již byly opakovaně popsány jako kauzální u řady lidských onemocnění. Například patogenní varianty v genu *RNU12* způsobují autozomálně recesivní časně rozvíjející se mozečkovou ataxii, zatímco varianty v genu *RNU4ATAC* způsobují autozomálně recesivní multisystémové vrozené poruchy zahrnující mikrocefalii, růstovou retardaci a vývojové opoždění (tyto poruchy jsou známy také jako Taybiho–Linderův, Lowryho–Woodův a Roifmanův syndrom).[10–12] Gen *RNU4-2* kóduje snRNA U4, která je součástí hlavního spliceozomu, a patogenní varianty v tomto genu jsou příčinou autozomálně dominantní poruchy.[1,2]

Souvislost mezi genem *RNU4-2* a neurovývojovým onemocněním byla poprvé objevena Greenem et al., kteří zkoumali přítomnost variant ve více než 41 tisících nekódujících

oblastech u 5529 nepříbuzných probandů s neurovývojovými poruchami a 46 401 zdravých kontrol.[1] U 47 případů charakterizovaných poruchou vývoje intelektu, mikrocefalií, malým vzrůstem, hypotonií, záchvaty a motorickým opožděním byly ve dvou oblastech genu *RNU4-2* prokázány *de novo* kauzální varianty. Rozšířením původní kohorty o další veřejně publikované datasety pak zvýšili počet identifikovaných jedinců na 73. Chen et al. identifikovali heterozygotní varianty v tomto genu u 115 probandů s neurovývojovými poruchami, prokázali, že je gen vysoce exprimován ve vyvíjejícím se lidském mozku, a demonstrovali, jak vybrané sekvenční varianty ovlivňují sestřih pre-mRNA.[2] Následně Schot et al. reanalýzou 164 celogenomových trií s negativním nálezem nalezli kauzální variantu u jedné probandky.[3] Nejčastější identifikovanou variantou genu *RNU4-2* byla varianta n.64_65insT, a to přibližně v 75–79 %, druhá nejčastější byla varianta n.77_78insT.[4] Varianta zjištěná u našeho pacienta, n.64_65insG, byla v literatuře popsána u dvou dalších jedinců.

Na základě prevalence ReNU syndromu v těchto studiích se odhaduje, že *de novo* varianty v *RNU4-2* by mohly vysvětlit přibližně 0,4 % všech jedinců s neurovývojovými onemocněními, což činí tuto novou poruchu jednou z nejčastějších vzácných poruch, která však unikala svému objevení, neboť *RNU4-2* stejně jako další nekódující geny, resp. jejich exony, nejsou standardně pokryty pomocí WES.[1,2] Bez použití WGS ve výše uvedených studiích a sekvenaci nekódujících variant proto nebylo možné tyto rekurentní varianty v genu *RNU4-2* s příslušným fenotypem asociovat. Podíl neurovývojových onemocnění vysvětlený variantami v genu *RNU4-2* by mohl být ještě vyšší, pokud by se omezil na jedince s těžkými syndromickými neurovývojovými poruchami. Bohužel diagnostika může být komplikovaná kvůli vysokým finančním nákladům na WGS, které navíc není běžně dostupné v diagnostické praxi. Cílené Sangerovo sekvenování genu *RNU4-2* nebo doplnění metody WES o sondy navržené pro nekódující gen *RNU4-2* (tzv. spike-in technologie) by mohlo tuto mezeru částečně zaplnit. Rozpoznatelné klinické rysy popisované u tohoto syndromu mohou napomoci k lepší identifikaci pacientů, kteří jsou nejvhodnější pro některou z variant tohoto testování, a to jak prospektivně, tak u nevyřešených historických případů.

ZÁVĚR

Navzdory stále pokročilejším molekulárně genetickým a bioinformatickým přístupům využívaným v diagnostice vzácných neurovývojových poruch zůstává až 60 % jedinců bez stanovené diagnózy. Nalezení genu *RNU4-2* v souvislosti s ReNU syndromem pomocí celogenomového sekvenování umožnilo vysvětlit příčinu onemocnění u řady pacientů se vzácnými neurovývojovými poruchami a současně poukázalo na dosud nevyužitý diagnostický potenciál nekódujících oblastí genomu. Zjištění, že varianty genu *RNU4-2* mohou přispět k vysvětlení půl procenta neurovývojových onemocnění, naznačuje, že mnoho dalších jedinců stále čeká na diagnózu způsobenou variantami v nekódujících částech genomu. Zařazení genu *RNU4-2* do standardních klinických a diagnostických postupů u jedinců s těžkým globálním neurovývojovým postižením a dalšími typickými symptomy (hypotonie, mikrocefalie, výše popsaná kraniofaciální dysmorfie, porucha růstu, porucha vývoje řeči, porucha autistického spektra, křeče, abnormality CNS a další) by mohlo ukončit diagnostickou odyseu mnoha pacientů a otevřít cestu k výzkumu nových léčebných metod. |

LITERATURA

1. **Greene D, Thys C, Berry IR, et al.** Mutations in the U4 snRNA gene RNU4-2 cause one of the most prevalent monogenic neurodevelopmental disorders. Nat Med 2024; 30(8): 2165–2169. doi: 10.1038/s41591-024-03085-5
2. **Chen Y, Dawes R, Kim HC, et al.** De novo variants in the RNU4-2 snRNA cause a frequent neurodevelopmental syndrome. Nature 2024; 632(8026): 832–840. doi: 10.1038/s41586-024-07773-7
3. **Schot R, Ferraro F, Geeven G, et al.** Re-analysis of whole genome sequencing ends a diagnostic odyssey: Case report of an RNU4-2 related neurodevelopmental disorder. Clin Genet 2024; 106(4): 512–517. doi: 10.1111/cge.14574
4. **Burns VF, Radford EJ.** ReNU syndrome - a newly discovered prevalent neurodevelopmental disorder. Trends Genet 2024 Nov; 40(11): 914–916. doi: 10.1016/j.tig.2024.09.005.
5. **Barbour K, Bainbridge MN, Wigby K, et al.** The face and features of RNU4-2: a new, common, recognizable, yet hidden neurodevelopmental disorder. Pediatr Neurol 2024; 161: 188–193. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2024.09.015
6. **Rosenblum J, Beysen D, Jansen AC, et al.** RNU4-2-related neurodevelopmental disorder is associated with a recognisable facial gestalt. Clin Genet 2025; 107(1): 104–112. doi: 10.1111/cge.14628
7. **Shin S, Lee J, Kim YG, et al.** Genetic diagnosis of children with neurodevelopmental disorders using whole genome sequencing. Pediatr Neurol 2023; 149: 44–52. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2023.09.003
8. **Turner TN, Eichler EE.** The role of de novo noncoding regulatory mutations in neurodevelopmental disorders. Trends Neurosci 2019; 42(2): 115–127. doi: 10.1016/j.tins.2018.11.002
9. **Esteller M.** Non-coding RNAs in human disease. Nat Rev Genet 2011; 12(12): 861–74. doi: 10.1038/nrg3074
10. **Guguin J, Chen TY, Cuinat S, et al.** A Taybi-Linder syndrome-related RTTN variant impedes neural rosette formation in human cortical organoids. PLoS Genet 2024; 20(12): e1011517. doi: 10.1371/journal.pgen.1011517
11. **Khatri D, Putoux A, Cologne A, et al.** Deficiency of the minor spliceosome component U4atac snRNA secondarily results in ciliary defects in human and zebrafish. Proc Natl Acad Sci U S A 2023; 120(9): e2102569120. doi: 10.1073/pnas.2102569120
12. **Tabib A, Richmond CM, McGaughran J.** Delineating the phenotype of RNU4ATAC-related spliceosomopathy. Am J Med Genet A. 2023; 191(4): 1094–1100. doi: 10.1002/ajmg.a.63110

Příloha 7

Turan K, Pokorna P, Rihova K, Kubatova J, Kozelkova K, Hlouskova E, Danhofer P, Jabandziev P, Demlova R, Damborsky J, Slaby O, Slaba K*. Aicardi-Goutières Syndrome Type 6: Case Report and Structural Prediction Supporting a Dominant-Negative Effect of the ADAR1 c.3019G>A Variant. Clin Case Rep. 2026;14(4):e72146.

Check for updates

Clinical Case Reports

WILEY

Clinical Case Reports Open Access

CASE REPORT OPEN ACCESS

Aicardi-Goutières Syndrome Type 6: Case Report and Structural Prediction Supporting a Dominant-Negative Effect of the *ADAR1* c.*3019G*>A Variant

Katerina Turan[1] | Petra Pokorna[2,3,4] | Kamila Rihova[4] | Jana Kubatova[5] | Katerina Kozelkova[4] | Eliska Hlouskova[4] | Pavlina Danhofer[2,6] | Petr Jabandziev[1,2] | Jiri Damborsky[7,8] | Regina Demlova[5] | Ondrej Slaby[2,3,4,5] | Katerina Slaba[1,2,5]

[1]Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, University Hospital Brno, Masaryk University, Brno, Czech Republic | [2]Center of Precision Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic | [3]Department of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic | [4]Central European Institute of Technology (CEITEC), Masaryk University, Brno, Czech Republic | [5]CREATIC, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic | [6]Department of Pediatric Neurology, Faculty of Medicine, University Hospital Brno, Masaryk University, Brno, Czech Republic | [7]Loschmidt Laboratories, RECETOX, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic | [8]International Clinical Research Centre, St. Anne's University Hospital, Brno, Czech Republic

Correspondence: Katerina Slaba (slaba.katerina@fnbrno.cz)

Received: 2 September 2025 | **Revised:** 22 December 2025 | **Accepted:** 11 January 2026

Keywords: ADAR1 | Aicardi–Goutières syndrome type 6 | dominant-negative effect | structural prediction

ABSTRACT

Aicardi–Goutières syndrome type 6 (AGS6) is a genetically determined autoinflammatory disorder, classically inherited in an autosomal recessive manner. We report a Czech child with a heterozygous *ADAR1* NM_001111.5:c.3019G>A variant causing AGS6. In silico analysis supports a dominant-negative effect, underscoring the need to consider dominant inheritance in AGS6 diagnosis and management.

1 | Introduction

Aicardi–Goutières syndrome (AGS) is a rare multisystemic inherited disorder primarily affecting the immune system and central nervous system. It was first described in 1984 by French pediatric neurologists in eight children from five families who developed progressive encephalopathy during the neonatal or early infancy period. The clinical presentation, mimicking congenital infection, included chronic lymphocytosis in cerebrospinal fluid (CSF), intracranial calcifications, and leukodystrophy, while serological tests for common congenital infections (TORCH) were negative [1]. According to the Orphanet database, over 500 cases of AGS with variable phenotypic manifestations have been published to date. Based on the underlying molecular genetic etiology, the condition is classified into nine types according to the causative gene [2]. However, due to limited awareness, broad phenotypic heterogeneity, and diagnostic challenges, the true prevalence of AGS is presumed to be higher than currently reported [3, 4].

A shared pathogenic mechanism across all AGS subtypes (AGS1–AGS9) is aberrant activation of interferon signaling,

Abbreviations: AD, autosomal dominant (inheritance); AGS, Aicardi–Goutières syndrome; ANZCTR, Australia and New Zealand Clinical Trials Registry; AR, autosomal recessive (inheritance); cDNA, complementary DNA; cGAS, cyclic GMP–AMP synthase; CSF, cerebrospinal fluid; CTIS, European Union's Clinical trials information system; ds, double-strand (nucleic acid); DSH, Dyschromatosis symmetrica hereditaria; HSP, hereditary spastic paraplegia; IFN, interferon; IFNAR, interferon alpha receptor; IFN-I, type I interferons; IRF, interferon regulatory factor; ISGF, interferon-stimulated gene factor; ISRE, interferon-stimulated response elements; JAK, Janus kinase; LINE-1, long interspersed nuclear elements; MAVS, mitochondrial antiviral signaling protein; MDA5, melanoma differentiation-associated protein 5; MRI, magnetic resonance imaging; RIG-I, retinoic acid-inducible gene I; rWGS, rapid whole genome sequencing; SD, standard deviation; STAT, signal transducer and activator of transcription; STING, stimulator of interferon genes; TBK1, TANK-binding kinase 1; TORCH, group of congenital infections; TYK2, tyrosine kinase 2; WHO-ICTRP, World Health Organization International Clinical Trials Registry Platform.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2026 The Author(s). *Clinical Case Reports* published by John Wiley & Sons Ltd.

resulting in chronic autoinflammatory damage [2, 5]. Excessive type I interferon production, particularly IFN-α, exerts neurotoxic effects [6], making central nervous system involvement of varying severity and character a hallmark of the clinical picture. Classical forms manifest as progressive neurological symptoms such as microcephaly, epilepsy, psychomotor delay or regression, dystonia, sleep disturbances, or neonatal seizures [7]. Diagnostic clues include findings from CSF analysis, serum markers, and neuroimaging. Characteristic features are chronic lymphocytosis in CSF, elevated IFN-α and pterins in serum and CSF, and MRI findings of leukodystrophy, intracerebral calcifications (especially periventricular and in the basal ganglia), cerebral atrophy, or vasculopathy [8–11]. A frequent clinical feature is the presence of painful, intermittently appearing, pruritic pernio-like skin lesions, typically located on acral parts of the limbs [12], which may even represent the sole manifestation of the disease in some patients [13]. AGS may also present with nonspecific features of chronic disease such as hepatosplenomegaly, thrombocytopenia [14], endocrinopathies [15], feeding difficulties [16], or ocular abnormalities. Symptom onset most commonly occurs during the first year of life, but cases with adolescent or adult onset have also been reported [17].

Adult cases range from mild forms to severe manifestations, including isolated psychological symptoms or spastic paraplegia [15, 18, 19]. AGS is typically a disabling disorder with a prognosis depending on the specific genetic subtype and severity of clinical involvement. Even when the genetic cause is identified, predicting the disease course remains difficult. While some patients achieve a stable condition, neurological deficits often persist, increasing the patient's dependence on care [20].

Due to its heterogeneous clinical presentation, AGS diagnosis is often delayed and requires a high index of suspicion, particularly in individuals presenting with a phenotype resembling congenital infection in the absence of confirmed infectious agents. Clues such as progressive neurological regression, spastic paraparesis or quadriparesis, microcephaly, or characteristic skin lesions should prompt further investigation. Biochemical abnormalities in CSF, including elevated neopterin and IFN-α levels, lymphocytic pleocytosis, and elevated protein content, can support clinical suspicion. Interpretation of neuroimaging findings depends heavily on the modalities used [21–23]. A definitive diagnosis, therefore, relies on molecular genetic testing.

In the AGS6, which is the focus of this case report, three cases have been described in the literature to date involving a heterozygous pathogenic variant in *ADAR1* identical to the one identified in our patient [24]. ADAR1 plays a critical role in maintaining immune tolerance to self RNA, and its dysfunction, including loss of its A-to-I RNA editing activity, results in inappropriate activation of antiviral pathways. The presumed pathogenic mechanism involves a dominant-negative effect, in which the product of the mutated allele not only lacks normal function but also interferes with the function of the wild-type protein. This mechanism may result in a clinical phenotype resembling that of an autosomal recessive disease. The hypothesis of a dominant-negative mechanism for this specific pathogenic variant has been described in the literature [25]. However, this has not yet been confirmed experimentally nor supported by advanced molecular modeling. In this report, we present the case of a 13-month-old boy with progressive spasticity and psychomotor regression who was diagnosed with AGS type 6 due to a heterozygous *ADAR1* NM_001111.5:c.3019G>A variant.

