

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Gen TP53 a Li-Fraumeni syndrom

Michaela Šipčiaková

Bakalářská práce

2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Michaela Šipčiaková**
Osobní číslo: **C16284**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Gen TP53 a Li-Fraumeni syndrom**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši o Genu TP53, o funkci, stabilizaci a degradaci proteinu p53.
2. Sestavte literární rešerši o LiFraumeniho syndromu v kontextu s genem TP53.
3. Definujte téma z hlediska genetického, klinického a lékařského.
4. Pro vytvoření kompilačního textu využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. NCBI Pubmed, ScienceDirect, Web of Science, Scopus, apod. Jako zdroje využijte zejména odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Lucie Stříbrná, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd


Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



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

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47 zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění předpisů a směrnicích Univerzity Pardubice č. 9/2012 bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 30. 6. 2019

Michaela Šipčiaková

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce paní Mgr. Lucii Stříbrné, Ph.D. za její čas, rady a věcné připomínky v průběhu psaní této bakalářské práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce je věnována problematice genu TP53 a Li-Fraumeniho syndromu, který je způsoben zárodečnými mutacemi v tomto genu. Produktem genu TP53 je protein p53, jehož funkce spočívá v ochraně organismu proti vzniku nádorových onemocnění. Je schopen navodit apoptózu neboli řízenou buněčnou smrt buněk, pozastavit buněčný cyklus a poskytnout tak reparačním enzymům čas potřebný na opravu poškozené DNA. V případě, že dojde k mutaci genu TP53, sníží se tím pádem i ochrana proti vzniku nádorových onemocnění. Onemocnění, které je způsobeno mutacemi tohoto genu, je Li-Fraumeni syndrom. Pacienti s tímto onemocněním mají vysokou pravděpodobnost vzniku nejrůznějších nádorových onemocnění již v dětském věku.

KLÍČOVÁ SLOVA

gen TP53, protein p53, Li-Fraumeni syndrom, dědičnost, nádorová onemocnění

TITLE

Gene TP53 and Li-Fraumeni syndrome

ANNOTATION

This bachelor thesis is devoted to gene TP53 and Li-Fraumeni syndrome, which is caused by germline mutations in this gene. The product of the TP53 gene is the p53 protein, whose function is to protect the body against cancer illnesses. It is able to induce apoptosis or controlled cell death, to suspend the cell cycle and to provide the time needed for repair enzymes to repair damaged DNA. If the gene TP53 is mutated, the protection against cancer illnesses is reduced. The disease caused by mutations in this gene is called Li-Fraumeni syndrome. Patients with this disease have high probability of developing various cancers already in childhood.

KEYWORDS

gene TP53, protein p53, Li-Fraumeni syndrome, heredity, cancer illnesses

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ	9
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	10
TERMINOLOGIE	12
ÚVOD	14
1 TEORETICKÉ ZÁKLADY DĚDIČNOSTI	16
1.1 Genetika	16
1.2 Molekulární základy dědičnosti	16
1.2.1 Nukleové kyseliny.....	17
1.2.2 Morfologie chromozomu	20
1.2.3 Mutace.....	21
2 GEN TP53.....	23
2.1 Tumor supresorový gen TP53	23
2.2 Protein p53	23
2.3 Funkce genu TP53	24
2.3.1 Funkce proteinu p53 v regulaci buněčného cyklu	25
2.3.2 Funkce proteinu p53 v navození apoptózy	26
2.3.3 Stabilizace a aktivace proteinu p53.....	27
2.3.4 Degradace proteinu p53	27
2.4 Mutace genu TP53	28
3 LI-FRAUMENI SYNDROM	30
3.1 Základní charakteristika	30
3.2 Příčiny vzniku syndromu	31
3.3 Historie objevu syndromu	31
3.4 Formy onemocnění.....	32
3.5 Genetické testování	32
3.5.1 Metoda Multiplex Ligation – Dependent Probe Amplification	34

3.6	Preventivní péče	36
3.6.1	Doporučení ke sledování.....	37
3.7	Onemocnění vyskytující se u pacientů s Li-Fraumeniho syndromem	38
3.7.1	Nádory nadledvin.....	39
3.7.2	Nádory mozku.....	40
3.7.3	Leukémie.....	41
3.7.4	Nádory prsu.....	44
4	ZÁVĚR	46
5	POUŽITÁ LITERATURA	48
6	ZDROJE OBRÁZKŮ	53

SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ

Obrázek 1: DNA a její stavební podjednotky	18
Obrázek 2: Prostorový model jeden a půl otáčky dvojšroubovice DNA	19
Obrázek 3: Umístění genu TP53 na krátkém p raménku 17. chromozomu	23
Obrázek 4: Buněčný cyklus buňky.....	25
Obrázek 5: Zastavení buněčného cyklu v G ₁ fázi proteinem p53	26
Obrázek 6: Autosomálně dominantní typ dědičnosti	30
Obrázek 7: Zobrazení exonů a intronů v primárním transkriptu mRNA.	33
Obrázek 8: Jednotlivé kroky metody MLPA	36
Obrázek 9: Vak s leukemickými buňkami po jejich odběru z krve	42
Graf 1: Zastoupení jednotlivých typů nádorů mezi pacienty postiženými Li-Fraumeniho syndromem.....	39

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ALL – akutní lymfoblastická leukémie

AML – akutní myeloidní leukémie

ATP – adenosintrifosfát

Bax – Bcl-2 associated X protein

BBC3 – Bcl-2 binding component 3

Bcl-2 – genová rodina bcl genů, název odvozen od „B-cell lymphoma“

Cdk – cyklin-dependentní kináza

CLL – chronická lymfocytární leukémie

CML – chronická myeloidní leukémie

DCEG – Division of Cancer Epidemiology and Genetics

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DR4/KILLER – death receptor 4

DR5/KILLER – death receptor 5

Fas/CD95 – cell-death signaling receptor

FN – fakultní nemocnice

CHEK2 – Checkpoint kinase 2

IARC – International Agency for Research on Cancer

kDa – kilodalton

LDH – laktátdehydrogenáza

MDM2 – mouse double minute 2

MLPA – Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification

MOÚ – Masarykův onkologický ústav

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

NCI – Národní onkologický institut (National Cancer Institut)

PCR – polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)

PET – pozitronová emisní tomografie

PIG3 – p53 inducible gene 3

Puma – p53 upregulated modulator of apoptosis

RNA – ribonukleová kyselina

rRNA – ribozomová ribonukleová kyselina

tRNA – transferová ribonukleová kyselina

TERMINOLOGIE

adrenokortikální karcinom – maligní nádor, který vychází z buněk kůry nadledvin

anémie – snížené množství červeného krevního barviva (hemoglobinu), často doprovázeno poklesem počtu červených krvinek (erytrocytů)

apoptóza – programovaná buněčná smrt; fyziologický, organizovaný a přísně regulovaný děj, který je indukován cíleně a vede k usmrcení buňky a následně jejímu odstranění tak, že nedojde k poškození okolních buněk

feochromocytom – nádor dřeně nadledvin, který syntetizuje, ukládá a metabolizuje hormony katecholaminy

hepatosplenomegalie – abnormální zvětšení jater a sleziny

choroidální plexus – hustě prokrvená část mozku, jejíž funkcí je tvorba mozkomíšního moku

karcinom – zhoubný nádor vycházející z epitelových buněk; epitel tvoří pokožku, sliznice, žlázy a parenchymové orgány (játra, ledviny)

leukaferéza – metoda mimotělní separace a sběru leukocytů

neuroblastom – embryonální maligní nádor raného dětského věku, který vychází z buněk nervové tkáně

neutropenie – snížený počet neutrofilů, což je druh bílých krvinek

osteosarkom – zhoubný nádor vycházející z kostní tkáně

proband – první osoba, která zažádala o genetické vyšetření a informuje o výskytu genetických chorob v rodině

proteazom – proteinový komplex nacházející se v jádře a cytoplasmě buněk, který slouží k degradaci nepotřebných nebo poškozených proteinů

proteosyntéza – proces, ve kterém se tvoří bílkoviny

pseudotumor – nepravý nádor, který makroskopicky nádor připomíná, avšak etiologicky a mikroskopicky se o nádor nejedná

rhabdomyosarkom – maligní nádor vycházející z příčně pruhované svaloviny

sarkom – jakýkoli zhoubný nádor vycházející z neepitelové tkáně; vzniká z buněk, které se za normálních okolností přeměňují ve svalovou nebo tukovou tkáň, vazivo, kost nebo chrupavku

senescence – proliferačně klidové stádium, do kterého buňka přejde v případě, že se už nemůže dělit

trombocytopenie – snížený počet krevních destiček

ÚVOD

Pozorování podobností a odlišností potomků a přenos určitých znaků z rodičů na další generace je známo odjakživa. Využívalo se po tisíce let, kdy lidé chovali zvířata a pěstovali rostliny. Genetika jako věda je poměrně mladá a od roku 1906, kdy byl poprvé tento pojem použit, prošla obrovským rozvojem.

Geny je možné popsat jako určité dědičné jednotky, jejichž prostřednictvím jsou předávány dědičné informace z generace na generaci. Determinují jedincovy vlastnosti, vzhled, schopnosti reagovat na podmínky vnějšího prostředí, ale také určují vlastnosti celého druhu. Aby mohly být genetické informace předávány další generaci, musí se nejdříve reprodukovat. Procesy reprodukce a dělení jsou velmi složité, a tak často dochází k chybám. Tyto náhodné chyby, které mění strukturu DNA – nositelky genetické informace, se nazývají mutace. Velká část vzniklých mutací je opravena reparačními mechanismy buněk, část jich zůstane skryta, aniž by se nějakým způsobem projevila, některé mutace pak slouží k přirozenému vývoji jedince i celého druhu a jsou základním předpokladem pro evoluci.