2 | Case History and Examination

We present the case of a 13-month-old boy referred for evaluation due to progressive spastic paraplegia evolving into quadrispasticity, accompanied by the regression of psychomotor development. Family history was negative, and the patient's sibling was healthy. The boy was born from the second pregnancy of a healthy mother. The third trimester of pregnancy was complicated by gestational hypertension treated with methyldopa. Prenatal ultrasound examinations revealed no abnormalities. Delivery was spontaneous at term, with the newborn being eutrophic and exhibiting an uneventful postnatal adaptation. Early psychomotor development was initially assessed as harmonious and within the broader range of normal. According to the parents, the child had a calm temperament since birth. However, around 6 months of age, he developed marked irritability, progressive spasticity, and regression of both motor and cognitive development. At the first neurological examination, quadrispasticity was observed, with developmental regression corresponding to the level of a neurologically impaired newborn. Somatic examination revealed microcephaly, general hypotrophy, hypogonadism, cryptorchidism, and micropenis. The parents reported difficulties with the introduction of solid foods, the patient was unable to chew and swallowed pieces whole. His diet remained limited to milk formula and blended food. At the age of 13 months, the boy was referred to our department for further evaluation of his overall health status. Anthropometric measurements showed a body length of 71 cm (2nd percentile, standard deviation [SD] −2.08), weight of 7.9 kg (0.6th percentile, SD −2.52) the weight-for-height ratio was within 19th percentile, SD −0.88. Head circumference reached 44 cm (2.1 percentile, SD −2.03). Brain MRI revealed dysgenesis of the corpus callosum with dilatated ventricular system and deepened cerebral sulci corresponding with mild cortical atrophy, and a laminar adenohypophysis with a thinned infundibulum and hypoplastic dimensions for age (< 2 mm) (Figure 1). Laboratory testing showed mildly elevated lactate (3.4 mmol/L), lactate dehydrogenase (5.73 μkat/L), and ALT (1.23 μkat/L). The MRI finding of a hypoplastic pituitary correlated with laboratory-confirmed deficiency of gonadotropins and growth hormone. EEG and EMG did not reveal clear pathological findings. Given the polymorphic, rapidly progressive, and syndromic neurological presentation, the patient was enrolled in the national BabyFox study, a rapid whole-genome sequencing (rWGS) program for seriously or critically ill children, performed in a trio setting (proband and both parents). Whole genome sequencing was performed using the Illumina NovaSeq 6000 system; variant calling was conducted through the DRAGEN pipeline V4.3, and tertiary analysis, including HPO-driven phenotypic prioritization and clinical variant interpretation, was carried out using the

20509094, 2026, 4, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ccr3.72146 by Cochrane Czech Republic, Wiley Online Library on [15/08/2026]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

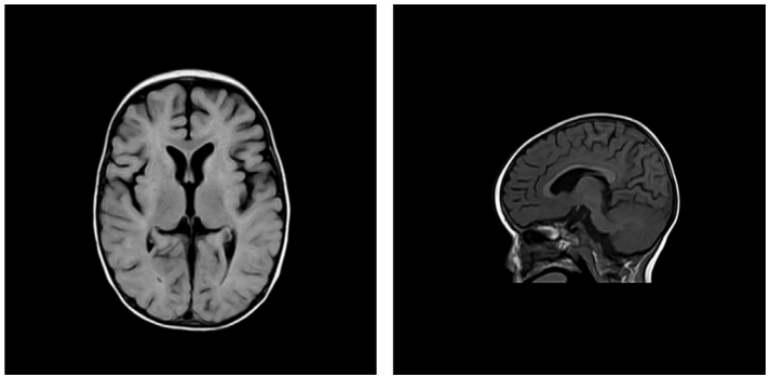


FIGURE 1 | FIGURE 1 Brain MRI performed at 13 months of age. The examination showed deepened cerebral sulci suggesting cerebral atrophy, enlarged ventricular system, dysgenesis of the corpus callosum, and age-appropriate myelination.

Emedgene V36.2 platform (all solutions from Illumina Inc. San Diego, CA, USA). Pathogenic *de novo* heterozygous variant NM_001111.5:c.3019G>A, p.(Gly1007Arg) in the *ADAR1* gene was identified within 5 days of blood collection and subsequently verified by Sanger sequencing (Figure 2).

3 | Differential Diagnosis, Investigations, and Treatment

Pathogenic variants in *ADAR1* are associated with autosomal recessive Aicardi–Goutières syndrome type 6 (MIM: 615010) and autosomal dominant *dyschromatosis symmetrica hereditaria* (DSH, MIM: 127400). Several recent studies have highlighted that probands with *de novo* heterozygous variants in *ADAR1* may present with features resembling spastic paraplegia, hypothesizing a dominant-negative effect of the pathogenic variant [25, 26].

To further support the hypothesis of a dominant-negative effect of the pathogenic variant, we performed advanced molecular modeling (Figure 3). The G1007 residue in ADAR1 is located within the enzyme's catalytic deaminase domain. G1007 is a part of the highly conserved GEG triplet sequence (G1007-E1008-G1009) that resides within the base-flipping loop of the deaminase domain. This loop plays a critical role in the enzyme's ability to flip the targeted adenosine out of the RNA helix and into the active site where deamination occurs [26]. The two glycine residues flanking the catalytic glutamate (E1008) are essential due to their small size and conformational flexibility. These properties allow the crucial catalytic glutamate residue E1008 to intercalate into the minor groove of the dsRNA substrate, a necessary step for facilitating the flipping of the targeted adenosine base [26].

The substitution of glycine, a small and nonpolar amino acid, with arginine, a large and positively charged amino acid, at position 1007 will disrupt this base-flipping mechanism. The bulky side chain of arginine is likely to cause steric hindrance, interfering with the loop conformation and its ability to insert into the minor groove. Moreover, the introduction of a positive charge at this location could alter the electrostatic interactions within the active site and with the dsRNA substrate. Depending on the rotamer of the introduced positively charged arginine R1007, it can form a salt bridge with negatively charged E1008, which would be detrimental to the activity of ADAR1.

The hypothetical dominant-negative effect of the ADAR1 G1007R variant can be attributed to two mechanisms: (a) Mechanism I, **competitive inhibition** through potentially enhanced RNA binding by mutant protein [27], and (b) Mechanism II, the potential **formation of non-functional heterodimers** of the mutant protein with the wild-type protein [28]. Both the enhanced RNA binding leading to competitive inhibition and the formation of non-functional heterodimers can contribute to the overall dominant negative effect observed in individuals with the G1007R variants. The mutant protein's potential to bind RNA with higher affinity could directly block the wild-type enzyme, while its ability to form dysfunctional dimers could further reduce the pool of functional ADAR1 complexes. Currently available experimental data do not allow us to distinguish between the two proposed mechanisms, which must therefore be regarded as hypothetical. In addition, in silico modelling is limited by incomplete structural information in public databases and by the high uncertainty in predicting the relative arrangement of individual domains. Resolving the structure of the ternary complex with bound RNA, including the region carrying the variant identified in this study, would require extensive additional structural analyses, which lie beyond the scope of the present work.

Based on current knowledge, clinical presentation, structural impact of the p.Gly1007Arg variant in ADAR1, and hypothetical mechanisms of dominant-negative effect, the diagnosis of AGS6 was established in this patient.

4 | Conclusion and Results

The patient was referred to a multidisciplinary neurologic and pediatric internal care. Symptomatic treatment focusing on spasticity was initiated. As part of pediatric internal medicine follow-up, dysphagia rehabilitation and stimulation testing of

20509094, 2026, 4, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ccr3.72146 by Cochrane Czech Republic, Wiley Online Library on [15/08/2026]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

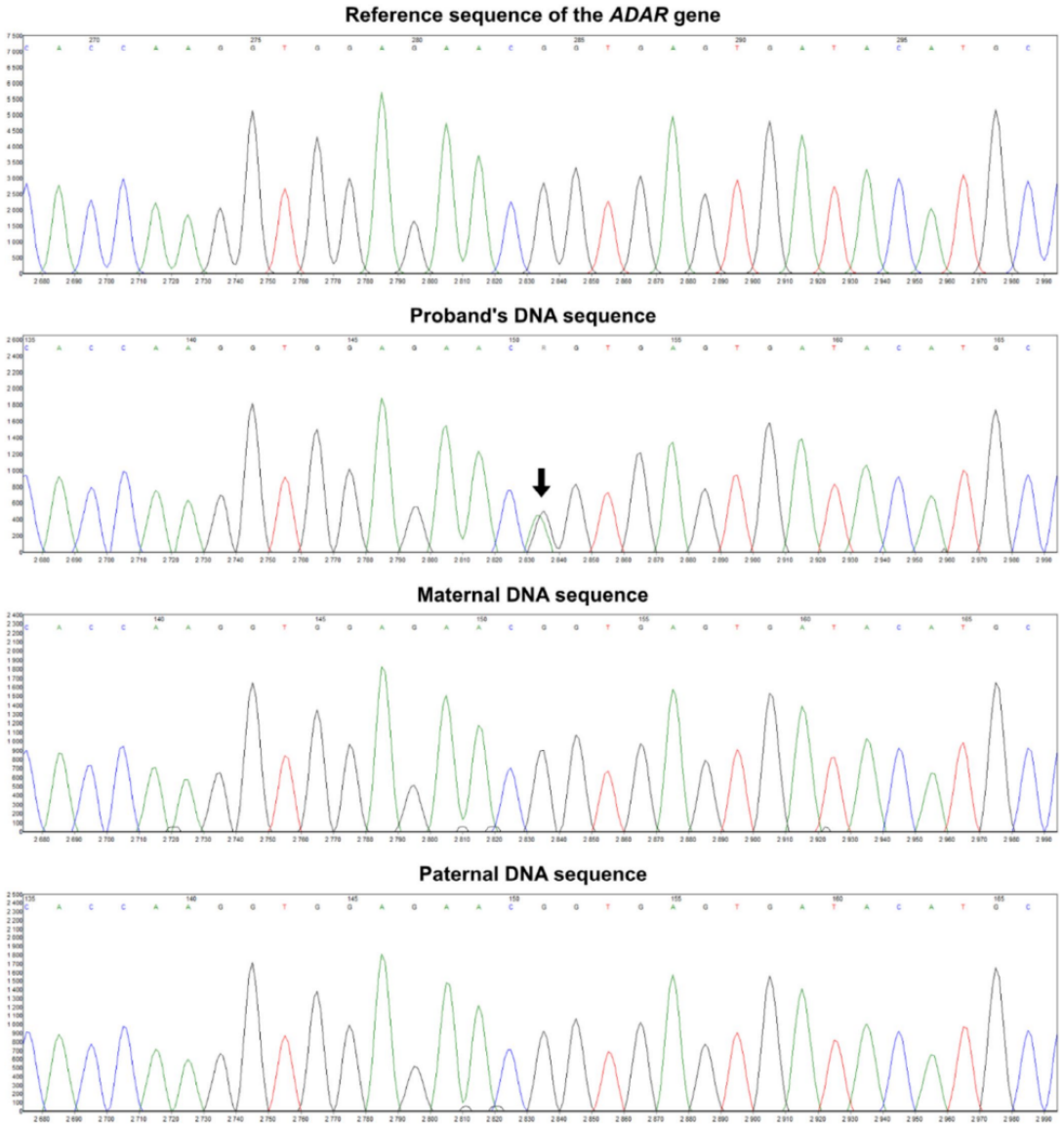


FIGURE 2 | Electrophoretogram depicting the results of Sanger sequencing verification of the *ADAR1* NM_001111.5:c.3019G>A variant in the proband and both parents. A heterozygous G>A peak marked with an arrow is observed exclusively in the proband, with wild-type sequence in both parents, confirming the variant's de novo origin.

the hypothalamic–pituitary axis were indicated, with a view toward hormone replacement therapy and possible surgical correction of cryptorchidism. The family was offered genetic counseling as part of future parental planning.

5 | Discussion

We present the case of a child with a complex spectrum of neurological and somatic manifestations, characterized primarily by progressive spasticity and psychomotor regression. Given the syndromic and rapidly evolving clinical picture, genetic testing was performed. Rapid whole genome sequencing (rWGS) within the BabyFox study, confirmed by Sanger sequencing, identified a heterozygous pathogenic *de novo* variant in the *ADAR1* gene (NM_001111.5:c.3019G>A; p.Gly1007Arg), previously associated with both AGS6 and DSH [29]. This case demonstrates that first-tier rWGS can deliver a timely etiologic diagnosis in critically ill infants with unclear syndromic presentations, curtail unnecessary testing, and guide clinical management.

20509904, 2026, 4, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ccr3.72146 by Cochrane Czech Republic, Wiley Online Library on [15/08/2026]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

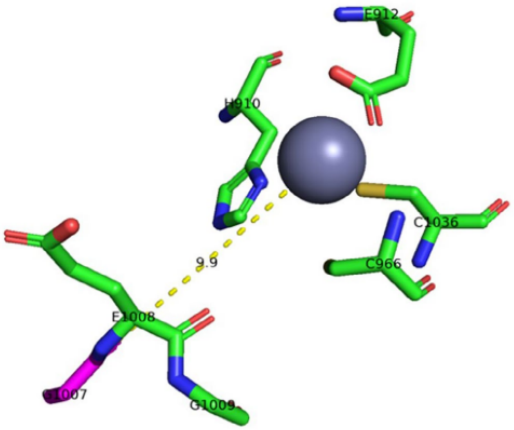


FIGURE 3 | Position of the variant G1007R near the catalytic center of ADAR1. The key residues are shown in stick, while the coordinated catalytic zinc ion is shown as a sphere. The mutated residue G1007 (in purple) is located just next to the R1009 in the GRG loop, which is critical for RNA binding and catalysis. G1007 is at a 9.9 Å distance from the Zn^{2+} (yellow dashed line), which is coordinated by the residues H910, E912, C66 and C1036. The variants G1007R could increase the affinity of the mutant ADAR1 toward the negatively charged phosphate backbone of dsRNA due to an extra positive charge. The structure of ADAR1 was prepared using AlphaFold3 (DeepMind/Google), and the zinc ion was placed from the structure PDB ID 9D5K. The figure was prepared by PyMol.

Although our patient did not present with the full phenotypic picture of either AGS6 or DSH, recent reports [29] describe a clinical phenotype resembling hereditary spastic paraplegia (HSP) in individuals with heterozygous *ADAR1* variants. The brain MRI findings (cortical atrophy, ventricular dilatation, and corpus callosum dysgenesis) were consistent with previously described neuroimaging features in AGS patients. While the absence of intracranial calcifications could raise diagnostic uncertainty, it is known that their detection may be challenging using conventional MRI, particularly in young infants. Imaging techniques such as computed tomography or susceptibility-weighted imaging sequences exhibit significantly higher sensitivity for detecting calcifications but were not performed in this case due to the patient's age and clinical stability at the time of evaluation. No cutaneous signs of DSH, such as hypopigmented or hyperpigmented macules on the face or dorsal aspects of the extremities, were present in our patient. However, the absence of DSH-like cutaneous manifestations in genetically confirmed cases of AGS6 has been documented and may reflect variable expressivity of *ADAR1*, influenced by genetic background and environmental factors. This hypothesis is supported by the significantly higher incidence of clinically evident DSH in East Asian populations compared to other ethnic groups [29].

In this case, the clinical presentation was not suggestive enough to raise early suspicion of AGS. The diagnosis was made based on genetic testing, prior to the availability of cerebrospinal fluid or peripheral interferon-related biomarkers. Although measurement of IFN-α and pterin levels in CSF was initially planned, these tests were not performed due to their limited availability and the invasive nature of lumbar puncture in a neurologically fragile child. The variant NM_001111.5:c.3019G>A (p.Gly1007Arg) in *ADAR1* is associated with incomplete penetrance and variable expressivity, both of which remain poorly understood and may reflect the influence of genetic modifiers. Current evidence suggests a dominant-negative mechanism of pathogenicity, in which the mutant protein not only loses its physiological function but also interferes with the function of the wild-type allele. Structural modeling performed using AlphaFold and PyMOL supports this hypothesis, revealing the location of the mutated residue near the catalytic site of the deaminase domain.

Therapeutic options for AGS remain limited despite advances in molecular diagnostics. The standard of care continues to focus on symptomatic management, primarily targeting spasticity, epilepsy, feeding difficulties, and other systemic manifestations. In the case of the patient presented in this report, a 13-month-old boy with rapidly progressive spasticity, developmental regression, and a *de novo* heterozygous pathogenic variant NM_001111.5:c.3019G>A in the *ADAR1* gene, treatment was initiated within a multidisciplinary care setting, focusing on the management of neurological and endocrine complications. The patient received symptomatic therapy, including central muscle relaxants, rehabilitation, dysphagia intervention, and planned hormonal substitution due to confirmed pituitary insufficiency. Targeted immunomodulatory therapy was not initiated, primarily due to the patient's young age, the lack of robust evidence in the pediatric population, and an unclear risk/benefit ratio.

In recent years, increasing attention has been directed toward the use of Janus kinase (JAK) inhibitors, particularly baricitinib and ruxolitinib, which interfere with the JAK/STAT signaling pathway, a key effector downstream of type I interferon (IFN-I) signaling and the central pathophysiological mechanism in AGS. Published case reports, including one involving the same *ADAR1* variant (p.Gly1007Arg), have described a positive response to a combination of corticosteroids and ruxolitinib, supporting the hypothesis that targeting the downstream IFN-I-mediated inflammatory cascade may be beneficial in selected AGS6 cases [25]. At present, however, no active clinical trials are enrolling patients with *ADAR1* variants, according to regional or global databases (CTIS, ANZCTR, WHO-ICTRP). Compassionate use programs with baricitinib (e.g., NCT01724580, NCT03921554) have been completed. Long-term corticosteroid therapy may help alleviate nonspecific systemic symptoms but does not result in significant neurological improvement. Various alternative methods for managing spasticity have been described in isolated case reports, including deep brain stimulation, intrathecal baclofen pumps [30], or botulinum toxin injections [19], although the effects were either limited or not well defined. Epilepsy associated with AGS generally responds well to standard antiepileptic drugs [31]. Therefore, the treatment of AGS6 remains primarily supportive and symptom-focused, and decisions regarding potential immunomodulatory interventions must be made on an individual basis considering patient age, disease severity, systemic inflammatory activity, and the availability of specialized centers.