Gen TP53 patří do skupiny tumor-supresorových genů, což jsou geny, které svou činností brání vzniku nejrůznějších nádorových onemocnění. Produktem tohoto genu je protein p53, který hraje důležitou roli v řadě klíčových procesů. Koordinuje buněčné odpovědi na nejrůznější buněčné stresové faktory, jako je poškození DNA, nedostatek živin či kyslíku nebo také vznik zánětu a mnoho dalších. Reguluje buněčný cyklus, a to tak, že ho v případě výskytu mutací pozastaví a poskytne tak reparačním enzymům potřebný čas na opravu poškozené DNA. Zároveň tím znemožní zmnožení těchto mutací a jejich přenos do dceřiných buněk. Dále protein p53 navozuje apoptózu neboli řízenou buněčnou smrt, účastní se udržení buněčné homeostázy i redoxní rovnováhy v buňce.

V případě, že dojde k mutaci genu TP53, je zároveň narušena i funkce proteinu p53 a následkem je nedostatečná ochrana před vznikem nádorových onemocnění. Mutace tohoto genu mohou být somatické, které vznikají v průběhu života jedince a nepřenáší se na další generace. Tyto somatické mutace genu TP53 se vyskytují velmi často a lze je detekovat až u 40 % všech nádorů. Dále existují vrozené mutace, které se dědí z generace na generaci a jsou relativně vzácné. Tyto vrozené mutace genu TP53 jsou příčinou vzniku onemocnění Li-Fraumeniho syndromu.

Li-Fraumeni syndrom je jedním z nejzávažnějších dědičných nádorových onemocnění. Je to onemocnění s autosomálně dominantní dědičností, což znamená, že děti

postižených rodičů mají 50% pravděpodobnost, že budou nositeli stejné mutace, a to nezávisle na pohlaví. Pacienti s tímto syndromem mají vysoké riziko vzniku maligních nádorů již v dětském věku a navíc pacienti, kteří onemocní jedním druhem nádoru, mají pravděpodobnost vzniku dalších nádorů mnohonásobně vyšší. U dětských pacientů se nejčastěji objevují nádory nadledvin, mozkové nádory, leukémie a lymfomy. U dospělých jsou to pak nejčastěji nádory prsu, mozku, zažívacího traktu, plic nebo nádory gynekologické či hematologické.

1 TEORETICKÉ ZÁKLADY DĚDIČNOSTI

Vzhledem k tomu, že tato práce není určena pouze pro odborníky, nýbrž i laické veřejnosti, bude tato kapitola věnována úvodu do genetiky a vysvětlení základních genetických pojmů, což by mělo čtenáři pomoci v pochopení této problematiky a usnadnit porozumění celé práce.

1.1 Genetika

Genetika je věda, která se zabývá dědičností a proměnlivostí živých soustav. Jejím hlavním úkolem je popis pravidel pro přenos genetických znaků z rodičovské generace na potomstvo.

Dědičnost neboli heredita je jednou ze základních vlastností živých organismů. Je to schopnost organismů uchovávat genetickou informaci a při buněčném dělení ji předávat z buňky mateřské do buňky dceřiné. Tyto genetické informace jsou předávány z generace na generaci v podobě genů, což jsou dědičné jednotky, které určují vlastnosti jednotlivce, jeho vzhled a schopnost reagovat na podmínky vnějšího prostředí, ale také vlastnosti celého druhu. Dědičnost tak vede ke vzniku podobnosti mezi rodiči a jejich potomky, ale také mezi potomky navzájem a zajišťuje zachování stálosti a neměnnosti druhů v průběhu mnoha generací [1, 2].

Společně s dědičností se uplatňuje i proměnlivost neboli variabilita. Ta zaručuje vzájemnou odlišnost jedinců téhož druhu a vytváří tím prostor k postupnému vývoji. Výsledkem je, že i přestože si jsou příbuzní jedinci podobní, nejsou nikdy zcela shodní. Některé znaky ale nemusí být určeny pouze geneticky. Mohou být ovlivněny prostředím, ve kterém jedinec žije – nabídkou potravy, přítomností původců infekčních onemocnění, působením fyzikálních, chemických či geografických vlivů a mnoha dalšími vlivy. Příkladem může být, že podvyživené dítě nedosáhne tělesné výšky, ke které má genetické předpoklady [3].

1.2 Molekulární základy dědičnosti

Aby bylo možné zhodnotit význam genetiky v medicíně, je potřeba nejdříve porozumět podstatě dědičného materiálu, jak je organizován v lidském genomu a také to, jakým způsobem je předáván z buňky na buňku v procesu buněčného dělení a z generace na generaci v průběhu reprodukce. Nosičem genetické informace je deoxyribonukleová kyselina DNA, která tuto informaci nese ve své struktuře ve formě genů [4].

Pozorování podobnosti a odlišnosti potomků se využívalo po tisíce let, kdy lidé chovali zvířata a pěstovali rostliny. První důkazy, že jsou geny tvořeny DNA, pocházejí z roku 1944,

kdy bylo prokázáno, že pokud přidáme purifikovanou (očistěnou) DNA k bakteriím, může změnit jejich vlastnosti a tyto změněné vlastnosti jsou pak předávány na další generace. Ovšem mechanismus, kterým je genetická informace kopírována pro přenos z mateřské buňky do dceřiné, nebyl doposud objasněn. Na počátku padesátých let byla poprvé provedena analýza DNA rentgenovými paprsky, tedy technikou schopnou určit trojrozměrnou atomovou strukturu molekuly. V roce 1953 tak byla Jamesem Watsonem a Francisem Crickem rozpoznána dvouvláknová struktura DNA a sestaven její model, za což obdrželi v roce 1962 Nobelovu cenu. Tímto objevem byla objasněna schopnost DNA kódovat genetickou informaci a replikovat se [1, 2].

1.2.1 Nukleové kyseliny

Existují dva typy nukleových kyselin. Jedním z nich je deoxyribonukleová kyselina (DNA) a druhým je ribonukleová kyselina (RNA). Tyto molekuly umožňují organismům přenášet genetickou informaci z generace na generaci. DNA je přítomná v jádře všech buněk a poskytuje pokyny pro vlastní replikaci a řídí syntézu RNA. Prostřednictvím RNA je umožňována syntéza proteinů neboli proteosyntéza.

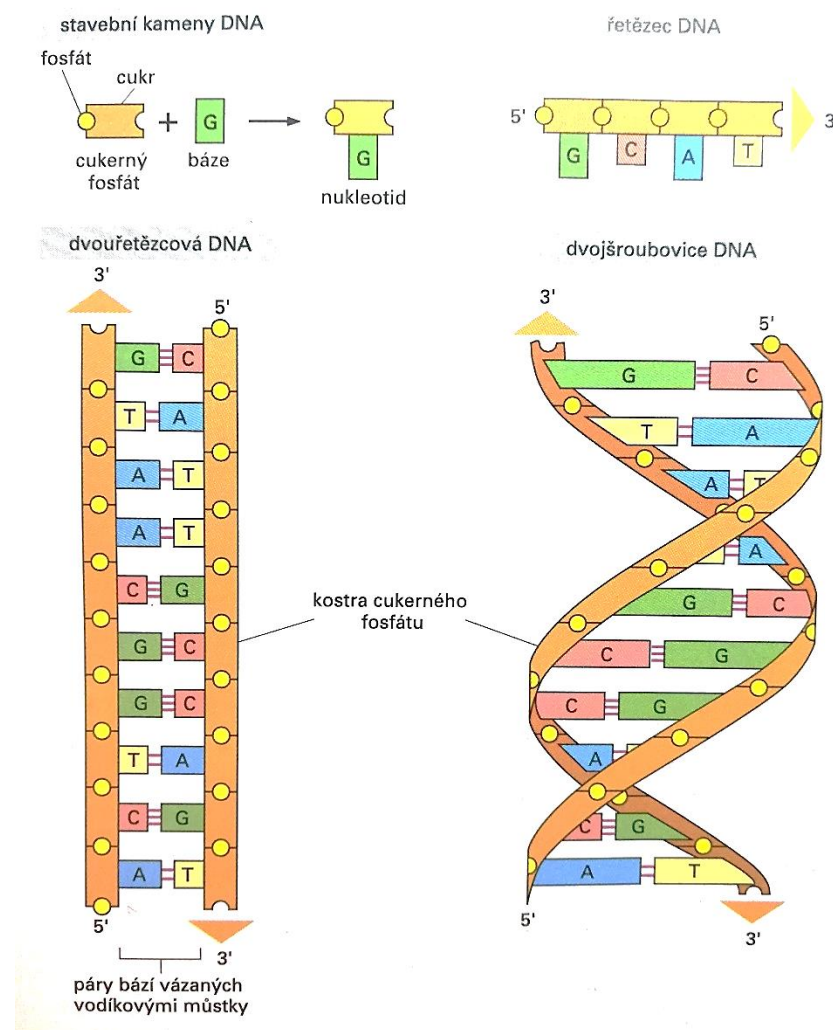
Nukleové kyseliny jsou tvořeny podjednotkami – nukleotidy. Nukleotid je tedy základní stavební jednotkou nukleových kyselin a vzniká spojením cukerné složky, dusíkaté báze a zbytku kyseliny fosforečné (fosfátu). Stavební podjednotky DNA jsou znázorněny na obrázku č. 1. Jednotlivé nukleotidy jsou navzájem spojeny fosfodiesterovými vazbami mezi 3'hydroxylovou skupinou jednoho sacharidu a 5'fosfátovou skupinou druhého sacharidu, což je znázorněno na obrázku č. 2 [1, 2].

Cukernou složku v molekule představuje pentóza, což je monosacharid s pěti uhlíky. Pentóza je pomocí N-glykosidové vazby navázána na dusíkatou bázi. V nukleových kyselinách se pentózy vyskytují ve dvou formách. Je to buď ribóza, nebo deoxyribóza. Odtud jsou také odvozeny názvy dvou hlavních forem nukleových kyselin – kyselina ribonukleová (RNA), která je tvořena jedním polynukleotidovým řetězcem, a kyselina deoxyribonukleová (DNA), která je dvouvláknová a je tedy tvořena dvěma polynukleotidovými řetězci [1, 5].

Dusíkaté báze se dělí do dvou skupin podle toho, od které dusíkaté heterocyklické sloučeniny jsou odvozeny. První skupinou jsou báze purinové, které jsou odvozeny od purinu. Do této skupiny se řadí adenin a guanin. Druhou skupinou jsou báze pyrimidinové odvozené od pyrimidinu a do ní řadíme cytosin, thymin a uracil. V DNA i RNA jsou vždy dvě báze purinové a dvě báze pyrimidinové a párují se na základě komplementarity. Cytosin je

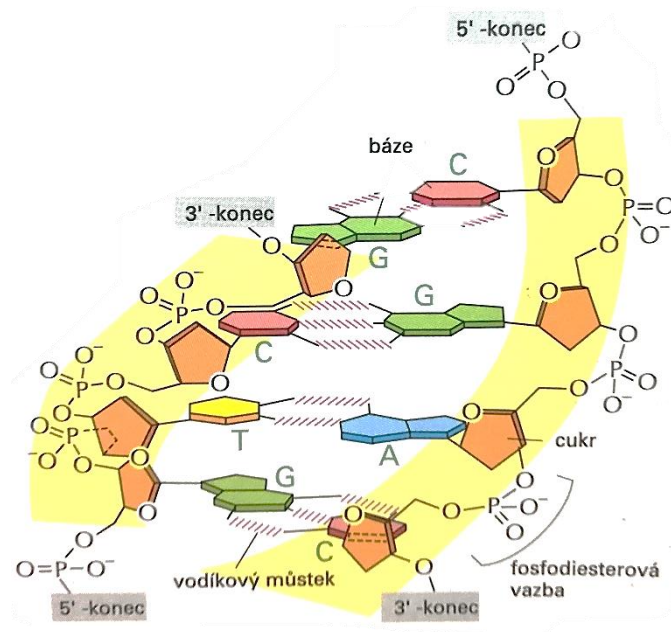
komplementární s guaninem, adenin s thyminem a v molekule RNA je thymin nahrazen uracilem, takže se páruje adenin s uracilem [4, 5].

Fosfátová skupina se váže na pátý uhlík pentózy a je zodpovědná za kyselost celé molekuly. Kyselost molekuly způsobuje tím, že má schopnost odštěpovat H^+ ionty. Po odštěpení protonů dojde ke vzniku záporného náboje nukleové kyseliny, čehož je možné využít v metodách molekulární genetiky při identifikaci molekul DNA [1, 5].



Obrázek 1: DNA a její stavební podjednotky; *vlevo nahoře*: nukleotid a jeho podjednotky, *vpravo nahoře*: spojení nukleotidů do řetězce DNA (primární struktura), *vlevo dole*: dvouřetězcová DNA, naznačení spojení bází vodíkovými můstky podle komplementarity, *vpravo dole*: uspořádání DNA v prostoru do typické dvojšroubovice. Převzato z: Zdroje obrázků [1].

Pořadí jednotlivých nukleotidů v polynukleotidovém řetězci udává primární strukturu nukleových kyselin. Sekundární struktura je pak dána prostorovým uspořádáním polynukleotidového řetězce. Každý polynukleotidový řetězec má tzv. 3'-konec, na kterém se nachází OH skupina (na třetím uhlíku) a na opačné straně tzv. 5'-konec, na kterém je fosfátová skupina navázaná právě na pátém uhlíku. OH skupina umožňuje navázání fosfátové skupiny dalšího nukleotidu, proto syntéza polynukleotidového řetězce probíhá ve směru od 5'-konce k 3'-konci. Osu nukleové kyseliny tvoří střídající se kyselina fosforečná s pentózou a podél ní odstupují dusíkaté báze. Dva antiparalelní polynukleotidové řetězce DNA, ve kterých na sebe nasedají 3'-konec a 5'-konec, pak tvoří v prostoru energeticky výhodnou dvojšroubovici. Dusíkaté báze v této struktuře jsou navzájem spojeny vodíkovými můstky, a to tak, aby byla dodržena výše zmíněná pravidla komplementarity bází. Dalším důležitým pravidlem je to, že množství adeninu a thyminu je shodné, stejně jako je shodné i množství cytosinu a guaninu. Struktura polynukleotidových řetězců DNA, vazba dusíkatých bází na základě komplementarity a prostorové uspořádání dvojšroubovice DNA je znázorněno na obrázku č. 2 [1, 2, 5].



Obrázek 2: Prostorový model jeden a půl otáčky dvojšroubovice DNA. Převzato z: Zdroje obrázků [1].

Jednovláknová RNA je oproti dvouvláknové DNA méně stabilní a můžeme ji v organismu nalézt v několika různých typech, které se liší specifickými funkcemi v organismu. Nejdůležitějšími typy jsou mRNA neboli mediátorová RNA, která slouží jako přenašeč informace z DNA na místo syntézy bílkovin neboli proteosyntézy, rRNA neboli ribozomální

RNA, která tvoří strukturu ribozomů, což je místo, kde proteosyntéza probíhá, a třetím typem je tRNA neboli transferová RNA, která váže aminokyseliny a řadí je do bílkovinných řetězců podle sekvence, kterou udává mRNA [5].

1.2.2 Morfologie chromozomu

Eukaryotické chromozomy jsou vláknité sktruktury, které se vyskytují v jádrech všech buněk. Každý chromozom se skládá z jedné dlouhé lineární molekuly DNA. Na tu jsou navázány proteiny, které umožňují stočení tenkého vlákna DNA do kompaktnější struktury. Tento komplex DNA a proteinů nazýváme chromatin. Na molekule DNA jsou navázány také proteiny, které se podílejí na genové expresi, replikaci a opravě DNA. Soubor všech chromozomů v jádře buňky se označuje jako karyotyp. Karyotyp člověka se skládá z 46 chromozomů, tedy 23 párů. 22 párů tvoří chromozomy nepohlavní neboli autozomy a jeden pár tvoří chromozomy pohlavní neboli gonozomy. Počet chromozomů se může u různých druhů organismů lišit, ale jejich počet ani velikost nesouvisí se složitostí organismu (např. kapr obecný má 104 chromozomů) [2].

Chromozomy můžeme sledovat pod mikroskopem pouze v průběhu mitotického, resp. meiotického dělení. V těchto fázích se chromatinová vlákna, což jsou základní strukturní elementy, nacházejí v jádře v kondenzovaném stavu a v této fázi jsou dobře barvitelné cytologickými barvivy [6].

Chromozomy v tělních neboli somatických buňkách se vyskytují ve dvou sadách. Takovéto buňky se nazývají diploidní ($2n$). Jednu sadu chromozomů organismus získává od matky a druhou sadu od otce. Dvojice takových chromozomů se označuje jako homologní chromozomy. Tyto dvě kopie chromozomů jsou podobné, ale ne zcela shodné. Shodují se ve velikosti a struktuře, ale liší se v nukleotidových sekvencích. Jinak je tomu u pohlavních buněk neboli gamet, ve kterých je každý chromozom zastoupen pouze v jedné kopii. To znamená, že gamety jsou buňky haploidní (n) [7].

Co se týče samotné stavby, tak chromozom je tvořen dvěma chromatidami, které se označují jako sesterské chromatidy. Pokud se bavíme o chromatidách dvou homologních chromozomů, mluvíme o chromatidách nesesterských, které nesou stejné geny, ale jejich formy se mohou lišit. Na chromozomu se nachází centromera, která chromozom rozděluje na dvě raménka – krátké (p) a dlouhé (q). Centromera se uplatňuje při dělení buňky, kdy se účastní rozdělování chromozomů na dvě stejné části. Na konci každého raménka chromozomu se

nachází specifická oblast nazývaná telomera, která chrání chromozom před zkracováním molekuly DNA při replikaci [7].

1.2.3 Mutace

Genetické mutace jsou změny v genetické informaci v DNA a jsou základním předpokladem pro evoluci. Slovo mutace pochází z latinského slovesa „mutare“, což znamená „přesunout nebo změnit“. Přestože v organismu existuje celá řada kontrolních mechanismů, může ve složitých procesech množení DNA a přenosech genetické informace docházet k chybám genetické informace. V živých buňkách probíhají mutace neustále, jejich velká část je ovšem opravena reparačními mechanismy buňky a část jich zůstává skryta a ve fenotypu se tedy vůbec neprojeví. V závislosti na typu a lokalizaci mutace mohou mít i mutace ve stejném genu zcela rozdílné účinky. Hlavním významem mutací je to, že slouží jako zdroj variability organismů a umožňují tak organismu reagovat na měnící se podmínky prostředí. Procesem přírodního výběru jsou pak vybírány takové fenotypy i genotypy, které mají největší šanci na přežití a úspěšnou reprodukci.

Mutace můžeme rozdělovat do několika skupin podle různých kritérií. Podle způsobu vzniku můžeme mutace rozdělit na spontánní a indukované. Spontánní mutace jsou způsobeny chybami v replikaci DNA nebo přirozenými chemickými reakcemi v DNA. Výskyt těchto mutací není velmi častý, a to především díky reparačním mechanismům buňky. Oproti tomu indukované mutace jsou způsobeny vnějšími vlivy, které chemicky pozměňují DNA a většinou způsobují nějakou formu jejího poškození. Tyto vnější faktory, které prostupují do buňky a vyvolávají změny její genetické informace, nazýváme mutageny. Všechny organismy na Zemi jsou vystaveny různým přirozeně působícím mutagenům (např. UV záření nebo radiace z vesmíru), které hrají významnou roli ve vytváření nových genetických variant a jsou předpokladem pro evoluci. Kromě těchto přirozeně působících mutagenů rozlišujeme mutageny fyzikální a chemické. Mezi fyzikální mutageny patří ionizující záření (rentgenové nebo gama záření) nebo neionizující záření (UV záření). Mezi chemické mutageny pak patří různé organické i anorganické látky, které mohou strukturu DNA ovlivňovat přímo, tedy v průběhu replikace nebo i mimo ni, anebo nepřímo, kdy ovlivňují činnost enzymů zajišťujících replikaci DNA, případně mohou být na mutageny metabolizovány [7].