To the best of our knowledge, this is the first genetically confirmed case of AGS6 with the c.3019G>A variant reported in a Czech patient. In the presented case, the diagnosis of AGS6

20500904, 2026, 4, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ccr3.72146 by Cochrane Czech Republic, Wiley Online Library on [15/08/2026]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

was established based on rapid molecular genetic testing, which identified a heterozygous pathogenic *ADAR1* variant (NM_001111.5:c.3019G>A; p.Gly1007Arg). Although most AGS subtypes follow autosomal recessive inheritance, AGS6 has been repeatedly associated with autosomal dominant transmission, likely mediated by a dominant-negative effect of the mutant protein on the wild-type allele. Our structural modeling supports this hypothesis, illustrating how the G1007R substitution may interfere with RNA binding and catalysis, and potentially disrupt the function of the wild-type protein in heterozygous individuals. At present, care is focused on symptomatic management, while targeted immunomodulation, including JAK/STAT inhibition, remains investigational [32]. From a diagnostic perspective, AGS should be considered in the differential diagnosis of early-onset neurological regression, particularly in cases mimicking congenital infection without identified pathogens or perinatal risk factors. Early genetic diagnosis can significantly influence clinical decision-making, prognosis, and reproductive counseling.

Author Contributions

Katerina Turan: data curation, writing – original draft. **Petra Pokorna:** formal analysis, investigation, methodology. **Kamila Rihova:** formal analysis, writing – review and editing. **Jana Kubatova:** data curation, writing – review and editing. **Katerina Kozelkova:** data curation, investigation. **Eliska Hlouskova:** formal analysis, investigation. **Pavlina Danhofer:** data curation, writing – review and editing. **Petr Jabandziev:** data curation, resources. **Regina Demlova:** data curation, writing – review and editing. **Jiri Damborsky:** investigation, software, visualization, writing – original draft. **Ondrej Slaby:** conceptualization, resources, supervision, writing – review and editing. **Katerina Slaba:** data curation, methodology, supervision, writing – original draft, writing – review and editing.

Acknowledgments

The authors have nothing to report.

Funding

Supported by the Ministry of Health of the Czech Republic – RVO (University Hospital Brno 65269705) and by the grant of the Faculty of Medicine, Masaryk University: MUNI/A/1591/2023. This publication is also the outcome of the project CREATIC funded from the European Union's Horizon Europe Coordination and Support Action under the Grant agreement number 101059788. Computational resources were provided by the CZECRIN and e-INFRA projects (LM2023049 and 90254), supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic. The Baby Fox study, a national initiative focused on rapid whole-genome sequencing (rWGS) in critically ill children, is conducted in collaboration with Illumina Inc., which provides reagents, bioinformatics solutions and support, through a Collaboration Agreement.

Ethics Statement

The study was approved by the University Hospital Brno Ethics Committee (approval no. 12–071222), and informedconsent was obtained and signed by the patient's parents.

Consent

Written informed consent was obtained from the patient to publish this report in accordance with the journal patient consent policy.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Data Availability Statement

Sequencing data are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

1. J. Aicardi and F. A. Goutières, "Progressive Familial Encephalopathy in Infancy With Calcifications of the Basal Ganglia and Chronic Cerebrospinal Fluid Lymphocytosis," *Annals of Neurology* 15 (1984): 49–54.

2. A. Liu and S. Ying, "Aicardi–Goutières Syndrome: A Monogenic Type I Interferonopathy," *Scandinavian Journal of Immunology* 98 (2023): e13314.

3. L. Svingen, M. Goheen, R. Godfrey, et al., "Late Diagnosis and Atypical Brain Imaging of Aicardi-Goutières Syndrome: Are we Failing to Diagnose Aicardi-Goutières Syndrome-2?," *Developmental Medicine and Child Neurology* 59 (2017): 1307–1311.

4. J. Lambe, O. C. Murphy, W. Mu, et al., "Relapsing-Remitting Clinical Course Expands the Phenotype of Aicardi-Goutières Syndrome," *Annals of Clinical Translational Neurology* 7 (2020): 254–258.

5. Y. J. Crow and D. B. Stetson, "The Type I Interferonopathies: 10 Years on," *Nature Reviews Immunology* 22 (2022): 471–483.

6. C. Fritz-French and W. Tyor, "Interferon-α (IFNα) Neurotoxicity," *Cytokine & Growth Factor Reviews* 23 (2012): 7–14.

7. S. Zhang, W. Zhang, C. Ding, X. Ren, F. Fang, and Y. Wu, "Neurophenotype and Genetic Analysis of Children With Aicardi-Goutières Syndrome in China," *Pediatric Investigation* 30 (2024): 193–200.

8. Y. J. Crow and N. Manel, "Aicardi-Goutières Syndrome and the Type I Interferonopathies," *Nature Reviews Immunology* 15 (2015): 429–440.

9. F. Goutières, "Aicardi-Goutières Syndrome," *Brain & Development* 27 (2005): 201–206.

10. S. Orcesi, R. La Piana, and E. Fazzi, "Aicardi-Goutieres Syndrome," *British Medical Bulletin* 89 (2009): 183–201. PMID: 19129251, https://doi.org/10.1093/bmb/ldn049.

11. S. Volpi, P. Picco, R. Caorsi, F. Candotti, and M. Gattorno, "Type I Interferonopathies in Pediatric Rheumatology, *Pediatric*," *Rheumatology* 14 (2016): 35.

12. Y. J. Crow, D. S. Chase, J. S. Lowenstein, et al., "Characterization of Human Disease Phenotypes Associated With Mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, ADAR, and IFIH1," *American Journal of Medical Genetics: Part A* 167A (2015): 296–312.

13. K. Yarbrough, C. Danko, A. Krol, J. Zonana, and S. Leitenberger, "The Importance of Chilblains as a Diagnostic Clue for Mild Aicardi-Goutières Syndrome," *American Journal of Medical Genetics: Part A* 170 (2016): 3308–3312.

14. G. Rice, T. Patrick, R. Parmar, et al., "Clinical and Molecular Phenotype of Aicardi-Goutieres Syndrome," *American Journal of Human Genetics* 81 (2007): 713–725.

15. C. Worth, A. T. Briggs, R. Padidela, E. Balmer, and M. Skae, "Endocrinopathies in Aicardi Goutières Syndrome-a Descriptive Case Series," *Clinical Case Reports* 8 (2020): 2181–2185.

16. I. P. de Barcelos, S. Woidill, F. Gavazzi, et al., "Systematic Analysis of Genotype-Phenotype Variability in Siblings With Aicardi Goutières Syndrome (Ags)," *Molecular Genetics and Metabolism* 142 (2024): 108346.

20506904, 2026, 4, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ccr3.72146 by Cochrane Czech Republic, Wiley Online Library on [15/08/2026]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

17. Y. J. Crow and J. H. Livingston, "Aicardi-Goutieres Syndrome: An Important Mendelian Mimic of Congenital Infection," *Developmental Medicine and Child Neurology* 50 (2008): 410–416.

18. G. I. Rice, N. Kitabayashi, M. Barth, et al., "Genetic, Phenotypic, and Interferon Biomarker Status in ADAR1-Related Neurological Disease," *Neuropediatrics* 48 (2017): 166–184.

19. K. Tojo, Y. Sekijima, T. Suzuki, et al., "Dystonia, Mental Deterioration, and Dyschromatosis Symmetrica Hereditaria in a Family With Adar1 Mutation," *Movement Disorders* 21 (2006): 1510–1513.

20. D. Piekutowska-Abramczuk, H. Mierzewska, M. Bekiesińska-Figatowska, et al., "Bilateral Striatal Necrosis Caused by Adar Mutations in Two Siblings With Dystonia and Freckles-Like Skin Changes That Should be Differentiated from Leigh Syndrome," *Folia Neuropathologica* 54 (2016): 405–409.

21. S. Laughlin and W. Montanera, "Central Nervous System Imaging. When is CT More Appropriate Than MRI?," *Postgraduate Medicine* 104 (1998): 73–76.

22. A. Vanderver, M. Prust, N. KadomN, et al., "Early-Onset Aicardi-Goutières Syndrome: Magnetic Resonance Imaging (MRI) Pattern Recognition," *Journal of Child Neurology* 30 (2015): 1343–1348.

23. R. La Piana, C. Uggetti, F. Roncarolo, et al., "Neuroradiologic Patterns and Novel Imaging Findings in Aicardi-Goutières Syndrome," *Neurology* 86 (2016): 28–35.

24. A. K. Bauer, I. Marquardt, B. Sundermann, et al., "Case Report: Heterozygous ADAR c.3019G>A Pathogenic Variant Associated With Variable Neurological Symptoms and Incomplete Penetrance in a Four-Generational Family," *Frontiers in Immunology* 16 (2025): 1453496.

25. H. F. Jones, M. Stoll, G. Ho, et al., "Autosomal Dominant ADAR c.3019G>A (p.(G1007R)) Variant is an Important Mimic of Hereditary Spastic Paraplegia and Cerebral Palsy," *Brain & Development* 44 (2022): 153–160.

26. A. Karki, K. B. Campbell, S. Mozumder, A. J. Fisher, and P. A. Beal, "Impact of Disease-Associated Mutations on the Deaminase Activity of ADAR1," *Biochemistry* 63 (2024): 282–293.

27. B. S. Heale, L. P. Keegan, and M. A. O'Connell, "Adars Have Effects Beyond RNA Editing," *Cell Cycle* 8 (2009): 4011–4012.

28. K. Nishikura, "Functions and Regulation of RNA Editing by ADAR Deaminases," *Annual Reviews in Biochemistry* 79 (2010): 321–349.

29. H. Ge, N. Zhang, X. Chen, M. Wang, and T. Ye, "A Novel Mutation of the ADAR1 Gene in a Chinese Family With Dyschromatosis Symmetrica Hereditaria and Literature Review," *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* 17 (2024): 2687–2700.

30. J. H. Livingston, J. P. Lin, R. C. Dale, et al., "A Type I Interferon Signature Identifies Bilateral Striatal Necrosis Due to Mutations in Adar1," *Journal of Medical Genetics* 51 (2014): 76–82.

31. V. De Giorgis, C. Varesio, M. Viri, et al., "The Epileptology of Aicardi-Goutières Syndrome: Electro-Clinical-Radiological Findings," *Seizure* 86 (2021): 197–209.

32. M. L. Frémond, M. Hully, B. Fournier, et al., "JAK Inhibition in Aicardi-Goutières Syndrome: A Monocentric Multidisciplinary Real-World Approach Study," *Journal of Clinical Immunology* 43 (2023): 1436–1447.

20500904, 2026, 4, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ccr3.72146 by Cochrane Czech Republic, Wiley Online Library on [15/08/2026]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Příloha 8

Sustrova E, Rihova K, Pokorna P, Havlova V, Stiborek M, Simek Z, Damborsky J, Horak O, Kozelkova K, Hlouskova E, Demlova R, Kubatova J, Slaby O, Slaba K*. Early-onset hereditary spastic paraplegia type 56 (SPG56): clinical-molecular correlations and functional validation of CYP2U1 variants. BMC Med Genomics. 2026;19(1):117.

Sustrova *et al. BMC Medical Genomics* (2026) 19:117
https://doi.org/10.1186/s12920-026-02394-7

BMC Medical Genomics

CASE REPORT Open Access

Early-onset hereditary spastic paraplegia type 56 (SPG56): clinical-molecular correlations and functional validation of *CYP2U1* variants

Eva Sustrova[1,2†], Kamila Rihova[3,4,5,6†], Petra Pokorna[3,4,5,6], Veronika Havlova[3], Marek Stiborek[7], Zdenek Simek[7], Jiri Damborsky[8,9], Ondrej Horak[10], Katerina Kozelkova[3], Eliska Hlouskova[3], Regina Demlova[6], Jana Kubatova[6], Ondrej Slaby[3,4,5,6*] and Katerina Slaba[1,4,6*]

Abstract

Background Hereditary spastic paraplegia type 56 (SPG56) is a rare autosomal recessive neurodegenerative disorder caused by biallelic variants in the *CYP2U1* gene, which encodes a cytochrome P450 enzyme involved in fatty acid metabolism and mitochondrial function. The clinical spectrum includes progressive spasticity of the lower limbs, developmental delay or regression, cognitive impairment, and variable ophthalmological findings. Although several cases have been reported in recent years, the functional characterization of individual variants remains limited.

Case presentation Here we describe a male patient with early-onset SPG56 carrying two CYP2U1 missense variants, NM_183075.3:c.1376 C > T p.(Pro459Leu) and NM_183075.3:c.557G > A p.(Arg186His). Combined genomic, cellular, and *in silico* analyses confirmed loss of enzymatic activity and protein instability, supporting the pathogenic classification of both variants. Functional validation led to reclassification of the p.(Arg186His) variant from uncertain significance to pathogenic. Further, we link specific CYP2U1 missense changes to convergent molecular defects, thereby refining genotype–phenotype correlations. From a therapeutic perspective, we highlight the relevance of experimental interventions such as folinic acid supplementation and multimodal spasticity management, while emphasizing the future promise of gene therapy for SPG56 patients.

Conclusions Our findings highlight the value of integrating genomic, biochemical, and structural approaches in the diagnostic evaluation of rare neurogenetic disorders, and provide functional evidence that the identified *CYP2U1* variants are damaging, consistent with the observed early-onset complex SPG56 phenotype.

Keywords Hereditary spastic paraplegia, SPG56, CYP2U1, Functional validation, Missense variants, Cytochrome P450, *In silico* modeling

†Eva Sustrova and Kamila Rihova contributed equally to this work.

*Correspondence:
Ondrej Slaby
oslaby@med.muni.cz
Katerina Slaba
slaba.katerina@fnbrno.cz

Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s) 2026. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/.

Background

Hereditary spastic paraplegia (HSP) comprises a heterogeneous group of more than 80 genetic syndromes, primarily affecting motor neurons. The hallmark symptom is progressive spasticity and weakness of the lower extremities due to neurodegeneration of the corticospinal tract. Uncomplicated (or pure) HSP manifests mainly with motor impairment, whereas complicated (or complex) HSP displays additional neurological or extra-neurological features such as intellectual disability, epilepsy, cognitive dysfunction, peripheral neuropathy, or chorioretinal dystrophy. In recent years, an increasing number of causative genes have been identified, with diverse modes of inheritance – autosomal dominant, autosomal recessive, X-linked dominant, or mitochondrial. While individual HSP subtypes are rare or ultra-rare, the overall prevalence of HSP is approximately 1 in 100,000 individuals, depending on the population studied [1–3].

Spastic paraplegia type 56 (SPG56, OMIM#615030) is an autosomal recessive HSP caused by biallelic pathogenic variants in the *CYP2U1* gene, which encodes a member of the cytochrome P450 family [4, 5]. Although the exact function of CYP2U1 in humans is not fully understood, it is predominantly expressed in the central nervous system and thymus [5]. It represents a specific human enzyme that catalyzes ω- and (ω−1)-hydroxylation of long-chain fatty acids, particularly arachidonic acid and docosahexaenoic acid (DHA) [6, 7]. In experimental models, CYP2U1 has been shown to convert arachidonic acid exclusively into two regionally specific metabolites, 19-hydroxy- and 20-hydroxyarachidonic acid (19-HETE and 20-HETE). These products belong to bioactive eicosanoids, acting as local signaling molecules that influence vascular tone, neuronal excitability, Ca^{2+} channel regulation, and immune responses. 19-HETE has been demonstrated to function as an inhibitor of P/Q-type Ca^{2+} channels in Purkinje cells of the cerebellum, suggesting that CYP2U1 may indirectly modulate neurotransmitter release and cerebral microcirculation. Conversely, 20-HETE acts as a vasoconstrictor in cerebral and renal tissues, contributing to the regulation of blood flow and blood pressure. Given the high expression of CYP2U1 in the thymus, a role in immune processes has also been proposed, mediated through the metabolism of polyunsaturated fatty acids that affect lymphocyte proliferation and differentiation. Thus, CYP2U1 activity integrates lipid signaling, neurophysiology, and immune regulation, occupying a unique position among the cytochrome P450 enzymes [6].