Další dělení genetických mutací je podle rozsahu změn genetické informace, a to na mutace genové, chromozomové a genomové.

Genové mutace mění přímo genetickou informaci jednotlivých genů, ale není tím narušena struktura chromozomu. Ve většině případů dochází ke změně pouze v jednom nukleotidu a takovéto mutace nazýváme bodové. Genové mutace zahrnují substituci, což je záměna nukleotidu za nukleotid jiný, inserci, což je vložení jednoho nebo několika nukleotidů, a delecii, která představuje ztrátu jednoho nebo několika nukleotidů. Příčinou vzniku genových mutací může být buď chyba během normálního procesu replikace DNA, anebo selhání opravy poškozené DNA [4].

Druhou skupinou jsou mutace chromozomové neboli strukturní, které mění strukturu chromozomu, avšak nemusí přímo postihovat genetickou informaci genu. Tyto mutace většinou vznikají v důsledku zlomu chromozomu nebo jeho chybného spojení, což lze pozorovat ve světelném mikroskopu. Mezi základní typy chromozomových mutací patří translokace, delece, inserce, inverze a další. Translokace je způsobena tím, že dojde ke zlomu chromozomu a ulomená část se připojí na jiné místo. Delece je situace, kdy dojde k jednomu nebo dvěma zlomům téhož chromozomu a poté se odlomená část ztratí. Inserce naopak nastává, pokud se odlomená část vloží do jiného chromozomu. Inverze je vložení odlomené části do téhož nebo i jiného chromozomu, ovšem v opačné orientaci. Chromozomové mutace jsou zřídka předávány na další generaci, protože jsou obvykle neslučitelné se životem nebo s normální reprodukcí, ale často se vyskytují u nádorů [4].

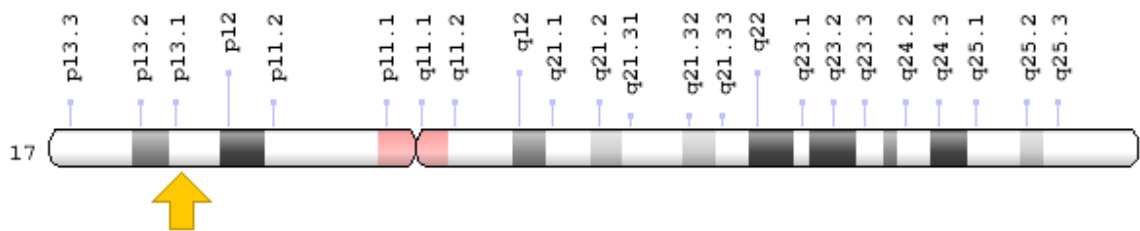
Do třetí (a co do rozsahu největší) skupiny řadíme mutace genomové, které způsobují změny počtu chromozomů v buňce a dělíme je na aneuploidie a polyploidie. Vznikají většinou v důsledku chybného rozdělení chromozomů při mitóze nebo meióze. Při aneuploidii dochází ke změně počtu celých jednotlivých chromozomů. Stav, kdy v buňce chybí jeden chromozom, se označuje jako monosomie ($2n - 1$) a naopak stav, kdy je v buňce jeden chromozom navíc, se nazývá trisomie ($2n + 1$). Dále může nastat situace, kdy chybí celý homologní chromozomový pár, pak se jedná o nulisomii ($2n - 2$) nebo je naopak přítomen navíc celý jeden chromozomový pár, což se nazývá tetrasomie ($2n + 2$). Příčinou aneuploidii je translokace celého chromozomu na jiný chromozom nebo nerozdělení chromozomů v průběhu dělení. Při polyploidii dochází ke znásobení počtu celých chromozomových sad. Příkladem je triploidie ($3n$) nebo tetraploidie ($4n$). Genomové mutace se velmi často vyskytují i u nádorových buněk, aneuploidie mohou mít na vývoj plodu tak závažné vývojové důsledky, že často dochází k samovolným potratům bez povšimnutí již krátce po početí a i polyploidie jsou často neslučitelné se životem [4, 7].

2 GEN TP53

Následující kapitola bude věnována genu TP53 a jeho základním vlastnostem a funkcím. Zárodečné mutace tohoto genu jsou nejčastější příčinou Li-Fraumeniho syndromu, který je předmětem další kapitoly této práce.

2.1 Tumor supresorový gen TP53

Gen TP53 byl objeven v roce 1979 a o deset let později, v roce 1989, byl charakterizován jako nádorový supresor [8]. Patří do skupiny tumor-supresorových genů a je lokalizován na krátkém – p raménku 17. chromozomu v oblasti 17p13.1. Umístění genu TP53 na chromozomu je znázorněno na obrázku č. 3. Tumor-supresorové geny neboli geny potlačující nádory brání svou činností vzniku nádorového onemocnění. Jejich normální produkty inhibují (potlačují) buněčné dělení a zabraňují tak nekontrolovatelnému dělení buňky především regulací buněčného cyklu. Změny v těchto genech tím pádem mohou vést ke vzniku zhoubného nádoru. Tumor-supresorové geny mají recesivní charakter, proto se můžeme setkat i s označením recesivní onkogeny. V praxi to znamená, že aby došlo ke zhoubnému bujení, musí být obě kopie tohoto genu vyřazeny z funkce. Jedna zachovaná normální alela představuje dostatečnou ochranu před vznikem rakovinového procesu. To je hlavní rozdíl mezi tumor-supresorovými geny a onkogeny. Onkogeny vznikají mutací protoonkogenů, což jsou strukturální geny, které se v buňce vyskytují za normálních podmínek, a mají dominantní charakter (dominantní onkogeny). Ke spuštění maligního procesu tak stačí mutace pouze jedné ze dvou kopií těchto protoonkogenů [1, 6, 9].



Obrázek 3: Umístění genu TP53 na krátkém p raménku 17. chromozomu. Převzato z: Zdroje obrázků [2].

2.2 Protein p53

Gen TP53 kóduje informaci pro multifunkční protein p53, jehož název byl odvozen od jeho molekulové hmotnosti, která činí 53 kDa. Funkční formou tohoto proteinu je tetramer, tedy dimer dimerů. Protein p53 hraje důležitou roli v celé řadě klíčových buněčných procesů,

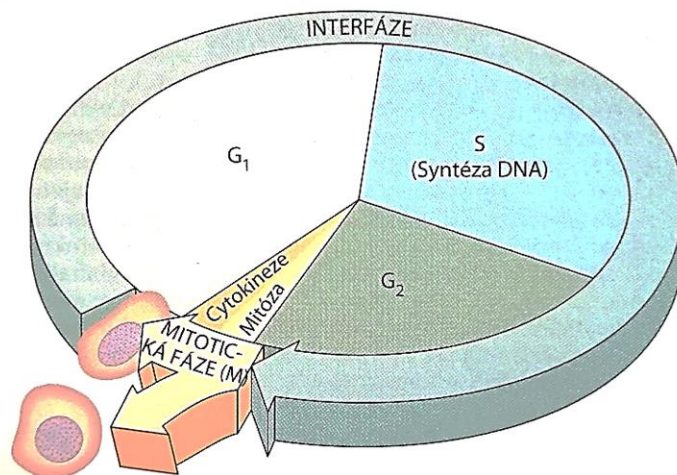
jako je regulace buněčného cyklu, buněčná odpověď na poškození DNA, řízená buněčná smrt (apoptóza) nebo buněčná diferenciací [6, 10, 15]. Jeho role při regulaci buněčného cyklu spočívá v tom, že zabrzdí cyklus buňky před nástupem S-fáze, což je fáze syntetická, ve které se replikuje (zdvojuje) množství DNA. Tím poskytne reparačním enzymům čas potřebný na odstranění případných mutací v genomu a znemožní tak jejich duplikaci a přenos do dceřiných buněk [7].

Protein p53 se řadí k unikátní proteinové rodině, do které patří následující tři proteiny: p53, p63 a p73. Všechny tyto proteiny se navzájem strukturou i funkcí podobají, avšak protein p53 brání u vyšších organismů rozvoji nádorů, zatímco proteiny p63 a p73 se uplatňují v normálním vývoji [9].

Nádorový supresor p53 má schopnost ovlivnit osud potenciálně maligních buněk, a to tak, že navodí jejich smrt apoptózou, zastaví jejich proliferaci nebo aktivuje jejich diferenciací potenciál. V průběhu tvorby nádoru často vznikají mutace tohoto supresoru nebo dochází i k jeho ztrátě [11]. Mutace, které narušují funkci p53, byly zjištěny u více než poloviny všech případů rakoviny. Tyto mutace se také objevují v rodinách s Li-Fraumeniho syndromem, které jsou náchylné ke vzniku nádorů [8].

2.3 Funkce genu TP53

Gen TP53 bývá označován jako „strážce genomu“ („The guardian of genome“), a to právě díky své ústřední roli v koordinaci buněčných odpovědí na široké spektrum buněčných stresových faktorů, kterými jsou například poškození DNA (UV nebo ionizujícím zářením, syntetickými chemoterapeutiky), zánět, hladovění, nedostatek kyslíku, dysfunkce ribozomů, nedostatek živin nebo kritické zkrácení telomer. Protein p53 je v normální buňce udržován na velmi nízké hladině v latentní neaktivní formě a aktivován je právě až působením různých forem stresu. O tom, jakým způsobem bude buňka reagovat na různé typy a hladiny těchto stresových faktorů, rozhoduje právě p53. Pokud dojde k poškození DNA, vyvolá protein p53 zprostředkovanou aktivací proteinu p21 pozastavení buněčného cyklu v G₁ nebo G₂ fázi, což umožní opravu poškozené DNA. Jednotlivé fáze buněčného cyklu jsou znázorněny na obrázku č. 4. Pokud je poškození příliš rozsáhlé, indukuje tento protein apoptózu buňky. Dále může také ovlivnit buněčný metabolismus nebo indukovat senescenci, což je proliferačně klidové stádium, do kterého buňka přejde v případě, že se už nemůže dělit [8, 9, 12,15].



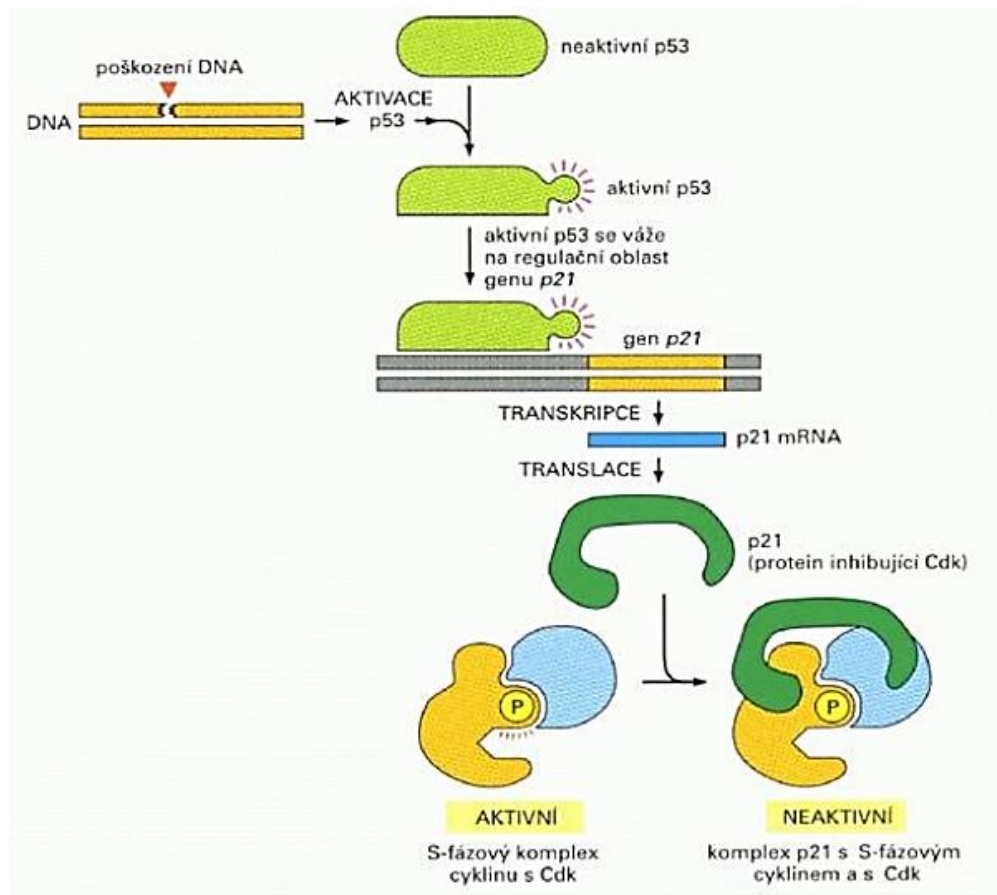
Obrázek 4: Buněčný cyklus buňky; střídání mitotická fáze (M) s interfází (růstovým obdobím), na konci M-fáze vznikají dvě dceřiné buňky. Převzato z: Zdroje obrázků [3].

2.3.1 Funkce proteinu p53 v regulaci buněčného cyklu

Jak již bylo řečeno, poškození DNA buňky působí jako signál vedoucí k expresi p53. Jakmile se protein p53 vytvoří, funguje jako transkripční faktor pro řadu genů. Jeho cílem je syntéza proteinů, které inhibují růst buněk. Jedním z nejznámějších cílů nádorového supresoru p53 je protein p21, který pozastavuje buněčný cyklus vazbou na komplex cyklinu s cyklin-dependentní kinázou (Cdk) a tím buňce dává čas potřebný na opravu DNA. Exprese p21 je indukována jednak zvýšenou hladinou proteinu p53, ale také buněčnou diferenciací a senescencí [1, 2, 9].

Pokud dojde k poškození DNA, zvyšuje se jak koncentrace, tak aktivita genového regulačního proteinu p53, který po aktivaci stimuluje transkripci p21, což je Cdk-inhibiční protein. Postupně dochází ke zvyšování koncentrace proteinu p21, který se váže na komplexy cyklinu a Cdk, který zodpovídá za přechod do S fáze, a blokuje tak jeho funkci. Zastavení buněčného cyklu v G₁-fázi poskytuje buňce čas potřebný na opravu poškozené DNA ještě dříve, než je zreplikována neboli zdvojená. Pokud p53 chybí nebo je poškozený, nedochází k pozastavení buněčného cyklu v G₁/S kontrolním bodě a dochází k replikaci poškozené DNA. To vede ke vzniku vysokého počtu mutací a produkci buněk, které směřují k tomu, že se z nich

stanou buňky nádorové. Na obrázku č. 5 je znázorněn proces zastavení buněčného cyklu v G₁ fázi prostřednictvím proteinu p53 [2].



Obrázek 5: Zastavení buněčného cyklu v G₁ fázi proteinem p53, převzato z: Zdroje obrázků [1].

2.3.2 Funkce proteinu p53 v navození apoptózy

V případě, že je poškození DNA příliš rozsáhlé a nezvratné, indukuje protein p53 apoptózu neboli programovanou buněčnou smrt. Pokud je tedy buňka určena k zániku, dostane apoptický signál, který vede k aktivaci kaskády „sebevražedných“ proteinů. Ty způsobí naštipání buněčných proteinů i DNA, buňky se srašťují, jejich jádra kondenzují, až se rozpadají úplně. Sousední buňky jsou ovlivňovány signály z této umírající buňky a rychle pohlcují a beze zbytku rozkládají její ostatky [1, 9]. Tímto způsobem jsou poškozené buňky eliminovány. Protein p53 transkripčně aktivuje expresi celé řady regulátorů apoptózy, které se liší svou funkcí a také způsobem, jakým apoptózu aktivují.

Většina z nich indukuje apoptózu vnitřní cestou. Do této skupiny patří Bax (Bcl-2-associated X protein), PIG3 (p53-inducible gene 3), Puma (p53-upregulated modulator of

apoptosis) známý také pod názvem BBC3 (Bcl-2 binding component 3) a další. Proteiny z této skupiny kontrolují permeabilitu neboli propustnost mitochondriální membrány a mohou tak ovlivňovat uvolňování mitochondriálních faktorů, které podporují uskutečnění apoptózy.

Do druhé skupiny patří proteiny, které indukují apoptózu vnější cestou, a to aktivací tzv. receptorů smrti. To jsou například Fas/CD95 (cell-death signaling receptor), DR4/KILLER (death receptor 4) a DR5/KILLER (death receptor 5). DR4 a DR5 mohou apoptózu spouštět navázáním např. Fas ligandu, což je transmembránový protein, nebo chemoterapeutik. Ve spoustě tkání je Fas nezbytný pro to, aby mohla být spuštěna p53 závislá apoptóza. Protein p53 může vyvolat apoptózu také zvýšením exprese proteinu Scotin. Ten je lokalizován v endoplazmatickém retikulu a v jaderné membráně [9].

2.3.3 Stabilizace a aktivace proteinu p53

Pokud je poškozena DNA, dojde k mnoha posttranslačním modifikacím proteinu p53, mezi které patří fosforylace, defosforylace, acetylace, methylace a ubikvitinace. Tyto úpravy způsobí aktivaci proteinu p53 [9]. Fosforylace je jednou z nejčastějších modifikací proteinů a probíhá tak, že k postrannímu řetězci aminokyseliny se za katalýzy enzymů kináz připojí fosfát (PO_4^{3-}). Donorem fosfátu pro tuto reakci bývá většinou adenosintrifosfát neboli ATP. Defosforylace je reakce obdobná, ale rozdíl je v tom, že nedochází k připojení fosfátové skupiny k proteinu, nýbrž k jejímu odpojení od proteinu [13]. Acetylace znamená připojení acetylové skupiny ($\text{CH}_3\text{CO}-$) do proteinu, methylace je připojení methylové skupiny ($-\text{CH}_3$) k proteinu a ubikvitinace je připojení proteinu ubikvitinu k upravovanému proteinu [6, 9].

Aby se mohl protein p53 navázat na cílové sekvence, je mimo jiné nutná i jeho oligomerizace a dosažení správné konformace. Výsledkem je vytvoření tetramerů, které jsou teprve aktivní. To znamená, že musí dojít k pospojování čtyř menších jednotek, které vytvoří výsledný aktivní tetramer. Tento proces aktivace a stabilizace proteinu p53 v jádře je silně regulovaný a je ovlivňován mnoha faktory. Pro aktivaci jsou velmi významné právě posttranslační fosforylace a acetylace, a to z toho důvodu, že způsobují stabilizaci proteinu p53 a jeho akumulaci v jádře [9].

2.3.4 Degradace proteinu p53

Nově syntetizovaný protein p53 je v normálních buňkách rychle degradován proteazomem 26S. Proteazom je enzymový komplex, který se podílí na degradaci buněčných proteinů. Aby byl protein v buňce proteazomem rozpoznán a mohlo dojít k degradaci, je nutná ubikvitinace proteinu p53. To znamená, že k proteinu p53 se kovalentně připojí protein

ubikvitin [9, 14]. K tomuto procesu jsou zapotřebí tři různé enzymy. První z nich se označuje jako E1 a je to enzym, který aktivuje ubikvitin. Druhý je označován jako E2, a to je enzym, který ubikvitin přenáší. Třetím enzymem, který se označuje jako E3, je ubikvitin ligasa, která ukončuje přenos ubikvitinu. Ubikvitin ligasovou aktivitu, nezbytnou pro degradaci proteinu p53, vykazuje protein MDM2 (mouse double minute 2). Exprese tohoto proteinu je transkripčně indukována proteinem p53 a jelikož se MDM2 podílí na degradaci p53, dochází ke vzniku negativní zpětnovazebné regulační smyčky, která omezí působení proteinu p53 v buňce pouze na dobu nutnou pro iniciaci transkripce [9].