To date, 61 pathogenic or likely pathogenic *CYP2U1* variants have been reported in the ClinVar database, most of which are predicted to result in loss of function of the enzyme according to current variant annotations. Approximately 50 individuals with SPG56 have been reported in the literature [8–22]. All of them carried biallelic *CYP2U1* variants, while heterozygous carriers were asymptomatic. SPG56 typically presents in infancy with progressive spastic paraplegia and variable additional features, including intellectual disability, cognitive dysfunction, upper limb involvement, psychiatric manifestations, and MRI abnormalities such as hypomyelination or brain calcifications [10–13, 16, 21]. However, a small number of cases with uncomplicated HSP have been described. In 2025, a case report documented a woman with biallelic pathogenic *CYP2U1* variants who developed adult-onset symptoms at the age of 39 [22], illustrating significant phenotypic and age-related variability. Furthermore, variable maculopathies in patients with biallelic *CYP2U1* variants were first described by Leonardi et al. in 2016 [9] and have since been repeatedly confirmed by other reports [18, 20]. A recent report described two siblings, both compound heterozygotes for the same pathogenic *CYP2U1* variants [20]. One sibling developed neurological symptoms consistent with SPG56 from the age of two but exhibited no visual impairment, whereas the other showed reduced visual acuity at age of 15 years without neurological manifestations. Detailed ophthalmologic evaluations revealed retinal impairment in both individuals, resembling changes seen in macular telangiectasia type 2, with more severe manifestations in the visually impaired sibling. The striking phenotypic discordance, despite identical biallelic genotypes, underscores the unresolved variability of CYP2U1-related disease and the likely contribution of genetic or environmental modifiers.

All reported cases were identified through a systematic literature search using the keywords *CYP2U1* AND (SPG56 OR spastic paraplegia), followed by detailed screening of the described clinical features in each report; overlapping cases were carefully excluded. A summary of the most common symptoms and their percentage occurrence, based on 52 literature-reported cases, is presented in Table 1.

These observations emphasize the importance of publishing detailed case reports of individuals with *CYP2U1* variants. Careful phenotypic characterization across ages and clinical presentations is crucial for identifying potential modifiers, genetic, metabolic, or environmental, that influence disease expression. Such cumulative evidence may refine genotype–phenotype correlations, improve diagnostic protocols for early detection of comorbid symptoms, and support the development of personalized therapeutic strategies.

In this study, we report a patient with early-onset complex SPG56 carrying two *CYP2U1* missense variants and provide their functional characterization using biochemical and structural approaches. Our aim is to contribute additional evidence supporting variant pathogenicity and

Table 1 Prevalence of symptoms in SPG56 patients (based on 52 published cases; references [8–22])

Lower limbs spasticity	92%
Upper limbs spasticity	27%
Neurodevelopmental disorders	52%
Seizures	6%
Dysarthria	29%
Abnormal brain MRI	29%
White matter hyperintensities	19%
Thinning of the corpus callosum	6%
Delayed myelination	6%
Basal ganglia calcification	8%
Unspecified visual impairment	8%
Maculopathy	32%
Pigmentary degenerative	8%
Pseudoxanthoma elasticum	6%
Macular telangiectasia	8%
Unspecified maculopathy	10%

to further delineate the clinical and molecular features associated with CYP2U1-related disease.

Case presentation

We present a Czech male born to healthy non-consanguineous parents. The family does not originate from a known endogamous or genetically isolated population. Proband has an older sister who experienced a mild speech delay but is otherwise healthy, with no neurological symptoms. The mother reported use of acetylsalicylic acid during pregnancy due to a risk of placental abruption; otherwise, the perinatal history was uneventful. Early psychomotor development was within normal limits, with appropriate motor milestones. Between 3 and 4 months of age, the patient began physiotherapy for mild body asymmetry, occasional opisthotonic posturing, and central hypotonia, with limited improvement. At approximately 6 months of age, the physiotherapist noted increased spasticity in the lower limbs, prompting intensified physiotherapy. Over the next two months, motor development further deteriorated, resulting in hospitalization for complex evaluation.

Neurological examinations revealed regression of motor function to a level comparable with a newborn, axial central hypotonia combined with early-stage spasticity of the limbs (more pronounced in the lower limbs and with all typical clinical signs of central motor neuron impairment), variable dystonic posturing of the extremities, and increased regurgitation. Psychosocial development was found to be normal, or at least much less impaired than motor skills. This trend was also evident in subsequent developments. Extensive laboratory work-up, including a comprehensive selective screening for inherited metabolic disorders, revealed no major abnormalities. Only borderline vitamin B12 deficiency and mild vitamin D insufficiency were detected, both of which were corrected with appropriate supplementation. Ultrasound of the abdomen revealed no abnormalities. Additional findings included a closed anterior fontanelle, mild slowing of background activity in the EEG (Supplementary Figure S3), demyelinating changes on EMG (Supplementary Figure S4), and MRI abnormalities consistent with delayed myelination (Fig. 1A, B). Cardiac examination, including EKG and echocardiography, revealed no structural or functional abnormalities. Ophthalmologic assessments were repeatedly normal, with no abnormalities detected on fundoscopic examination.

Given the unclear etiology, further metabolic work-up was performed, along with comprehensive genetic testing. No specific inborn error of metabolism was identified. Genetic testing consisted of karyotyping, array-based comparative genomic hybridization (array-CGH), whole-exome sequencing (WES), and

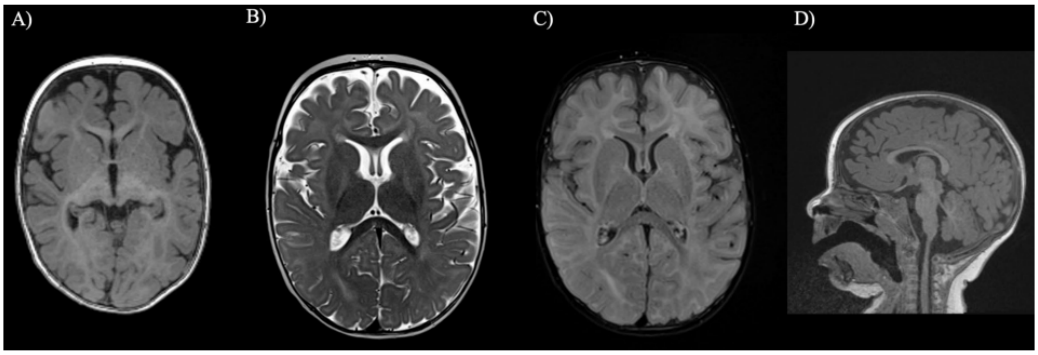


Fig. 1 Brain MRI at 9 months of age. (**A**) T1_tra: bilaterally symmetrical low signal intensity areas in the paraventricular white matter of the frontal lobes (abnormal due to age-dependent process of myelination), (**B**, **C**) T2 + FLAIR_tra: band-like hyperintensities of white matter in both sequences (predominantly in the left frontal and right occipital region), corresponding with delayed myelination, (**D**) T1-weighted sequence, sagittal plane

mitochondrial genome sequencing. The patient had a normal male karyotype, and array-CGH showed no deletions or duplications. Mitochondrial sequencing revealed no variants relevant to the phenotype. WES identified two variants in the *CYP2U1* gene, likely pathogenic variant NM_183075.3:c.1376 C > T p.(Pro459Leu) and variant of uncertain significance NM_183075.3:c.557G > A p.(Arg186His). Subsequent parental testing confirmed the biallelic positions, with each parent being heterozygous for one of the two variants (see Fig. 2). The sister is not a carrier of either of the described *CYP2U1* variants.

Both identified *CYP2U1* variants are extremely rare in population databases. The NM_183075.3:c.1376 C > T p.(Pro459Leu) variant (rs747965749) has a reported allele frequency of approximately 0.00005–0.00006 in gnomAD, while NM_183075.3:c.557G > A p.(Arg186His) (rs746319505) is present at an allele frequency of approximately 0.00001. Given these extremely low frequencies, the probability of their co-occurrence by chance in the same individual is exceedingly low.

In addition to the protein-level effects, we considered the possibility of alternative transcript isoforms that might escape the impact of the identified variants. Interrogation of genome annotation databases (Ensembl and UCSC Genome Browser) indicates that CYP2U1 has a limited number of annotated transcript variants, with the canonical isoform containing both affected residues (Arg186 and Pro459). No well-supported protein-coding isoforms lacking these regions were identified. While the existence of low-abundance or tissue-specific transcripts cannot be entirely excluded, current evidence suggests that alternative splicing is unlikely to provide significant functional compensation for the identified variants.

This genetic finding strongly supported a diagnosis of a compound heterozygote SPG56 and was consistent with the clinical presentation, further reinforcing the genotype–phenotype correlation characteristic of *CYP2U1*-related disease. To further validate the diagnosis, we performed a functional study and *in silico* structure modelling of the NM_183075.3:c.557G > A p.(Arg186His) variant in the *CYP2U1* gene, previously classified as a variant of uncertain significance, as well as confirming the likely pathogenic variant NM_183075.3:c.1376 C > T p.(Pro459Leu) by these approaches.

Functional analysis and *in silico* structure modelling

To determine the ability of CYP2U1 with the missense variants NM_183075.3:c.557G > A p.(Arg186His) or NM_183075.3:c.1376 C > T p.(Pro459Leu) to catalyse the hydroxylation of arachidonic acid to 19-HETE and

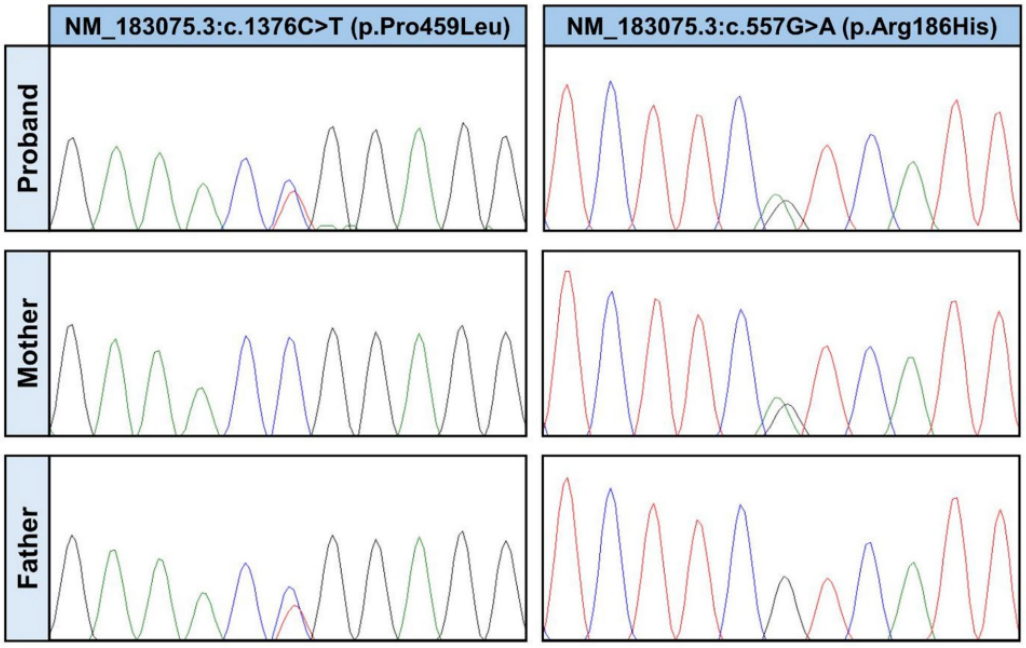


Fig. 2 Sanger sequencing electrophoretograms from segregation analysis. The likely pathogenic NM_183075.3:c.1376 C > T variant was inherited from the unaffected father, while the variant of uncertain significance, NM_183075.3:c.557G > A, was inherited from the unaffected mother

20-HETE isomers, we adapted a method for detecting the products of this enzymatic reaction by LC-MS as described previously [4].

Briefly, full-length human *CYP2U1* cDNA was subcloned into pcDNA3.1(+)IRES_GFP plasmid (Addgene). Gene variants NM_183075.3:c.557G > A and NM_183075.3:c.1376 C > T were generated using Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs) and confirmed by Sanger sequencing. In three independent biological replicates, HEK293T cells (cultured in DMEM with 10% FBS and antibiotics) were seeded at 1×10^4 cells/cm^2 and transfected the next day by each plasmid construct (empty plasmid, CYP2U1 c.557G > A p.(Arg186His), CYP2U1 c.1376 C > T p.(Pro459Leu), or CYP2U1 wild-type) using Lipofectamine 3000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Two days after transfection, cells were harvested in 1×PBS with a protease inhibitor cocktail (Thermo Scientific). Similar expression of each construct in cells was verified by flow cytometry (GFP, data not shown). Cells were then lysed by sonication in lysis buffer (50 mM K-phosphate, pH 7.4, 0.5 M sucrose, 1 mM EDTA). After centrifugation at 20,000 g/4˚C/10 min, the supernatant was collected, and the protein concentration was measured by BCA Protein Assay (Thermo Scientific). 25 µg of total proteins was used for the conventional western blot analysis using anti-CYP2U1 antibody (sc-393368, Santa Cruz Biotechnology) and anti-β-actin antibody (4970 S, Cell Signaling Technology). The protein CYP2U1 was detected only in lysates from cells transfected either with wild-type or p.(Arg186His) variant, but consistently undetectable in the p.(Pro459Leu) variant across all biological replicates, suggesting that this variant results in protein instability (Fig. 3A).

The enzymatic activity of CYP2U1 was determined by incubating 400 µg of total proteins diluted in lysis buffer with 5 µM arachidonic acid (Sigma Aldrich). The samples were first incubated at 37 °C/10 min, then the 2×NADPH regenerating system (Promega) was added (v/v) and the incubation continued at 37 °C for the next 45 min. The reaction was terminated by acidification to pH ~ 3.5 with acetic acid, and the metabolites were extracted twice with ethyl acetate (v/v). After that, ethyl acetate was evaporated (Eppendorf Concentrator Plus), and the residues were diluted in 25 µL of absolute EtOH. Finally, the UHPLC-MS was used to clearly distinguish the 19-HETE

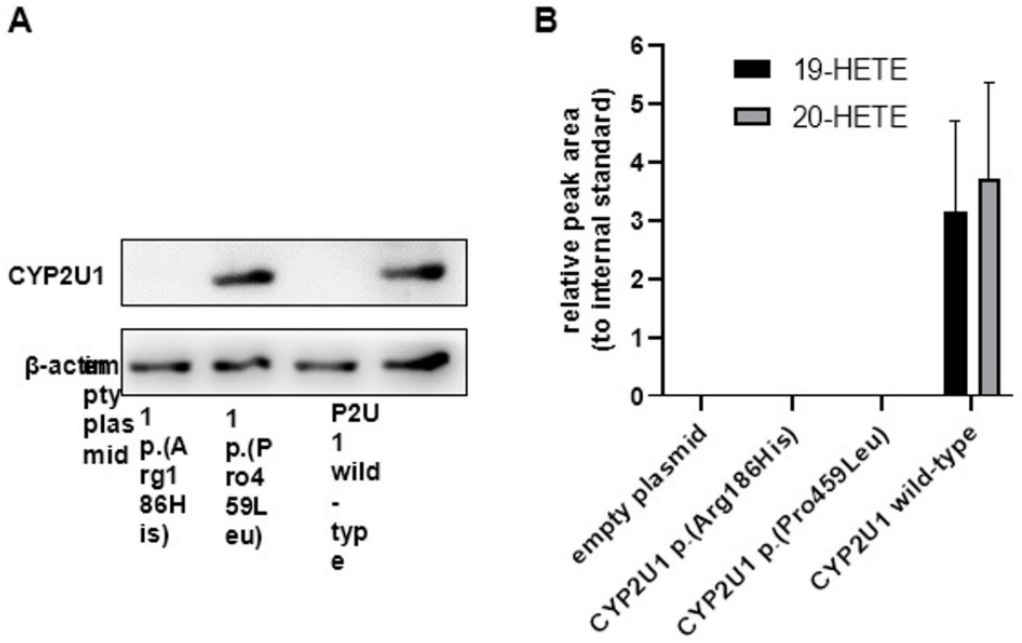


Fig. 3 Detection of protein level and enzymatic activity of CYP2U1 and its variants. (**A**) Western blot analysis of CYP2U1 wild-type and missense variants overexpressed in HEK293T cells; representative immunoblot (anti-CYP2U1: sc-393368, Santa Cruz Biotechnology, and anti-β-actin: 4970 S, Cell Signaling Technology) is shown. (**B**) Relative peak area of the metabolites 19-HETE and 20-HETE detected by UPLC-MS, determining the enzymatic activity of CYP2U1 wild-type and missense variants overexpressed in HEK293T cells; normalized to internal standard 20-HETE-d6; error bars represent SD. Empty plasmid pcDNA3.1(+)IRES_GFP was used as a control. Data were obtained from three independent biological replicates

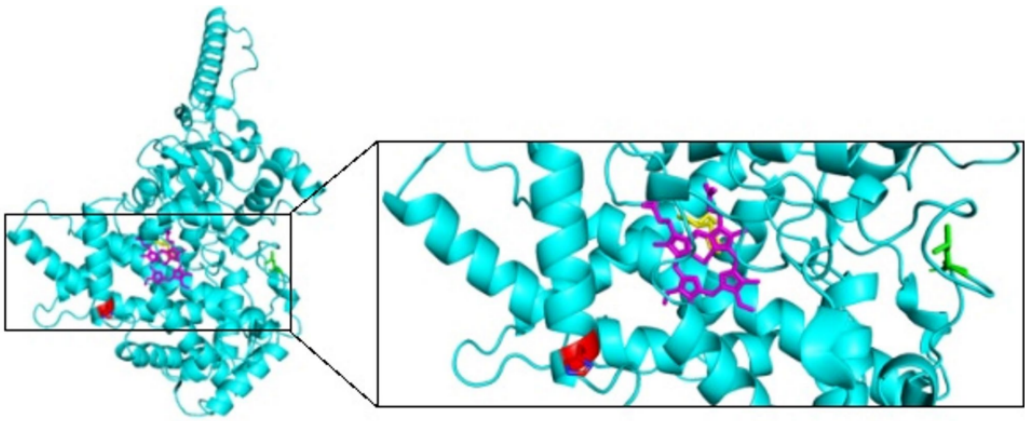


Fig. 4 The structural model of CYP2U1 and localization of mutations. The model downloaded from the AlphaFold Database (ID: AF-Q7Z449-F1-v4) is shown as a ribbon representation: the overall protein structure (left) and a close-up view (right). The location of heme (magenta stick) and the ligand Pilocarpine (yellow stick), bound in the active site, was transferred from homologous structures (PDB IDs 3C6G and 3T3S, respectively) using the AlphaFill algorithm. The localization of mutations Arg186His (red stick) and Pro459Leu (green stick) is shown in the structure of wild-type CYP2U1

and 20-HETE isomers (Supplementary Figure S1) and demonstrate their presence/absence in the sample, while 20-HETE-d6 (Cayman Chemicals) was used as an internal standard. The analysis was performed using an Agilent 1290 Infinity II liquid chromatograph with an Agilent QQQ6495A mass spectrometer, equipped with an Acquity BEH C18 (1.7 µm, 2.1 mm x100 mm, Waters, detailed specifications in Supplementary Methods). The 19-HETE and 20-HETE isomers were detected only in the *CYP2U1* wild-type sample. Neither of the mutant proteins catalyzed the hydroxylation of arachidonic acid to these metabolites (Fig. 3B), with signals in mutant samples consistently below the limit of detection, suggesting the loss of enzymatic activity in the CYP2U1 p.(Arg186His) variant and confirming the pathogenic effect of the CYP2U1 p.(Pro459Leu) variant, probably due to the protein instability.