2.4 Mutace genu TP53

Jak již bylo řečeno, protein p53 za fyziologických podmínek reaguje na nejrůznější stresové situace, jako je například poškození DNA, hladovění či nedostatek kyslíku, a může zastavit buněčný cyklus, zahájit mechanismy opravující DNA, nebo vyvolat apoptózu, která usmrtí nevyhovující buňky. Mutace genu TP53 narušují funkci tohoto proteinu a následkem je tedy nedostatečná ochrana před vznikem nádorových onemocnění.

Somatické mutace, tedy takové mutace, které postihují nepohlavní buňky a tím pádem se nepřenáší na další generace a vedou k lokálnímu postižení v průběhu života jedince, se v případě genu TP53 vyskytují extrémně často – lze ji detekovat u přibližně 40 % všech nádorů a vyskytují se téměř ve všech nádorových typech. Oproti tomu vrozené mutace TP53, postihující pohlavní buňky a tím pádem geneticky dědičné, jsou relativně vzácné, ale výrazně penetrantní, což znamená, že se projeví ve fenotypu s velkou pravděpodobností. Vrozené mutace genu TP53 jsou typicky spojeny s rozvojem širokého spektra nádorů, a především s vzácným autozomálně dominantním onemocněním – Li-Fraumeniho syndromem. Poslední verze R17 databáze mutací p53 IARC (International Agency for Research on Cancer) z listopadu 2013 zahrnuje 1 360 vrozených mutací p53, zatímco těch somatických je 27 721.

Jak u mutací somatických, tak i u vrozených převládají bodové mutace, kdy dochází k záměně jedné aminokyseliny v proteinu p53 za jinou. Nejčastěji se tyto mutace projevují záměnami aminokyselin v té části genu, která kóduje centrální DNA vazebnou doménu. Je ale známo také několik mutací, které narušují strukturu oligomerizační domény, znemožňují vytvoření tetrameru, což je funkční forma proteinu p53, a tak narušují funkci tohoto proteinu. Jako příklad takovéto mutace můžeme uvést mutaci R337H [15].

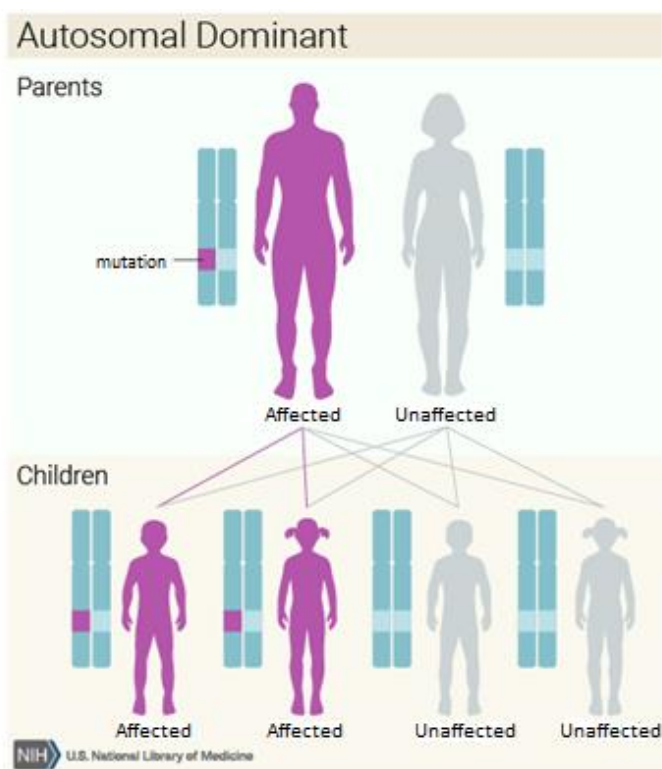
K otázce vztahu typu zárodečné mutace p53 – genotypu a fenotypu Li-Fraumeniho syndromu významně přispěli Olivier et al (2003), když analyzovali data z databáze IARC

týkající se 265 rodin a 226 mutací TP53. Zjistili, že v rodinách, které mají mutaci způsobující záměnu aminokyseliny v DNA vazebné oblasti p53 zajišťující kontakt s malým žlábkem DNA, se častěji vyskytují nádory mozku. Adrenokortikální nádory zase častěji souvisejí se změnami aminokyselin umístěných na protilehlé straně proteinu p53 mimo přímý kontakt s DNA. Časný výskyt nádorů mozku je významně spojen s mutacemi p53, které způsobují úplnou ztrátu proteinu a funkce p53 [15].

3 LI-FRAUMENI SYNDROM

3.1 Základní charakteristika

Li-Fraumeni syndrom je jedním z nejzávažnějších dědičných nádorových onemocnění. Jedná se o velmi vzácné onemocnění s autosomálně dominantní dědičností, což znamená, že není vázáno na pohlavní chromozomy, nýbrž na chromozomy somatické (autosomy) [16, 17]. Děti postižených rodičů tak mají pravděpodobnost 50 %, že budou nositeli stejné mutace. Tento typ dědičnosti je schematicky znázorněn na obrázku č. 6. U pacientů s Li-Fraumeniho syndromem je vysoké riziko vzniku maligních nádorů různého druhu a lokalizace již v dětském věku. S 50% pravděpodobností dojde ke vzniku takového nádoru do 30. roku věku a s 90% pravděpodobností k němu dojde do 60. roku věku. U těch pacientů, kteří onemocní jedním druhem nádoru, je pravděpodobnost vzniku dalších nádorů mnohonásobně vyšší [18]. U dětí se nejčastěji objevují karcinomy nadledvin, mozkové nádory, leukémie a lymfomy a sarkomy. V dospělém věku pak vznikají jakékoli solidní nádory, což jsou nádory vytvářející ložiska, která jsou viditelná okem nebo při zobrazovacím vyšetření nebo je lze nahmatat, nejčastěji nádory prsu, nádory mozku, kožní nádory, nádory zažívacího traktu, plic, gynekologické či hematologické [16].



Obrázek 6: Autosomálně dominantní typ dědičnosti. Děti postiženého otce (znázorněn fialově) a zdravé matky (znázorněna šedě) mají 50% pravděpodobnost, že budou nositeli stejné mutace, a to nezávisle na pohlaví. Převzato z: Zdroje obrázků [4].

3.2 Příčiny vzniku syndromu

Nejčastější příčinou Li-Fraumeniho syndromu jsou zárodečné mutace v genu TP53. Tento gen se významně podílí na regulaci buněčného cyklu a apoptózy. Protein p53 je transkripčním faktorem, což znamená, že má schopnost regulovat transkripci DNA a to tak, že se podílí na kontrole přechodu z G₁ do S fáze buněčného cyklu.

Dalším genem, který může být mutován v rodinách s podezřením na Li-Fraumeniho syndrom, je gen CHEK2. Ten se zapojuje do procesu reparace DNA a zachování genomové integrity, regulace buněčného cyklu a apoptózy [19, 20].

Ke vzniku Li-Fraumeniho syndromu mohou přispívat i další genetické změny. Například *de novo* mutace v genu TP53 mohou být příčinou časných nádorových onemocnění bez rodinné anamnézy [16].

3.3 Historie objevu syndromu

Li-Fraumeniho syndrom je pojmenován podle dvou amerických lékařů, kteří syndrom objevili. Byl to Dr. Frederick Pei Li a Dr. Joseph F. Fraumeni jr. Syndrom poprvé popsali v roce 1969 na Národním onkologickém institutu (NCI – National Cancer Institute) [21].

Frederick Pei Li byl průkopníkem v určování a zjišťování genetických rizikových faktorů pro rakovinu a dlouhodobě spolupracoval s oddělením pro epidemiologii a genetiku rakoviny (DCEG – Division of Cancer Epidemiology and Genetics). Spolu se svým spolupracovníkem Josephem F. Fraumenim identifikovali syndrom, který se stal známý jako Li-Fraumeniho syndrom, ze studie skupiny rodin s neočekávaným souborem nádorů vyskytujících se ve velmi mladém věku. V roce 1990 s použitím pečlivě nashromážděných vzorků z těchto rodin zjistili, že Li-Fraumeniho syndrom způsobují zárodečné mutace v tumor supresorovém genu TP53. Toto zjištění vzbudilo značný zájem o toto onemocnění, a to zejména proto, že mutace genu TP53, který je nazýván strážce genomu, se vyskytují ve vysokém procentu rakovin celkově v populaci.

Dr. Li se chopil plánování dalších studií, které zahrnovaly série pracovních seminářů, v nichž syndrom sloužil jako prototyp pro vývoj doporučení o prediktivním genetickém testování a také v intervencích u rodin náchylných k rakovině. Jejich první popis rodin s Li-Fraumeniho syndromem byl publikován v roce 1996 v odborném časopise *Annals of Internal Medicine* v článku s názvem „*Soft-tissue sarcomas, breast cancer and other neoplasms:*

A familiar syndrome?“, v překladu „Sarkomy měkké tkáně, karcinom prsu a další novotvary: familiární syndrom?“.

Jako uznání za objev Li-Fraumeniho syndromu a identifikaci odpovědného genu byli Dr. Frederick Pei Li a Dr. Joseph F. Fraumeni v roce 1995 společně oceněni cenou Charles S. Mott Prize [22].

3.4 Formy onemocnění

Klinicky můžeme rozlišit dvě formy onemocnění. Jednak je to klasická forma Li-Fraumeniho syndromu a potom tzv. Li-Fraumeni-like syndrom, který nemá vyjádřeny všechny charakteristiky typické pro Li-Fraumeniho syndrom. U klasické formy onemocnění se vyskytují charakteristické nádory u více členů rodiny v mladém věku. U formy Li-Fraumeni-like syndromu se v rodině vyskytují pouze dva z typických nádorů u příbuzných prvního nebo druhého stupně [16, 23].

Existuje několik skupin indikačních kritérií. Pro diagnózu klasické formy syndromu Li-Fraumeni jsou to klasická kritéria s pravděpodobností záchytu mutace 70 – 83 % a kritéria dle Chompretové s 20 – 35% pravděpodobností záchytu mutace. Pro diagnózu Li-Fraumeni like syndromu jsou to Birchova kritéria, která mají pravděpodobnost záchytu mutace 20 – 25 %, a Eeles kritéria s pravděpodobností 5 – 8 %.

Klasická kritéria pro diagnostiku Li-Fraumeniho syndromu jsou následující:

- v rodině se vyskytuje proband se sarkomem diagnostikovaným do 45 let,
- příbuzný prvního nebo druhého stupně s nádorovým onemocněním ve věku pod 45 let a současně
- další příbuzný prvního nebo druhého stupně s jakýmkoli nádorovým onemocněním před 45. rokem věku nebo sarkomem v jakémkoli věku [16, 24].

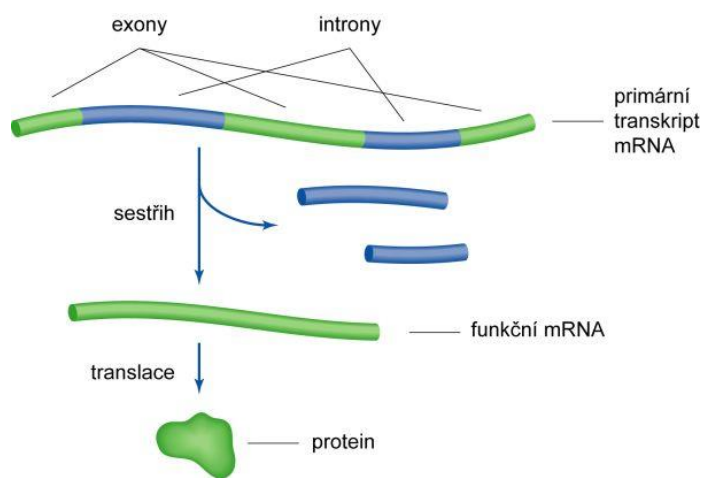
Celoživotní rizika dosahují u nosičů TP53 mutace až 73 %, u nosiček této mutace až 93 %. Existuje velká variabilita rizika onemocnění i v rámci jedné rodiny. Mutace TP53 genu jsou zodpovědné za 2 – 10 % dětských nádorů mozku, 50 – 100 % karcinomů kůry nadledvin v dětském věku, 2 – 3 % všech osteosarkomů, 9 % rhabdomyosarkomů a 7 – 20 % primárně vícečetných nádorů, které se objeví do časně dospělosti [16, 17].

3.5 Genetické testování

Genetické testování pacientů s podezřením na Li-Fraumeniho syndrom se v České republice provádí již mnoho let. Toto genetické testování by se mělo provádět u všech dětí

s karcinomem nadledviny, u kterých je pravděpodobnost nalezení mutace genu TP53 až 80 %, a dále u dětí s nádory choroidálního plexu, což je hustě prokrvená část mozku, která tvoří mozkomíšní mok. Testování se doporučuje i u osteosarkomů, což jsou kostní nádory, a rhabdomyosarkomů, což jsou maligní nádory příčně pruhované svaloviny, v dětském věku [16].

Vyšetření musí být indikováno klinickým genetikem, a to až po provedení genetického poradenství a podepsání informovaného souhlasu. Molekulárně genetická analýza genu TP53 zahrnuje přímé sekvenování v rozsahu exonů 2 – 12 včetně míst sestřihu. Sekvenování znamená, že se zjišťuje pořadí nukleových bází v krátkých sekvencích DNA pomocí biochemických metod. Exony jsou úseky nukleové kyseliny, podle kterých se v procesu zvaném proteosyntéza tvoří bílkovina. Ty tvoří společně s introny geny, ovšem introny jsou v průběhu tvorby mRNA vystřiženy. Tento sestřih RNA neboli splicing je jedna z nejdůležitějších posttranskripčních modifikací, kdy se odstraní nekódující sekvence – introny z RNA a následně se spojí sekvence kódující – exony tak, aby vznikla funkční RNA. Exony a introny v primárním transkriptu mRNA a následný sestřih (splicing) znázorňuje obrázek č. 7.



Obrázek 7: Zobrazení exonů a intronů v primárním transkriptu mRNA, následný sestřih (splicing), při kterém dojde k odstranění intronů a spojení exonů do funkční mRNA, ze které vzniká bílkovina (protein). Převzato z: Zdroje obrázků [5].

Další testování, které se provádí, je i testování metodou MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) na velké přestavby genu, což mohou být delece, nebo inserce celých exonů či dokonce delece celého genu. V případě záchytu mutace je výsledek vždy potvrzen z druhého nezávisle izolovaného vzorku DNA. Podrobněji je tato metoda popsána v následující kapitole [16, 25, 26].

Dále se u rizikových rodin provádí genetické testování genu CHEK2. Jeho klinický význam je však v etiologii Li-Fraumeniho syndromu zatím nejasný jako u většiny středně rizikových genů.

Prediktivní (presymptomatické) testování TP53 mutací je v ČR dosud nabízeno pouze u osob starších 18 let. Je tomu tak především kvůli tomu, že není možné nabídnout rizikovým osobám v dětském věku účinnou prevenci. Do té doby je doporučováno preventivní sledování všech dětí v riziku. Dospělým osobám lze vzhledem k novým možnostem preventivní péče pomocí celotělové magnetické rezonance nabídnout účast v komplexní preventivní péči včetně prediktivního testování TP53 mutace ve specializovaných centrech, která se touto problematikou zabývají. Takovými erudovanými centry, ve kterých by měla genetická poradenství a testování probíhat, jsou FN Motol, FN Brno, MOÚ, event. další specializovaná genetická centra. Preventivní péče o dětské rizikové osoby by měla probíhat ve FN Motol nebo FN Brno, ve kterých se nachází dětská onkologická centra [16].

3.5.1 Metoda Multiplex Ligation – Dependent Probe Amplification

Metoda MLPA, jejíž název pochází z anglického „Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification“, neboli mnohonásobná amplifikace závislá na ligaci sond je semikvantitativní metoda, která umožňuje diagnostiku genetických onemocnění spojených s různými genovými přestavbami, nejčastěji s delecí či duplikací specifického genu nebo jeho částí.

Principem této metody je amplifikace neboli zmnožení až 60 sond. Každá z těchto sond detekuje specifickou sekvenci DNA o délce přibližně 60 nukleotidů během jedné reakce založené na multiplexní neboli mnohonásobné PCR. PCR neboli polymerázová řetězová reakce je metoda rychlého zmnožení vybraného úseku DNA. Vzorek DNA pro MLPA test musí obsahovat alespoň 20 ng lidské DNA, což je přibližně 3000 buněk.

Jedinečnost MLPA reakce spočívá v tom, že nejsou amplifikovány cílové sekvence, ale MLPA sondy, které se na tyto cílové sekvence naváží. Rozdíl mezi metodou MLPA a PCR je ten, že při MLPA je použit pouze jeden pár PCR primerů, což jsou krátké oligonukleotidy sloužící jako začátek syntézy DNA. Celou MLPA reakci můžeme rozdělit do následujících pěti kroků.

Prvním krokem je denaturace DNA. V této fázi dojde k tomu, že je DNA denaturována, což znamená, že je změněna její struktura z původního přirozeného stavu.

Druhým krokem je hybridizace MLPA sond, kdy se ke vzorku přidá směs MLPA sond a vše se nechá přes noc inkubovat. Každá MLPA sonda obsahuje dva odlišné oligonukleotidy a každý z nich obsahuje jeden PCR primer. Obě tyto sondy se naváží (hybridizují) na přilehlé cílové sekvence [27, 28].

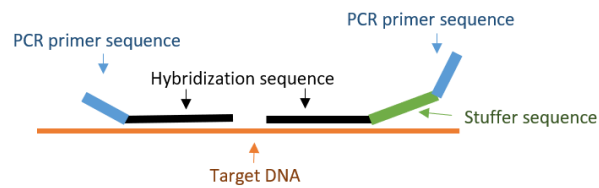
Ve třetím kroku dochází k ligaci, která proběhne pouze v případě, že při předchozí hybridizaci nasedly specifické sondy na cílové sekvence a mohly být tím pádem spojeny do jediné sekvence.

Po ligaci následuje PCR reakce, při které dochází k amplifikaci všech ligovaných sond pomocí stejného páru PCR primerů. Jeden z těchto primerů je fluorescenčně značený, což slouží k vizualizaci produktů amplifikace během separace fragmentů. Separace se provádí pomocí kapilární elektroforézy.

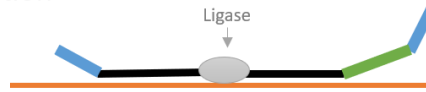
Posledním krokem MLPA reakce je analýza dat a jejich interpretace, k čemuž se využívá řada softwarů. Provádí se analýza fragmentů, kde jsou píky podle velikosti přiřazeny k MLPA sondám, a poté se provádí srovnávací analýza, při které se vzorky porovnají. Při obou těchto krocích jsou prováděny automatizované kontroly kvality, které pomáhají při vyhodnocování výsledků. Při výskytu delece cílové sekvence dojde k snížení výšky píku a při duplikaci dojde naopak k jeho zvýšení [27, 28].

Jednotlivé kroky metody MLPA jsou znázorněny na obrázku č. 8, kde modře jsou znázorněny PCR primery, černě jsou zobrazeny hybridizační sekvence a oranžově cílová DNA. Zeleně znázorněné identifikační sekvence mají různé délky, podle nichž lze odlišit jednotlivé produkty.

1 – Denaturation; 2 – Hybridization



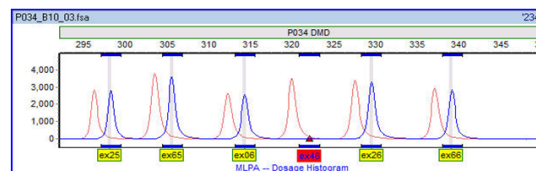
3 – Ligation



4 – Amplification



5 – Fragment separation and Data analysis



Obrázek 8: Jednotlivé kroky metody MLPA. Převzato z: Zdroje obrázků [6].