Next, we used *in silico* modelling to better understand the effect of variants on the protein structure and function. The tertiary structure of CYP2U1 was obtained from AlphaFold DB [23] (Fig. 4). The missing heme group was added using AlphaFill [24] inferred from the homologous structure PDB ID 3C6G. The active site location was determined based on the position of Pilocarpine in the analogous structure PDB ID 3T3S, identified via AlphaFill [25] with further confirmation from multiple ligands detected by AlphaFill. The protein-heme complex was also modelled using AlphaFold3 [26]. Both models were structurally aligned and compared in 3D. Overall, the models obtained from AlphaFold DB and predicted using AlphaFold3 show good structural agreement, including the location and orientation of the heme (Supplementary Figure S2). Site-directed mutations were introduced in both models using PyMOL [27], and their spatial positioning relative to the heme and catalytic pocket was critically analyzed.

The Arg186His mutation is located at the tip of the helix (Fig. 4, red stick). The substitution of a polar arginine for a polar histidine could potentially be tolerated by the structure. This is supported by the AlphaMissense prediction, which assigns a score of 0.49, suggesting an ambiguous effect. Using other prediction algorithms, the probably damaging (PolyPhen2: HDivPred score 1, HVarPred score 0.999; [28]) and deleterious (SIFT v6.2.0: score 0.00, median 4.32; [29], and MutationTaster v2021: Tree vote 70|30 del|benign [30]) effects on protein structure were predicted. The Arg186His mutation is positioned 12 Å away from the heme and is localized on the opposite side of the catalytic pocket. The helix carrying this mutation is in direct contact with the heme, and even a slight distortion due to the Arg186His substitution could impair heme binding or repositioning, leading to a detrimental effect on catalytic function [4]. Loss of heme binding renders the enzyme functionally inactive, compromising its ability to hydroxylate arachidonic acid, a key biochemical process in neuronal maintenance [6].

The Pro459Leu mutation is located on a loop, approximately 18 Å away from the heme (Fig. 4, green stick). This mutation is predicted to be poorly tolerated by the protein structure due to an apparent steric clash between the Leu side chain and adjacent residues in this region. It is expected to cause structural destabilization. This interpretation is further supported by the AlphaMissense prediction, which assigns a score of 0.67, indicating a deleterious effect. This variant is listed in the HGMD database [31] as causative for spastic paraplegia based on primary literature evidence published by Leeson et al. [32].

The NM_183075.3:c.557G > A p.(Arg186His) variant reclassification

The functional and *in silico* analyses complemented the genetic findings, allowing us to propose reclassification of the missense variant NM_183075.3:c.557G > A from uncertain significance to pathogenic in accordance with ACMG Standards and Guidelines criteria [33]. Firstly, WES and subsequent parental testing revealed the biallelic position of this variant with a likely pathogenic variant (NM_183075.3:c.1376 C > T) in our patient (PM3). As demonstrated by a functional study, the variant NM_183075.3:c.557G > A leads to the loss of enzymatic activity of CYP2U1 (PS3), and the deleterious effect was also predicted by *in silico* methods (PP3). In addition, the criteria PM2 (extremely low allele frequency; MAF < 0.01%; gnomAD) and PP2 (missense variants are a common mechanism of disease; [4, 5, 11, 22]) were fulfilled. This variant therefore meets the criteria to be classified as pathogenic (PS3, PM2, PM3, PP2, PP3), and we have accordingly submitted this variant to the ClinVar database with this classification.

Therapeutic approaches

Following the SPG56 diagnosis, we conducted a literature review to explore potential therapeutic considerations. Wong et al. reported a possible association between CYP2U1-related SPG56 and cerebral folate deficiency in two patients, who received long-term oral folinic acid supplementation [19]. The authors described clinical stabilization; however, these observations remain limited and should be interpreted with caution.

In our patient, cerebrospinal fluid (CSF) folate levels could not be assessed due to unsuccessful lumbar punctures, and no direct evidence of folate deficiency was obtained. Oral folinic acid supplementation was nevertheless initiated on an empirical basis, without objective data on treatment response to date. Symptomatic treatment with clonazepam and baclofen was introduced to manage spasticity.

Following the diagnosis, the patient's family connected with an international network of families affected by SPG56 through social media and expressed interest in participation in an upcoming academic clinical trial of gene therapy for CYP2U1-related spastic paraplegia, which is currently being prepared in Australia. Overall, these observations highlight the need for further systematic studies to evaluate potential therapeutic strategies in SPG56.

Discussion and conclusions

Hereditary spastic paraplegia type 56 (SPG56) represents one of the most complex forms of autosomal recessive HSPs due to its variable phenotypic expression and overlapping metabolic and mitochondrial features. The present case adds to the limited number of reported patients with biallelic *CYP2U1* variants and expands the clinical and molecular spectrum of the disease. The early onset and rapid progression observed in our patient are consistent with previously described infantile cases, where motor regression and severe spasticity develop within the first year of life [10, 11, 16]. The combination of NM_183075.3:c.1376 C > T p.(Pro459Leu) and NM_183075.3:c.557G > A p.(Arg186His) variants has not been reported previously, and our functional validation provides direct experimental evidence for their pathogenicity.

Previous studies have shown that CYP2U1 plays an essential role in lipid metabolism and mitochondrial homeostasis [5–7]. The enzyme's ability to hydroxylate arachidonic acid and other polyunsaturated fatty acids generates bioactive eicosanoids (19-HETE, 20-HETE), which are key regulators of neuronal signaling and vascular tone [6]. Pathogenic variants that abolish this enzymatic activity are expected to impair neuronal membrane integrity and synaptic signaling, leading to the progressive motor neuron degeneration characteristic of SPG56. Our findings are in full agreement with earlier reports demonstrating loss of function as the main pathogenic mechanism [4, 12]. The instability of the Pro459Leu protein and the loss of catalytic activity in Arg186His further emphasize that even structurally conservative substitutions can disrupt the enzymatic function of CYP2U1.

The genotype-phenotype correlation in SPG56 remains challenging due to the small number of cases and the presence of considerable intrafamilial variability. Some patients with identical genotypes show only mild spasticity, while others develop severe neurodevelopmental regression or ocular pathology such as maculopathy or retinopathy [9, 18, 22]. In our patient, no visual abnormalities were detected, supporting the notion that ocular involvement is not a universal feature but rather a variable manifestation potentially influenced by environmental or modifier genes. This heterogeneity highlights the need for continuous phenotypic monitoring and data sharing across international registries.

From a diagnostic standpoint, this study demonstrates the importance of integrating comprehensive genomic, biochemical, and structural analyses. Whole-exome sequencing remains the most efficient approach for diagnosing SPG56 and related HSP subtypes. However, as shown here, functional validation can provide decisive evidence for reclassifying variants of uncertain significance into pathogenic categories, in accordance with ACMG guidelines. This approach not only improves diagnostic accuracy but also supports the development of potential genotype-specific therapeutic strategies.

Therapeutically, management of SPG56 remains largely symptomatic. The recently reported association between CYP2U1-related HSP and cerebral folate deficiency

[19] suggests a potential metabolic target in a subset of patients. In our case, despite unsuccessful cerebrospinal folate assessment, empirical folinic acid supplementation was initiated, reflecting the current experimental approach to potentially modifiable metabolic components. The patient's family has also been connected with an international SPG56 community and is preparing to participate in an upcoming academic gene therapy trial in Australia, expected to begin in 2026. This underlines the increasing translational momentum toward personalized treatment in ultra-rare neurogenetic disorders.

This study has several limitations. It is based on a single patient, which limits generalizability and precludes robust genotype–phenotype conclusions. Functional analyses were restricted to *in vitro* assays and may not fully capture *in vivo* disease mechanisms. In addition, CSF folate levels and objective treatment response data were not available, limiting interpretation of potential therapeutic implications.

However, our data expand the current knowledge of CYP2U1-associated hereditary spastic paraplegia type 56 (SPG56) by identifying and functionally characterizing two missense variants, NM_183075.3:c.557G > A p.(Arg186His) and NM_183075.3:c.1376 C > T p.(Pro459Leu). Our findings demonstrate an undetectable enzymatic activity for the p.(Arg186His) variant and indicate that the p.(Pro459Leu) variant leads to protein instability. Both variants disrupt CYP2U1 function through distinct molecular mechanisms. This case highlights the diagnostic and interpretative value of integrating genomic, biochemical, and in silico structural approaches in the evaluation of variant pathogenicity in rare neurogenetic disorders.

These data provide further support for the association between CYP2U1 variants and SPG56 and highlight the need for cautious consideration of experimental therapeutic approaches, such as folinic acid supplementation and symptomatic management of spasticity, while gene therapy remains a potential future direction requiring further evidence. Comprehensive functional validation should be considered an important step in assessing variants of uncertain significance, particularly in rare neurogenetic diseases.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1186/s12920-026-02394-7.

Supplementary Material 1

Supplementary Material 2

Acknowledgements
Not applicable.

Authors' contributions
ES and KR drafted the manuscript. OS conceptualized and designed the study and critically revised the manuscript. KS performed the patient's diagnostic evaluation, collected clinical data, and substantially contributed to manuscript drafting and preparation of the final version. PP performed data analysis and interpretation and critically revised the manuscript. JD contributed to the study conception and design of protein analyses and critically revised the manuscript. JK, OH and RD contributed to data collection and critically revised the manuscript. EH and KK performed laboratory analysis. KR designed the functional analysis. KR, VH, MS, ZS performed the functional analysis and critically revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding
Supported by the Ministry of Health of the Czech Republic – DRO (University Hospital Brno, 65269705) and by the grant of the Faculty of Medicine, Masaryk University: MUNI/A/1591/2023. This publication is also the outcome of the project CREATIC funded from the European Union's Horizon Europe Coordination and Support Action under the Grant agreement number 101059788. Computational resources were provided by the CZECRIN and e-INFRA projects (LM2023049 and 90254), supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic. The analytical part of the work was carried out with the support of the RECETOX Research Infrastructure (ID LM2023069, MEYS CR, 2023–2026).

Data availability
The datasets generated and/or analysed during the current study are available in the ClinVar repository, [Accession numbers: SCV006311003, SCV006586705].

Declarations

Ethics approval and consent to participate
The study was approved by the University Hospital Brno Ethics Committee (approval no. 12-071222) and conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained and signed by the patient's parents. Patient identification and other personal information that could be used to reveal the identity of the patient were protected.

Consent for publication
Parents of the patient presented in this case report consented to the publication. The written consent form was signed.

Competing interests
The authors declare no competing interests.

Author details
[1]Department of Pediatrics, University Hospital Brno, Faculty of Medicine, Masaryk University, Cernopolni 9, Brno 613 00, Czech Republic
[2]Department of Medical Genetics and Genomics, Faculty of Medicine, University Hospital Brno, Masaryk University, Brno, Czech Republic
[3]CEITEC, Masaryk University, Brno, Czech Republic
[4]Center of Precision Medicine, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic
[5]Department of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Kamenice 5, Brno 625 00, Czech Republic
[6]Faculty of Medicine, CREATIC, Masaryk University, Brno, Czech Republic
[7]Faculty of Science, RECETOX, Masaryk University, Brno, Czech Republic
[8]Loschmidt Laboratories, RECETOX and Department of Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic
[9]International Clinical Research Centre, St. Anne's University Hospital, Brno, Czech Republic
[10]Department of Pediatric Neurology, Faculty of Medicine, University Hospital Brno, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Received: 8 February 2026 / Accepted: 14 May 2026
Published online: 27 May 2026

References

1. Meyyazhagan A, Orlacchio A. Hereditary Spastic Paraplegia: An Update. Int J Mol Sci. 2022;23(3):1697. https://doi.org/10.3390/ijms23031697.
2. Panza E, Meyyazhagan A, Orlacchio A. Hereditary spastic paraplegia: Genetic heterogeneity and common pathways. Exp Neurol. 2022;357:114203. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2022.114203.
3. Murala S, Nagarajan E, Bollu PC. Hereditary spastic paraplegia. Neurol Sci. 2021;42(3):883–94. https://doi.org/10.1007/s10072-020-04981-7.
4. Durand CM, Dhers L, Tesson C, Tessa A, Fouillen L, Jacqueré S, et al. CYP2U1 activity is altered by missense mutations in hereditary spastic paraplegia 56. Hum Mutat. 2018;39(1):140–51. https://doi.org/10.1002/humu.23359.
5. Tesson C, Nawara M, Salih MA, Rossignol R, Zaki MS, Al Balwi M, et al. Alteration of fatty-acid-metabolizing enzymes affects mitochondrial form and function in hereditary spastic paraplegia. Am J Hum Genet. 2012;91(6):1051–64. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.11.001.
6. Chuang SS, Helvig C, Taimi M, Ramshaw HA, Collop AH, Amad M, et al. CYP2U1, a novel human thymus- and brain-specific cytochrome P450, catalyzes omega- and (omega-1)-hydroxylation of fatty acids. J Biol Chem. 2004;279(8):6305–14. https://doi.org/10.1074/jbc.M311830200.
7. Nouri K, Pietrancosta N, Le Corre L, Dansette PM, Mansuy D, Boucher JL. Human Orphan Cytochrome P450 2U1 Catalyzes the ω-Hydroxylation of Leukotriene B4. Int J Mol Sci. 2022;23(23):14615. https://doi.org/10.3390/ijms232314615.
8. Citterio A, Arnoldi A, Panzeri E, D'Angelo MG, Filosto M, Dilena R, et al. Mutations in CYP2U1, DDHD2 and GBA2 genes are rare causes of complicated forms of hereditary spastic paraparesis. J Neurol. 2014;261(2):373–81. https://doi.org/10.1007/s00415-013-7206-6.
9. Leonardi L, Ziccardi L, Marcotulli C, Rubegni A, Longobardi A, Serrao M, et al. Pigmentary degenerative maculopathy as prominent phenotype in an Italian SPG56/CYP2U1 family. J Neurol. 2016;263(4):781–3. https://doi.org/10.1007/s00415-016-8066-7.
10. Masciullo M, Tessa A, Perazza S, Santorelli FM, Perna A, Silvestri G. Hereditary spastic paraplegia: Novel mutations and expansion of the phenotype variability in SPG56. Eur J Paediatr Neurol. 2016;20(3):444–8. https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2016.02.001.
11. Kariminejad A, Schöls L, Schüle R, Tonekaboni SH, Abolhassani A, Fadaee M, Rosti RO, Gleeson JG. CYP2U1 mutations in two Iranian patients with activity induced dystonia, motor regression and spastic paraplegia. Eur J Paediatr Neurol. 2016;20(5):782–7. https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2016.05.013.
12. Minase G, Miyatake S, Nabatame S, Arai H, Koshimizu E, Mizuguchi T, et al. An atypical case of SPG56/CYP2U1-related spastic paraplegia presenting with delayed myelination. J Hum Genet. 2017;62(11):997–1000. https://doi.org/10.1038/jhg.2017.77.
13. Tonduti D, Panteghini C, Pichiecchio A, Decio A, Carecchio M, Reale C, Cerebral Calcification International Study Group, Chiapparini L, Garavaglia B, Orcesi S, et al. Encephalopathies with intracranial calcification in children: clinical and genetic characterization. Orphanet J Rare Dis. 2018;13(1):135. https://doi.org/10.1186/s13023-018-0854-y.
14. Zulfiqar S, Tariq M, Ali Z, Fatima A, Klar J, Abdullah U, et al. Whole exome sequencing identifies novel variant underlying hereditary spastic paraplegia in consanguineous Pakistani families. J Clin Neurosci. 2019;67:19–23. https://doi.org/10.1016/j.jocn.2019.06.039.
15. Bibi F, Efthymiou S, Bourinaris T, Tariq A, Zafar F, Rana N, et al. Rare novel CYP2U1 and ZFYVE26 variants identified in two Pakistani families with spastic paraplegia. J Neurol Sci. 2020;411:116669. https://doi.org/10.1016/j.jns.2020.116669.
16. Legrand A, Pujol C, Durand CM, Mesnil A, Rubera I, Duranton C, et al. Pseudoxanthoma elasticum overlaps hereditary spastic paraplegia type 56. J Intern Med. 2021;289(5):709–25. https://doi.org/10.1111/joim.13193.
17. Sharawat IK, Panda PK, Dawman L. Spastic Paraplegia-56 due to a Novel CYP2U1 Truncating Mutation in an Indian Boy: A New Report and Literature Review. J Pediatr Neurosci. 2021;16(1):71–4. https://doi.org/10.4103/jpn.JPN_86_20.
18. El Matri K, Falfoul Y, Habibi I, Chebil A, Schorderet D, El Matri L. Macular Dystrophy with Bilateral Macular Telangiectasia Related to the CYP2U1 Pathogenic Variant Assessed with Multimodal Imaging Including OCT-Angiography. Genes (Basel). 2021;12(11):1795. https://doi.org/10.3390/genes12111795.
19. Wong SS, Yuen LY, Kan E, Blau N, Rodenburg R, Lam CW, et al. CYP2U1: An emerging treatable neurometabolic disease with cerebral folate deficiency in 2 Chinese brothers. Mol Genet Metab Rep. 2023;38:101023. https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2023.101023.
20. Sallo FB, Dysli C, Holzer FJ, Ranza E, Guipponi M, Antonarakis SE, et al. Characterization of the Retinal Phenotype Using Multimodal Imaging in Novel Compound Heterozygote Variants of CYP2U1. Ophthalmol Sci. 2024;5(1):100618. https://doi.org/10.1016/j.xops.2024.100618.
21. Sadr Z, Ghasemi A, Rohani M, Khorram Khorshid HR, Habibi-Kavashkohie MR, Mohammadi Y, Alavi A. Three Iranian patients with rare subtypes of hereditary spastic paraplegia (HSP): SPG76, SPG56, and SPG69. Neurogenetics. 2024;26(1):12. https://doi.org/10.1007/s10048-024-00789-1.
22. Yu HP, Zou J, Chen X, Chen Y, Ruan DD, Chen Q, et al. Diagnostic journey and genetic analysis of a novel homozygous CYP2U1 mutation causing autosomal recessive spastic paraplegia type 56 (SPG56) in a consanguineous family. BMC Neurol. 2025;25(1):207. https://doi.org/10.1186/s12883-025-04211-7.
23. Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, et al. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. Nucleic Acids Res. 2022;50(D1):D439–44. https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061.
24. Varadi M, Bertoni D, Magana P, Paramval U, Pidruchna I, Radhakrishnan M, et al. AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. Nucleic Acids Res. 2024;52(D1):D368–75. https://doi.org/10.1093/nar/gkad1011.
25. Hekkelman ML, de Vries I, Joosten RP, Perrakis A. AlphaFill: enriching AlphaFold models with ligands and cofactors. Nat Methods. 2023;20(2):205–13. https://doi.org/10.1038/s41592-022-01685-y.
26. Abramson J, Adler J, Dunger J, Evans R, Green T, Pritzel A, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. Nature. 2024;630(8016):493–500. https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w.
27. Schrödinger L, DeLano W. PyMOL. 2020; Retrieved from http://www.pymol.org/pymol
28. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. Curr Protoc Hum Genet. 2013;Chap7–Unit720. https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0720s76.
29. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. Nat Methods. 2014;11(4):361–2. https://doi.org/10.1038/nmeth.2890.
30. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. Nucleic Acids Res. 2003;31(13):3812–4. https://doi.org/10.1093/nar/gkg509.
31. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Chapman M, Evans K, Azevedo L, et al. The Human Gene Mutation Database (HGMD®): optimizing its use in a clinical diagnostic or research setting. Hum Genet. 2020;139(10):1197–207. https://doi.org/10.1007/s00439-020-02199-3.
32. Leeson HC, Goh D, Coman D, Wolvetang EJ. Generation of iPSC lines from hereditary spastic paraplegia 56 (SPG56) patients and family members carrying CYP2U1 mutations. Stem Cell Res. 2022;64:102917. https://doi.org/10.1016/j.scr.2022.102917.
33. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, ACMG Laboratory Quality Assurance Committee, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015;17(5):405–24. https://doi.org/10.1038/gim.2015.30.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Příloha 9

Slabá K, Pokorná P, Říhová K, Demlová R, Slabý O. Výzvy a perspektivy diagnostiky dětských pacientů bez diagnózy a přehled léčebných možností u vzácných onemocnění. Neurol Praxi. 2026;27(2):89–95.

Výzvy a perspektivy diagnostiky dětských pacientů bez diagnózy a přehled léčebných možností u vzácných onemocnění

MUDr. Kateřina Slabá, Ph.D.[1,4], Mgr. Petra Pokorná[2,3,4], Mgr. Kamila Říhová, Ph.D.[2,3], doc. MUDr. Regina Demlová, Ph.D.[5], prof. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.[2,3,4]

[1]Pediatrická klinika Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno
[2]CEITEC, Masarykova univerzita, Brno
[3]Biologický ústav, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno
[4]Centrum precizní medicíny, Fakultní nemocnice, Brno
[5]CREATIC, Lékařská fakulta Masarykovy Univerzity, Brno

Vzácná onemocnění představují rozsáhlou a heterogenní skupinu převážně geneticky podmíněných chorob. V současnosti je známo více než šest tisíc klinických jednotek, které v souhrnu postihují přibližně 6–8 % celosvětové populace a představují významnou zdroj? zdravotnickou i socioekonomickou zátěž. Významný pokrok v molekulární genetice, zejména zavedení celoexomového a celogenomového sekvenování, výrazně zkrátil dobu k určení diagnózy a umožnil odhalit nové genetické příčiny onemocnění. Přesto zůstává přibližně polovina pacientů bez stanovené diagnózy. Cílená kauzální terapie je v současnosti dostupná pouze pro malý podíl těchto chorob, což zdůrazňuje potřebu dalšího výzkumu a inovací v oblasti precizní medicíny. Článek se zaměřuje na přehled současných diagnostických a terapeutických přístupů a na perspektivy, které přinášejí nové genomické technologie a cílené léčebné strategie.

Klíčová slova: vzácná onemocnění, nediagnostikovaní pacienti, diagnostická odysea, pokročilá genetická diagnostika, personalizovaná medicína, drug repurposing.

Challenges and perspectives in the diagnosis of undiagnosed pediatric patients and an overview of therapeutic options in rare diseases

Rare diseases represent a broad and heterogeneous group of disorders that are predominantly genetically determined. Currently, more than six thousand clinical entities have been identified, which collectively affect approximately 6–8% of the global population and pose a significant healthcare and socioeconomic burden. Major advances in molecular genetics, particularly the introduction of whole-exome and whole-genome sequencing, have markedly shortened the time to diagnosis and enabled the discovery of new genetic causes of disease. Nevertheless, approximately half of all patients remain without a causal diagnosis. At present, targeted causal therapy is available for only a small proportion of these disorders, highlighting the need for continued research and innovation in the field of precision medicine. This article focuses on an overview of current diagnostic and therapeutic approaches and on the perspectives offered by emerging genomic technologies and targeted treatment strategies.

Key words: rare diseases, undiagnosed patients, diagnostic odyssey, advanced genetic diagnostics, personalized medicine, drug repurposing.

DECLARATIONS:

Declaration of originality:
The manuscript is original and has not been published or submitted elsewhere.

Ethical principles compliance:
The authors attest that their study was approved by the local Ethical Committee and is in compliance with human studies and animal welfare regulations of the authors' institutions as well as with the World Medical Association Declaration of Helsinki on Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects adopted by the 18th WMA General Assembly in Helsinki, Finland, in June 1964, with subsequent amendments, as well as with the ICMJE Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals, updated in December 2018, including patient consent where appropriate.

Conflict of interest:
Not applicable.

Consent for publication:
Not applicable.

Cit. zkr: ***Neurol. praxi.*** **2026;27(2):?**
https://**doi**.org/**10.**
Článek přijat redakcí: 14. 11. 2025
Článek přijat k publikaci: 9. 3. 2026

MUDr. Kateřina Slabá, Ph.D.
slaba.katerina@fnbrno.cz

Úvod

Vzácná onemocnění se mezinárodně liší svým definičním vymezením. V rámci EU, a tedy také v České republice, jsou vzácná onemocnění definována jako život ohrožující nebo závažná chronická onemocnění, jejichž prevalence je nižší než 5 osob z 10 000 (1 : 2 000), a která jsou spojena s významným nárůstem morbidity a mortality nebo značným snížením kvality života postižených (definice podle Evropské komise) (Macek, 2019). Ve Spojených státech je za vzácné onemocnění považováno takové, kterým trpí méně než 200 000 obyvatel USA (odpovídá prevalenci cca 1 : 1 600) (Thomas et al., 2019). Tuto definici založenou na prevalenci zavádí v USA poprvé Orphan Drug Act z roku 1983, federální zákon, který byl vytvořen na podporu výzkumu vzácných onemocnění a vývoje léčiv. Zákon dále uvádí, že se jedná o onemocnění, „u nichž nelze důvodně předpokládat, že náklady na vývoj a zpřístupnění léku pro takové onemocnění bude možné uhradit z prodeje takového léku ve Spojených státech". V Japonsku je onemocnění vzácné, pokud je jím postiženo méně než 50 000 obyvatel (odpovídá prevalenci cca 1 : 2 500) (Hayashi et Umeda, 2008). Ačkoli jednotlivé diagnózy se v populaci vyskytují jen sporadicky, souhrnně se odhaduje, že vzácné onemocnění postihuje 6–8 % populace, tedy přibližně 30 milionů Evropanů. V celosvětovém měřítku jde o odhadovaných 300 milionů osob. V rámci této rozsáhlé skupiny se dále vymezují tzv. ultra-vzácná onemocnění, která postihují ještě menší podíl pacientů a jsou spojena s mimořádnými obtížemi v diagnostice, výzkumu i terapii. Ultra-vzácná onemocnění bohužel nemají obecně akceptovanou prevalenční definici. V literatuře lze naleznout různé definice. Někteří autoři uvádějí jako hranici prevalenci nižší než jeden pacient na 200 tisíc osob (Smith et al., 2022), jiní definují ultra-vzácné onemocnění na základě počtu celosvětově popsaných případů, který by měl být nižší než 30 (Crooke, 2022). Absence jakéhokoli formálního regulačního rozlišení mezi vzácnými a ultra-vzácnými chorobami však vytváří problematickou šedou zónu jak pro pacienty, tak pro potenciální výrobce léků. Je důležité vnímat skutečnost, že dle databáze Orphanet má přibližně 85 % z 6 000 katalogizovaných vzácných onemocnění prevalenci nižší než 1 na milion a spadalo by tedy do kategorie ultra-vzácných onemocněních (viz Obr. 1). A to mluvíme pouze o pacientech, jejichž choroba již byla alespoň popsána. Stanovit počet pacientů v populaci, kteří trpí ultra-vzácnou geneticky podmíněnou chorobou, která ještě nikdy popsána nebyla, lze bohužel jen velice těžko. Odhaduje se, že přibližně 50 % případů zůstává nediagnostikovaných, a to nejen kvůli složitosti klinického obrazu a limitům současných diagnostických metod, ale také proto, že řada těchto chorob dosud nebyla plně popsána nebo geneticky identifikována. Vzhledem k tomu, že dominantní část těchto onemocnění se klinicky manifestuje již v dětském věku, hovoříme potom o **dětských pacientech bez diagnózy**. Významná část těchto onemocnění má neurologickou manifestaci, přičemž u dětských pacientů je zastoupení neurologické symptomatiky ještě vyšší. Podle recentních studií se až polovina všech vzácných onemocnění projevuje primárně neurologickými příznaky (The Lancet Neurology, 2022). Přibližně 80 % má genetický původ (Boycott et al., 2019) a manifestuje se již v raném věku nejčastěji formou epilepsie, opožděním psychomotorického vývoje, hypotonie, pohybových poruch nebo progresivní svalovou slabostí. Klinický obraz bývá nespecifický, což často vede k opožděné nebo nesprávné diagnóze. Dle výsledků posledního mezinárodního dotazníkového šetření Rare Barometer organizace EURORDIS z roku 2024 trvá doba od prvních příznaků do stanovení přesné diagnózy v Evropě v průměru 4,7 roku (Faye et al., 2024), přičemž toto období intenzivního hledání diagnózy, často spojeného s opakovanými návštěvami zdravotnických zařízení a konzultacemi různých specialistů, označujeme u vzácných onemocnění termínem **diagnostická odysea**. Tento pojem vystihuje dlouhou a často frustrující cestu pacienta i jeho rodiny k nalezení přesné příčiny potíží, která bývá doprovázena nejistotou, psychickou zátěží a oddálením zahájení případné adekvátní léčby. S ohledem na vysokou variabilitu klinických projevů, genetickou heterogenitu a nízkou prevalenci jednotlivých onemocnění představují vzácné choroby v dětské neurologii mimořádnou diagnostickou i terapeutickou výzvu. Přestože v posledním desetiletí došlo díky rozvoji molekulární genetiky, genomických technologií a evropské spolupráci k významnému zkrácení diagnostické odysey, mnoho pacientů zůstává dosud bez přesné etiologické klasifikace a tím i bez možnosti adekvátní léčby. Cílem tohoto přehledového článku je shrnout současné poznatky o diagnostických postupech u dětských pacientů bez stanovené diagnózy a podat přehled dostupných i rozvíjených terapeutických přístupů u vzácných onemocnění, zejména z pohledu evropského kontextu.

Diagnostické výzvy u dětských pacientů bez diagnózy

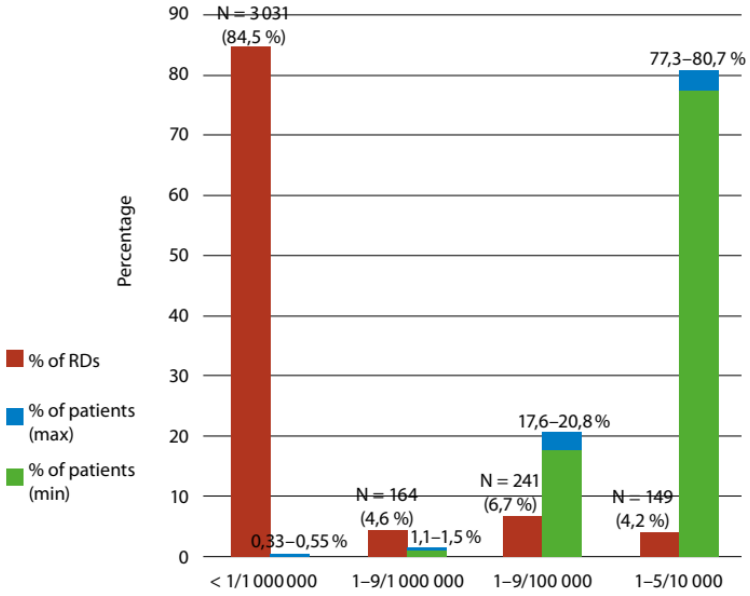
Cílem řady odborných organizací a podpůrných sítí je zajistit dostupnost specializovaných pracovišť pro pacienty bez dosud stanovené diagnózy – **diagnostická výzva**. I když se v první fázi jedná především o stanovení diagnózy, role těchto pracovišť spočívá také v zajištění potřebné **multidisciplinární péče**, nastavení léčebného plánu a dlouhodobého sledování těchto pacientů nezávisle na znalosti kauzální diagnózy. Pomocí vysokokapacitních sekvenačních metod se dnes daří určit genetickou příčinu onemocnění přibližně u 50 % z nich, a počet diagnostikovaných pacientů s ultra-vzácnými onemocněními tak rychle roste (Crook, 2022).

Diagnostické možnosti vzácných onemocnění se v posledních několika desetiletích dramaticky rozvíjely, zejména díky pokroku v oblasti molekulární biologie a genomiky. Z diagnostiky historicky založené především na cytogenetických přístupech se stala komplexní oblast využívající vysoce citlivé sekvenační a bioinformatické technologie, které umožňují identifikovat kauzální varianty i u fenotypově složitých případů. Zavedení technologií **sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing, NGS)** v první dekádě 21. století znamenalo zásadní průlom. Metoda **celoexomového sekvenování (WES)** umožnila sekvenovat všechny kódující geny současně a dramaticky zkrátila čas potřebný k nalezení kauzální mutace. Metoda WES je založena na sekvenaci všech kódujících oblastí genomu (exom), které tvoří pouze 1–2 % jeho celkové sekvence, ale které zahrnují většinu známých patogenních variant, protože tyto mohou mít přímý dopad na strukturu a funkci

proteinů. Je schopná detekovat široké spektrum genomových variant (jednonukleotidové varianty – SNV, krátké inzerce a delece – indels, a omezeně variabilitu v počtu kopií (CNV) v exonových oblastech), a stala se klíčovou pro diagnostiku komplexních a nejasných genetických onemocnění (Sawyer et al., 2016). V České republice je WES již dostupné v rámci úhradového systému veřejného zdravotního pojištění a je indikováno zejména u pacientů s podezřením na geneticky podmíněné onemocnění, u nichž nebyla diagnóza stanovena konvenčními metodami, jako jsou chromozomální array či cílené NGS panely. Recentní studie a metaanalýzy publikované v letech 2024–2025 uvádějí, že diagnostická výtěžnost WES se obvykle pohybuje kolem 30–50 %, což znamená, že přibližně polovina až dvě třetiny pacientů zůstávají i po provedení tohoto vyšetření bez diagnózy (Han et al., 2025; Moey et al., 2025). **Celogenomové sekvenování (WGS)** založené na NGS představuje další úroveň charakterizace lidského genomu, která umožňuje překonat některé limitace WES. WGS je založeno na sekvenaci celého lidského genomu, včetně intronových a dalších nekódujících oblastí, což poskytuje nejkomplexnější genetický obraz (Stavropoulos et al., 2016). Tato metoda je schopná detekovat téměř všechny typy genetických variant, SNV, indels, CNV, a omezeně i jiné typy strukturních variant. WGS je logickým dalším krokem, zejména užitečné v případech, kde předchozí metody selhaly. Nicméně WGS je nákladnější a generuje obrovské množství dat, které vyžadují pokročilou analýzu a interpretaci.

Nejnovější pokroky v genetické diagnostice představují technologie založené na **sekvenaci s dlouhým čtením (long-read sequencing, LRS)**, které se začaly využívat v poslední dekádě. LRS umožňuje sekvenování delších úseků DNA, což usnadňuje identifikaci velkých a komplexních strukturálních variant, včetně inverzí a translokací, a také spolehlivější detekci variant v genech s vysokou mírou sekvenční homologie či jiných obtížně analyzovatelných oblastech genomu, jako jsou repetitivní oblasti (např. FMR1, HTT) nebo mobilní elementy (Conlin et al., 2022). Povaha technologie LRS také umožňuje při sekvenaci přímou detekci metylovaných nukleotidů, a tedy získání celogenomových **metylačních profilů**. WGS a LRS dnes nejsou součástí rutinní diagnostiky, a je využíváno spíše ve specializovaných centrech, a až po selhání předchozích standardních diagnostických metod u WES negativních pacientů. Přestože metody WES, WGS a LRS zásadně rozšířily diagnostické možnosti, zůstává část pacientů i nadále bez stanovené molekulární příčiny onemocnění. U těchto případů lze doplnit a kombinovat ještě další pokročilé přístupy, jako je analýza metylomu (u LRS automaticky), **sekvenování RNA (RNA-seq)**, či jiné komplexní **multiomické přístupy** (proteomika, metabolomika).

Obr. 1. *Počty vzácných onemocnění a pacientů v jednotlivých skupinách dle jejich prevalence; převzato z Nguengang Wakap et al., 2020*



U pacientů, kteří i po použití těchto nejmodernějších genomických metod zůstávají bez diagnózy je velice důležité periodicky **reanalyzovat existující sekvenační data**. V rámci reanalýzy je zohledněn jednak aktualizovaný fenotyp pacienta vyjádřený pomocí tzv. HPO (Human Phenotype Ontology) termínů a zároveň jsou použity nejnovějších verze bioinformatických nástrojů, nástrojů pro predikci patogenity, klinických a populačních databází a také aktuální odborná literatura (Wenger et al., 2017). Kombinace výše zmíněných přístupů může potenciálně identifikovat nové nebo nedávno objevené asociace mezi kauzálním genem a symptomy pacienta. Na základě recentních publikací může pouhé přehodnocení genomických dat, obvykle s jednoročním časovým odstupem, zvýšit diagnostickou výtěžnost o 5–26 % v případě reanalýzy WES (Fung et al., 2020) a o 4–11 % v případě WGS (James et al., 2020).

V řadě případů brání stanovení nebo uzavření diagnózy skutečnost, že významnou část identifikovaných variant nelze skrz nedostatek evidence o jejich funkčním dopadu jednoznačně klasifikovat jako patogenní či benigní. Například v nejpoužívanější databázi genetických variant a lidských onemocnění, ClinVar, je téměř polovina variant v současnosti vedena jako varianty nejasného významu (VUS) (Tesi et al., 2023). V těchto případech je žádoucí doplnit funkční studie, které umožní ověřit biologický dopad dané varianty a potvrdit či vyvrátit její patogenitu. Schematické znázornění jednotlivých metodických přístupů používaných u pacientů s negativním výsledkem standardní diagnostiky znázorňuje obrázek 2.

V případech, kdy ani reanalýza sekvenačních dat a doplnění funkčních studií u VUS v potenciálně kauzálních genech nevedou k jednoznačné identifikaci diagnostické varianty, představuje další krok sdílení genomických dat prostřednictvím mezinárodních platforem. Tyto nástroje umožňují tzv. **case matching** (matchmaking), tzn. vyhledávání

pacientů s podobným genetickými variantami a fenotypy. Pomocí case matching platforem lze najít další laboratoře nebo klinická pracoviště, které nalezly pacienta se stejnou VUS a současně podobným fenotypem. Tak lze společně doložit, že existuje kauzální vztah mezi genovou variantou a pozorovaným fenotypem. Klíčovou úlohu v tomto směru sehrává mezinárodní síť **Matchmaker Exchange**, která prostřednictvím federované infrastruktury propojuje systémy jako GeneMatcher, PhenomeCentral či DECIPHER a umožňuje bezpečnou a standardizovanou výměnu dat o pacientech (genotyp + fenotyp) mezi různými systémy. Podle analýzy publikované v roce 2025 vedlo využití Matchmaker Exchange k identifikaci více než 1 500 shodných případů, které významně přispěly k objasnění genetické etiologie řady dosud nediagnostikovaných onemocnění (Kobren et al., 2025). Tento přístup je klíčový zejména u ultra-vzácných chorob, kde je potvrzení diagnózy nebo patogenity variant často možné pouze díky mezinárodní spolupráci a porovnání fenotypově podobných případů.

Stanovení přesné genetické diagnózy má zásadní význam nejen pro pochopení patogeneze onemocnění, ale také pro adekvátní léčbu, predikci průběhu a genetické poradenství rodinám. Přechod od diagnostiky k terapii představuje v oblasti vzácných onemocnění jeden z nejvýznamnějších současných posunů. Zatímco dnes má cílenou léčbu k dispozici jen malý zlomek pacientů, rychlý pokrok v oblasti vývoje léčiv, včetně drug repurposingu a dalších cílených terapeutických strategií, otevírá prostor pro rozvoj personalizované medicíny a zlepšení prognózy u řady dosud neléčitelných vzácných onemocnění.

Současné terapeutické výzvy a přístupy u vzácných onemocnění

Navzdory významnému pokroku v oblasti výzkumu a vývoje léčiv pro vzácná onemocnění zůstává většina těchto onemocnění bez účinné kauzální terapie. Přijetí Orphan Drug Act v roce 1983 znamenalo zásadní legislativní krok, který umožnil vývoj více než 500 léčiv pro vzácná onemocnění (Thomas, Caplan, 2019) a podnítil zájem farmaceutického průmyslu o tuto oblast. Přesto je odhadováno, že pouze 5 % vzácných onemocnění má v současnosti schválenou léčbu a přibližně u 15 % je léčivý přípravek ve vývoji nebo s uděleným označením léčiva pro vzácné onemocnění (orphan drug designation). Největší problémy přetrvávají u ultra-vzácných chorob. Tyto představují specifickou **terapeutickou výzvu** na technologické, regulační i ekonomické úrovni (Fermaglich et al., 2023). Jedním z mála doložených příkladů úspěšného vývoje léčiva pro ultra-vzácné onemocnění je hereditární orotová acidurie, vrozená porucha metabolismu pyrimidinů, která byla dosud popsána u méně než 30 pacientů celosvětově (Staretz-Chacham et al., 2023). U postižených novorozenců se rychle rozvíjí závažná megaloblastická anémie, leukopenie a dále opoždění motorického a intelektuálního vývoje. V roce 2014 studie fáze III se čtyřmi pacienty ukázala, že pacienti léčení uridin triacetátem, perorální proléčivem uridinu, od společnosti WellStat Therapeutics dosáhli potřebné stabilizace u klíčových hematologických parametrů. V roce 2015 schválil americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) uridin triacetát pod značkou Xuriden na základě omezených údajů z fáze III (Newton, 2022). V současné době je hereditární orotová acidurie jedno nejvzácnějších onemocnění, u kterého je na trhu dostupná registrovaná léčba.

Genová terapie

Genová terapie (GT) je nástroj moderní terapie založený na cílené modifikaci buněčné DNA nebo interakci s buněčnou DNA/RNA za účelem aktivace nebo inaktivace konkrétního genu. GT představuje jeden z nejperspektivnějších terapeutických přístupů k léčbě monogenně podmíněných vzácných chorob. První klinická studie ověřující možnosti využití GT pro léčbu dědičných onemocnění byla provedena v roce 1990 v Národním institutu zdraví (NIH – National Institutes of Health) v USA. Michael Blaese a French Anderson použili úspěšně GT pro léčbu dvou pacientek trpících těžkou kombinovanou imunodeficiencí (SCID – severe combined immunodeficiency disease) způsobenou deficiencí enzymu adenosindeaminázy (ADA). Výsledek byl sice klinicky omezený, avšak zcela zásadní z hlediska potvrzení celého konceptu GT. V letech 2017–2023 bylo v Evropě zahájeno více než 90 klinických studií s léčivými přípravky GT u vzácných onemocnění, přičemž 12 přípravků již bylo registrováno a dalších 15 je ve třetí fázi klinického hodnocení (Gicquel et al., 2023).

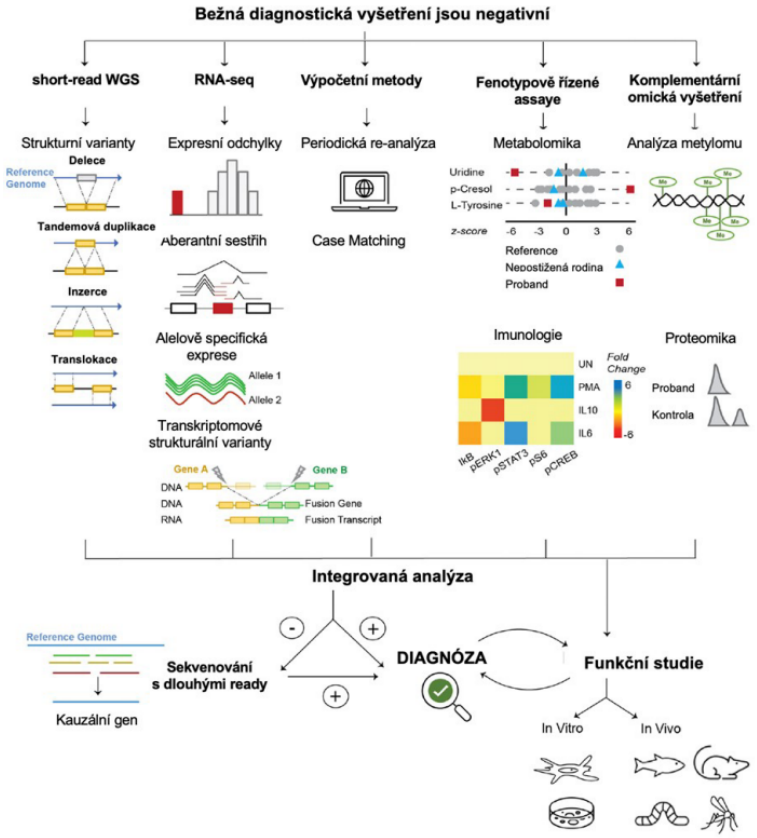
Základním cílem GT je (i) nahradit funkci poškozeného genu vložením funkční kopie tohoto genu do buněk pacienta – genová augmentace (např. u monogenně dědičných chorob), (ii) utlumit mutované geny pomocí terapeutických oligonukleotidů (např. v případě onkogenů) nebo (iii) opravit poškozené geny pomocí genové editace (Obr. 3). Na rozdíl od symptomatické léčby, která se používá k léčbě geneticky podmíněných chorob (např. substituční enzymoterapie u metabolických poruch), neléčí pouze symptomy, ale obnovením funkce poškozeného genu odstraňuje příčinu onemocnění, a je tedy **léčbou kauzální**. Klinicky používaná GT využívá přenosu nového genetického materiálu do buněk pacienta za účelem dosažení léčebného efektu, kterým je buď obnovení funkce, anebo naopak odstranění chybné funkce poškozeného genu. **Transfer genetického materiálu** lze v zásadě provést dvěma způsoby – *in vivo* nebo *ex vivo* (tedy *in vitro*). In vivo transferem rozumíme genetickou modifikaci cílových buněk přímo v těle pacienta. *Ex vivo*, tedy in vitro transfer znamená, že z těla pacienta jsou izolovány vhodné buňky, které jsou geneticky modifikovány v laboratoři, a následně vpraveny zpět do těla pacienta. Principiální výhodou *ex vivo* strategie je možnost selekce úspěšně modifikovaných buněk a jejich kontrola před aplikací zpět do těla pacienta. GT lze rozlišovat také na základě metody doručení genu do cílových buněk/tkáně a použitého nosiče (**vektoru**). Hovoříme potom o **virové GT** využívající **virové vektory**, které jsou zbaveny schopnosti se množit, jakou jsou retroviry, lentiviry nebo adeno-asociované viry (AAV) především u **genové augmentace**, a o **nevirové GT** využívající nosiče, které nejsou založeny na virových vektorech, a to především u terapeutických oligonukleotidů.

Příklad GT využívajících ex vivo podání a genové augmentace u autologních hematoepotetických kmenových buněk je registrovaný přípravek Strimvelis založený na použití retrovirového vektoru nesoucího funkční alelu genu pro ADA u pacientů s **ADA-SCID**, tedy stejného imunodeficitu, který byl vůbec první

nemocí léčenou pomocí GT. Na *ex vivo* podání je prováděno také u přípravku Casgevy (exa-cel) Lyfgenia, ten ovšem nevyužívá genové augementace, ale je historicky prvním přípravkem GT založeném na genové editaci pomocí technologie CRISPR/Cas9, a to pro léčbu **srpkovité anémie**. *In vivo* GT naopak představuje přímé podání virového vektoru *in situ* nebo systémově přímo do těla pacienta. Příkladem je přípravek Luxturna k léčbě **retinální dystrofie**, kde je prováděno subretinální podání virového vektoru AAV sérotypu 2 nesoucího funkční kopii genu *RPE65*.

Zvláštní význam mají GT v dětské neurologii. Systémově podávaný přípravek Zolgensma (onasemnogene abeparvovec) založený na AAV sérotypu 9 nesoucím funkční gen pro SMN1 a mající tropismus k neuronům, který se používá k léčbě **spinální muskulární atrofii (SMA)** (Baylot et al., 2024). Zolgensma prokazuje dlouhodobý efekt po jednorázovém podání a zásadně mění přirozený průběh SMA (Cacoub et al., 2025). Podmínkou pro zahájení léčby je test na protilátky proti vektoru AAV9. AAV9 se totiž přirozeně vyskytuje v našem prostředí a imunitní systém dítěte, které se s ním před léčbou setkalo či prodělalo infekci, může vytvořit neutralizační protilátky neumožňující tento typ léčby. V současnosti se jedná o nejdražší léčbu v ČR, jejíž cena přesahuje 50 milionů Kč na jednoho pacienta.

Obr. 2. *Přehled technologií a postupů používaných u pacientů, u kterých standardní diagnostické nástroje nevedly k pozitivnímu nálezu; spadá sem celé spektrum moderních přístupů, které se ovšem běžně nepoužívají v diagnostice, ale spíše ve výzkumném prostředí; například celogenomové sekvenování WGS a LRS, sekvenování RNA, proteomika, metabolomika a další; všechny tyto metody mohou být doplněny pokročilými funkčními studiemi s využitím různých typů buněčných (in vitro) a zvířecích (in vivo) modelů; upraveno podle práce Marwaha et al., 2022*



Léčba založená na terapeutických oligonukleotidech

Terapeutické oligonukleotidy jsou krátké nukleotidové sekvence, které interagují s cílovou mRNA nebo pre-mRNA a lze je rozdělit na dvě hlavní skupiny: (i) **ASO (antisense oligonucleotides)** – krátké jednořetězcové oligonukleotidy vážící se na komplementární RNA, kde blokují nějakou specifickou sekvenci nebo znemožňují translaci, a (ii) **siRNA (small interfering RNAs)** – malé interferující RNA (krátké, v průměru 21 bp), které vyvolávají degradaci cílové mRNA endonukleázovým štěpením.

Typickým příkladem ASO je nusinersen, používaný v **léčbě SMA**. Nusinersen se váže na pre-mRNA pseudogenu SMN2 a moduluje její sestřih tak, aby zabránil vynechání exonu 7. Tím umožňuje vznik plnohodnotného proteinu SMN, jehož nedostatek je příčinou rozvoje onemocnění. U **Duchennovy muskulární dystrofie (DMD)** dochází v důsledku delecí či duplikací exonů k narušení čtecího rámce genu DMD, což vede ke vzniku předčasného stop kodonu a ztrátě syntézy funkčního dystrofinu. Terapie na bázi ASO, jako jsou přípravky golodirsen a casimersen, využívají princip exon skippingu – cíleného přeskočení určitého exonu při sestřihu pre-mRNA. Tím se obnoví čtecí rámec a umožní tvorba zkrácené, ale částečně funkční formy dystrofinu, která zlepšuje stabilitu svalových vláken a zpomaluje progresi onemocnění.

Příkladem terapeutické siRNA je molekula inklisiranu, který se využívá v léčbě primární **hypercholesterolemie**. Inklisiran využívá RNA interference. Intracelulárně v hepatocytech na základě komplementarity vyvazuje mRNA kódující proteázu PCSK9, která je následně degradovaná. Není k dispozici pro translaci proteinu PCSK9, a tím dochází ke snížení jeho syntézy. Snížené množství vytvořené PCSK9 nesnižuje aktivitu LDL receptorů, které se tak mohou opakovaně využívat k odstraňování LDL cholesterolu z krve. Výsledkem je pokles hladiny LDL cholesterolu v cirkulaci. Dalšími příklady terapeutických oligonukleotidů jsou patisiran a vutrisiran, schválené pro léčbu **hereditární transthyretinové amyloidózy** (hATTR amyloidosis). Obě molekuly využívají mechanismus siRNA ke snížení exprese patologického proteinu transthyretinu (TTR) prostřednictvím degradace jeho mRNA.

Drug repurposing

Drug repurposing (někdy také drug repositioning), tedy hledání nových indikací pro již existující léčiva, představuje **efektivní a ekonomicky dostupnou strategii**, jak urychlit vývoj léčby vzácných onemocnění. Tento přístup využívá inovativní poznatky o mechanismech účinku léčiv a současně staví na již ověřených znalostech o jejich bezpečnosti, farmakokinetice a klinické toleranci, čímž výrazně snižuje čas i náklady potřebné k vývoji zcela nového přípravku.

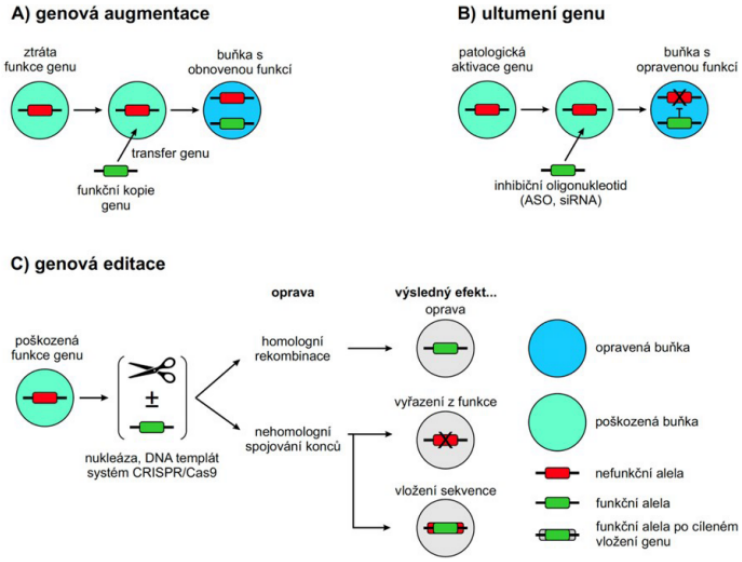
Zatímco dříve šlo o proces založený převážně na empirických klinických pozorováních, dnes se repurposing stal součástí konceptu precizní medicíny. Moderní přístupy využívají bioinformatické a multiomické analýzy, které propojují genomická, transkriptomická, proteomická a metabolomická data (Tesi et al., 2023). Pomocí metod **síťové medicíny (network medicine)** a **modelů umělé inteligence (AI)** lze identifikovat společné molekulární patofyziologické mechanismy mezi různými onemocněními a vyhledávat **existující léčiva vhodná pro nové indikace**. Takto vedené analýzy již umožnily poukázat na **více než 1 000 potenciálních kandidátů** pro dosud neléčené vzácné choroby (Tesi et al., 2023).

Repurposing tak vytváří **most mezi výzkumem a klinickou praxí**, který umožňuje rychlejší translaci poznatků do léčby. Příkladem je využití **sirolimu (rapamycinu)**, původně imunosupresiva, jako inhibitoru mTOR u tuberózní sklerózy, antidiabetika **metforminu** v terapii mitochondriálních a nádorových onemocnění nebo β-blokátoru **propranololu** v léčbě infantilních hemangiomů (antiangiogenní účinek). K dalším klinicky ověřeným příkladům repurposingu patří **sildenafil** (původně určený pro erektilní dysfunkci) využívaný v léčbě plicní arteriální hypertenze nebo **riluzol**, původně vyvinutý pro léčbu amyotrofické laterální sklerózy (ALS), je díky mechanismu účinku založeném na modulaci glutamátergní neurotransmise nyní používán také jako doplňková terapie u SMA, roztroušené sklerózy nebo Huntingtonovy choroby. Příkladem je i **dantrolen** původně vyvinutý pro léčbu maligní hypertermie dnes používaný také v terapii spasticity u neuromuskulárních poruch.

Stejný princip lze uplatnit i u dalších onemocnění se **sdílenými molekulárními drahami**, například v oblasti autofagie, zánětlivých signálních kaskád či aberantní buněčné signalizace. Jiný přístup k lékovému repurposingu vychází ze skutečnosti, že léčivo může ovlivňovat i jiné molekulární cíle, než pro které bylo původně určeno, a tím působit terapeuticky i u odlišných onemocnění.

Zajímavým směrem je tzv. **personalizovaný repurposing**, kdy se léčivo vybírá podle **individuálního genomického profilu pacienta** (*N-of-1 approaches*). Tento přístup se začíná uplatňovat především u dětských pacientů s těžkými neurovývojovými či metabolickými poruchami, kde jiné terapeutické možnosti chybí (Tesi et al., 2023).

Obr. 3. *Základní strategie genové terapie. A) genová augmentace, B) utlumení genu, C) genová editace*



Ekonomické a regulační aspekty

Zásadní překážkou vývoje moderních terapií pro vzácná a ultra-vzácná onemocnění jsou vysoké náklady, složitý regulační proces a omezená dostupnost. Cena jednorázově podávaných genových léčiv přesahuje možnosti většiny národních systémů veřejného zdravotnictví. Evropská unie reaguje systémem regulačních pobídek v rámci Orphan Drug Regulation, který zahrnuje daňové úlevy, prodlouženou tržní exkluzivitu a vědecké poradenství pro výrobce. Přesto pouze malé procento vzácných onemocnění dosáhne fáze registrace a komerční dostupnosti (Cacoub et al., 2025). Neziskové a pacientské organizace sehrávají klíčovou roli v překonávání těchto bariér. Podporují koordinaci klinického výzkumu, zlepšují nábor pacientů a poskytují data potřebná pro postregistrační sledování účinnosti (Chaudhary, Kumar, 2025; Dongzhe, Kesselheim, 2025). U ultra-vzácných chorob, kde počet pacientů často nepřesahuje jednotky na světě, se stále častěji diskutují nové modely schvalování a úhrad inovativních léčiv.

Závěr

Vzácná a zejména ultra-vzácná onemocnění zůstávají i přes výrazný pokrok v oblasti diagnostických metod významnou výzvou současné medicíny. Rozvoj genomických technologií, zdokonalování bioinformatických nástrojů a důsledná fenotypizace pacientů zásadně zlepšily možnosti identifikace genetických příčin onemocnění. Klíčovou roli v tomto procesu hraje budování specializovaných center, která disponují pokročilými metodami, jako je celogenomové sekvenování s krátkým i dlouhým čtením, analýza RNA a multiomické přístupy, doplněné o funkční studie u genetických variant s nejasným dopadem. Součástí těchto postupů je také pravidelná reanalýza genomických dat u pacientů s podezřením na geneticky podmíněné onemocnění, u nichž ani komplexní multiomický přístup dosud nevedl ke stanovení příčiny potíží. Tato centra spolupracují v rámci mezinárodních sítí a mat-

chmakingových platforem, které umožňují sdílení dat a identifikaci pacientů se shodným fenotypem a genetickým nálezem. Přesná genetická diagnostika je zároveň klíčovým předpokladem pro vývoj a klinické využití cílených a individualizovaných léčebných přístupů. Léčba vzácných a ultra-vzácných onemocnění se postupně posouvá od nespecifické symptomatické péče k terapiím kauzálním, tj. genovým, nebo alespoň cíleným na molekulární mechanismus onemocnění. Genové a RNA terapie, repurposing léčiv a personalizované přístupy rozšiřují terapeutické možnosti, které u vybraných diagnóz již mění klinický průběh onemocnění. Další rozvoj těchto strategií však vyžaduje harmonizaci regulačních procesů, mezinárodní spolupráci a udržitelné modely financování, které umožní dostupnost inovací i pro malé skupiny pacientů. Integrace genomické diagnostiky s datově podloženými terapeutickými přístupy představuje základ pro rozvoj precizní medicíny, jejímž cílem je včasná, cílená a udržitelná péče o pacienty se vzácnými a ultra-vzácnými onemocněními.

LITERATURA

1. Baylot V, Le TK, Taïeb D, et al. Between hope and reality: treatment of genetic diseases through nucleic acid-based drugs. *Commun Biol.* 2024;7:489. doi:10.1038/s42003-024-06121-9.
2. Boycott KM, Hartley T, Biesecker LG, et al. A diagnosis for all rare genetic diseases: the horizon and the next frontiers. *Cell.* 2019;177(1):32–37. doi:10.1016/j.cell.2019.02.040.
3. Boycott KM, et al. Genomics in rare diseases: from discovery to translation. *Genome Med.* 2022;14:112.
4. Cacoub E, Lefebvre NB, Milunov D, et al. Quantifying hope: an EU perspective of rare disease therapeutic space and market dynamics. 2025.
5. Chaudhary A, Kumar V. Rare diseases: a comprehensive literature review and future directions. *J Rare Dis.* 2025;4(1). doi:10.1007/s44162-025-00099-6.
6. Conlin LK, Aref-Eshghi E, McEldrew DA, et al. Long-read sequencing for molecular diagnostics in constitutional genetic disorders. *Hum Mutat.* 2022;43(11):1531–1544. doi:10.1002/humu.24465.
7. Crooke ST. Meeting the needs of patients with ultrarare diseases. *Trends Mol Med.* 2022;28(2):87–96. doi:10.1016/j.molmed.2021.12.002.
8. Faye F, Dubief J, Castro R, et al. Time to diagnosis and determinants of diagnostic delays of people living with a rare disease. *Eur J Hum Genet.* 2024;32:1116–1126. doi:10.1038/s41431-024-01604-z.
9. Fermaglich LJ, Miller KL. A comprehensive study of the rare diseases and conditions targeted by orphan drug designations and approvals over the forty years of the Orphan Drug Act. *Orphanet J Rare Dis.* 2023;18:163. doi:10.1186/s13023-023-02790-7.
10. Front Public Health. 2025;13:1520467. doi:10.3389/fpubh.2025.1520467.
11. Fung JLF, Yu MHC, Huang S, et al. A three-year follow-up study evaluating clinical utility of exome sequencing and diagnostic potential of reanalysis. *NPJ Genom Med.* 2020;5(1):37. doi:10.1038/s41525-020-00144-x.
12. Gicquel T, Cortial L, Lutsyk K, et al. 2017–2023: state of the art of gene therapies in rare diseases in Europe. *Rare Dis Orphan Drugs J.* 2023;2:23. doi:10.20517/rdodj.2023.29.
13. Han Y, Zhang X, Li J, et al. Beyond the exome: large-scale evaluation of whole-exome sequencing in 18,994 patients with suspected rare genetic diseases. *NPJ Genom Med.* 2025;10(1):45. doi:10.1038/s41525-024-00455-3
14. Hayashi S, Umeda T. 35 years of Japanese policy on rare diseases. *Lancet.* 2008;372(9642):889–890. doi:10.1016/S0140-6736(08)61393-8.
15. Hong D, Kesselheim A. Strategies to advance drug repurposing for rare diseases. *DrugRxiv.* 2025. doi:10.58647/DRUGARXIV.PR000027.v1.
16. James KN, Clark MM, Camp B, et al. Partially automated whole-genome sequencing reanalysis of previously undiagnosed pediatric patients. *NPJ Genom Med.* 2020;5:33. doi:10.1038/s41525-020-00140-1.
17. Kobren SN, Moldovan MA, Reimers R, et al. Joint, multifaceted genomic analysis enables diagnosis of diverse, ultra-rare monogenic presentations. *Nat Commun.* 2025;16:7267. doi:10.1038/s41467-025-61712-2.
18. Macek M. Vzácná onemocnění a jejich domácí a mezinárodní kontext v roce 2019. *Čas Lék Čes.* 2019;158:33–37.
19. Manickam K, et al. Exome and genome sequencing for pediatric patients with congenital anomalies or intellectual disability. *Genet Med.* 2021;23(11):2029–2037.
20. Marwaha S, et al. Expanding the diagnostic utility of genome sequencing through the integration of multi-omics data. *NPJ Genom Med.* 2022;7:21.
21. Moey C, et al. A first large study of whole-exome sequencing in patients with suspected genetic diseases. *Genomics Inform.* 2025;13(2):100046. doi:10.1016/j.gimn.2025.100046.
22. Nguengang Wakap S, Lambert DM, Olry A, et al. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases. *Eur J Hum Genet.* 2020;28(2):165–173. doi:10.1038/s41431-019-0508-0.
23. Newton W. Drug development for ultra-rare diseases: what happens when N=1? Clin Trials Arena. 2022.
24. Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, et al. Exome sequencing identifies the cause of a Mendelian disorder. *Nat Genet.* 2010;42(1):30–35. doi:10.1038/ng.499.
25. Sawyer SL, Hartley T, Dyment DA, et al. Utility of whole-exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey. *Clin Genet.* 2016;89(3):275–284. doi:10.1111/cge.12654.
26. Sirbu CA, Ivan R, Authier FJ, et al. Orphan drugs in neurology: a narrative review. *J Pers Med.* 2023;13(3):420. doi:10.3390/jpm13030420.
27. Smith CIE, Bergman P, Hagey DW. Estimating the number of diseases: the concept of rare, ultra-rare, and hyper-rare. *iScience.* 2022;25(8):104698. doi:10.1016/j.isci.2022.104698
28. Srivastava S, Lewis SA, Cohen JS, et al. Molecular diagnostic yield of exome sequencing and chromosomal microarray in cerebral palsy. JAMA Neurol. 2022;79(12):1287–1295. doi:10.1001/jamaneurol.2022.3549
29. Staretz-Chacham O, Damseh NS, Daas S, et al. Hereditary orotic aciduria identified by newborn screening. *Front Genet.* 2023;14:1135267. doi:10.3389/fgene.2023.1135267.
30. Stavropoulos DJ, Merico D, Jobling R, et al. Whole genome sequencing expands diagnostic utility and improves clinical management in pediatric medicine. *NPJ Genom Med.* 2016;1:15012. doi:10.1038/npjgenmed.2015.12.
31. Tesi B, Boileau C, Boycott KM, et al. Precision medicine in rare diseases: what is next? J Intern Med. 2023;294:397–412.
32. Thomas S, Caplan A. The Orphan Drug Act revisited. *JAMA.* 2019;321(9):833–834. doi:10.1001/jama.2019.0290.