3.6 Preventivní péče

Preventivní péči u pacientů s Li-Fraumeniho syndromem komplikuje výskyt nádorových onemocnění již v raném dětském věku a také složitá včasná diagnostika nejčastějších typů nádorů [24]. Je známo, které typy nádorů se objevují nejčastěji, avšak Li-Fraumeniho syndrom většinou překvapí naprosto nečekanými lokalizacemi a také rychlostí vzniku nádorů [19].

Včasná diagnostika a léčba nádorového onemocnění rozhodujícím způsobem ovlivňuje osud jedinců postižených Li-Fraumeniho syndromem. Bohužel ale různorodost nádorů, které se u těchto pacientů vyskytují, a také relativně nízký počet postižených jedinců, resp. rodin způsobuje, že chybí jednoznačné doporučení efektivních screeningových metod, které by umožnily spolehlivě odhalit vznik nádorového onemocnění [18].

Navrhovaná preventivní péče pro dospělé osoby je provádění celotělového vyšetření pomocí pozitronové emisní tomografie (PET) s využitím magnetické rezonance pro detekci nádorů prsu a mozku. U dětí je doporučována kombinace fyzikálního vyšetření, laboratorních

vyšetření, ultrazvuku břicha a magnetické rezonance mozku včetně neurologických kontrol [16].

3.6.1 Doporučení ke sledování

Rodina, u které je diagnostikován a genetickým testováním potvrzen syndrom Li-Fraumeni, je pozvána na další konzultaci s klinickým genetikem. Rodinným členům jsou znovu vysvětleny základní informace o tomto onemocnění a také možnosti prediktivního testování. Dále jim jsou vysvětleny možnosti preventivní péče v případě pozitivního výsledku testování. Zdůrazňována je možnost zvýšit pravděpodobnost časného záchytu nádorového onemocnění pomocí těchto preventivních screeningových vyšetření a zlepšit úspěšnost protinádorové léčby a dlouhodobé přežití, a to jak u dětí, tak u dospělých [16, 17].

Návrh preventivní péče pro nosiče TP53 mutace v České republice je následující: Děti jsou sledovány na dětské onkologii a doporučuje se u chlapců samovyšetřování varlat každý měsíc, u děvčat samovyšetřování prsů každý měsíc od věku 16 let. Dále se doporučuje fyzikální vyšetření každých šest měsíců, kde se hodnotí výška, váha, krevní tlak, na každé prohlídce probíhá vyšetření genitálu u chlapců a klinické vyšetření prsů u dívek, přičemž od 16 let věku se provádí i ultrazvuk prsů. Následující vyšetření se provádí jedenkrát ročně. Jedná se o kompletní krevní obraz a kompletní analýzu moči, ultrazvuk břicha se zaměřením na ledviny, nadledviny, játra a pankreas, neurologické vyšetření a oční vyšetření, které slouží k vyloučení nitrolební hypertenze. Dále pak například v rodinách, ve kterých se vyskytují nádory mozku v dětském věku, se ročně provádí magnetická rezonance mozku a při výskytu sarkomů měkkých tkání a kostí se provádí ročně celotělová magnetická rezonance.

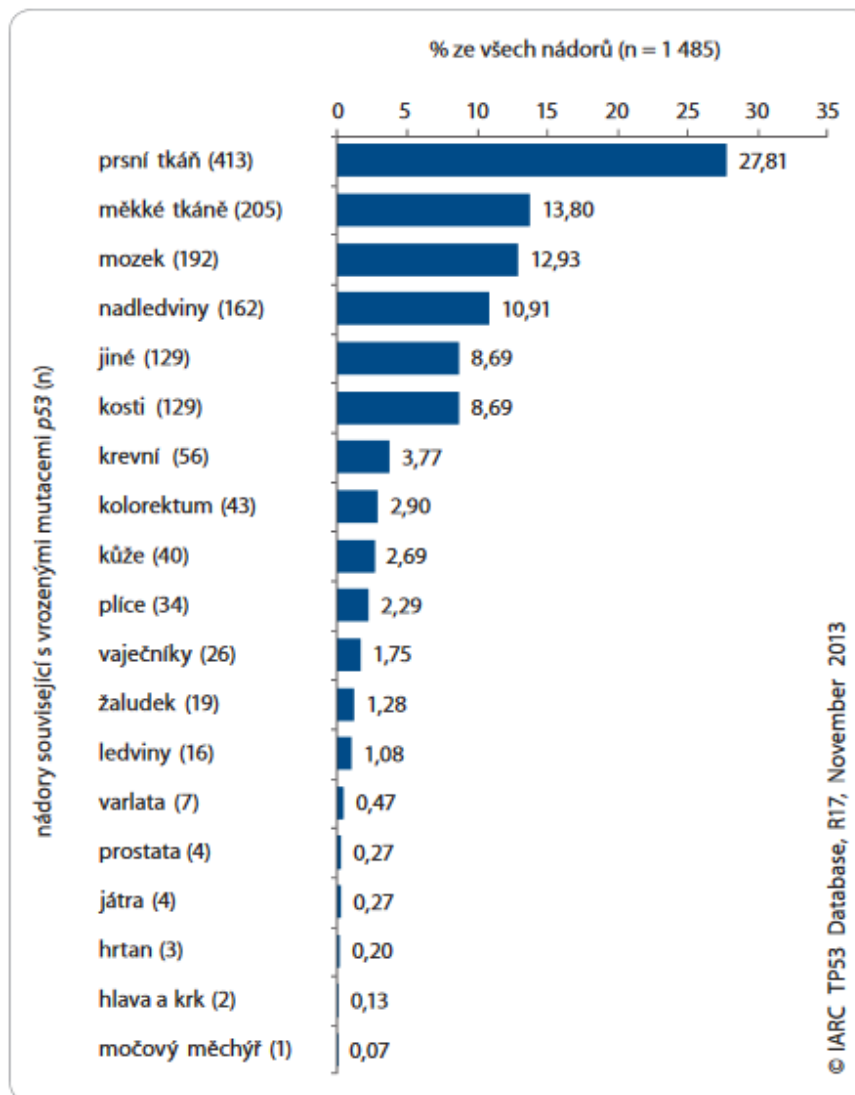
Dospělí pacienti jsou sledováni onkology a dalšími specialisty. Preventivně se provádí fyzikální vyšetření po šesti měsících, hodnotí se krevní tlak, moč a sediment, jedenkrát ročně dermatologické vyšetření, ultrazvuk břicha a pánve, krevní obraz a vyšetření moče. Kolonoskopické vyšetření se doporučuje každé dva roky od 30 let věku nebo 10 let před nejčastějším výskytem nádoru kolorekta v rodině. Od 20 let věku se ročně provádí test na okulní krvácení do stolice. Jednou za tři roky od věku 35 let se doporučuje gastrokopické vyšetření. PET vyšetřování je v současné době doporučováno jednou ročně, ale jeho použití u zdravých nosičů je stále předmětem zkoumání. U žen se dále doporučuje samovyšetření prsů každý měsíc a klinické vyšetření prsů dvakrát ročně od 16 let věku. Od 20 let, nebo při častějším výskytu v rodině i dříve, se provádí magnetická rezonance prsů. Ultrazvuk prsů se doporučuje po šesti měsících a mamografie jako doplňující diagnostické vyšetření. Gynekologické

prohlídky jsou doporučovány vždy po půl roce od 18 let věku ženy, u mužů se pak doporučuje samovyšetřování varlat každý měsíc, vyšetření varlat onkologem vždy po roce a vyšetření prostaty urologem každý rok od dosaženého 40. roku.

Další vyšetření se provádí specificky v závislosti na manifestaci v konkrétní rodině. Dále je třeba si uvědomit, že je nutné dávat přednost takovým vyšetřovacím metodám, které nejsou na bázi ionizujícího záření vzhledem k radiosenzitivitě osob se zárodečnou mutací v genu TP53 [16, 17].

3.7 Onemocnění vyskytující se u pacientů s Li-Fraumeniho syndromem

Pacienti s Li-Fraumeniho syndromem mají velmi vysoké riziko vzniku různých nádorových onemocnění již v dětském věku. U dětí se vyskytují nejčastěji karcinomy nadledvin, nádory mozku, leukémie, lymfomy a sarkomy. U dospělých se pak jedná především o nádory prsu, nádory mozku, sarkomy, kožní nádory, nádory zažívacího traktu, gynekologické nádory a další. Následující část práce proto bude věnována přiblížení některých z těchto onemocnění, jejich příznakům, možnostem léčby a preventivního sledování. V následujícím grafu č. 1 jsou znázorněny nejčastější typy nádorů u pacientů s Li-Fraumeniho syndromem s procentuálním vyjádřením četnosti výskytu [16].



Graf 1: Zastoupení jednotlivých typů nádorů mezi pacienty postiženými Li-Fraumeniho syndromem. Převzato z: Zdroje obrázků [7].

3.7.1 Nádory nadledvin

Nádor nadledvin je jedním z nejčastějších onemocnění, které se u pacientů s Li-Fraumeniho syndromem vyskytuje, a to především u pacientů v dětském věku. Zárodečné mutace v genu TP53 zodpovídají až za 50 – 100 % nádorů nadledvin u dětí [16].

Nadledviny jsou párový orgán, který se nachází na horním pólu obou ledvin. Jsou tvořeny dvěma anatomicky i funkčně rozdílnými tkáněmi – kůrou a dření. Korová, zevní část vylučuje hormony steroidní povahy, především glukokortikoidy a mineralokortikoidy, v menší míře také estrogeny a androgeny. Dřeň nadledvin produkuje katecholaminy, tedy především adrenalin a noradrenalin [29]. Nádor dřene nadledviny se nazývá feochromocytom a nádor kůry

nadledviny se nazývá adrenokortikální karcinom. Dalším nádorem nadledviny je neuroblastom, který je typický pro dětský věk [30, 31].

Většina těchto nádorů je v dnešní době objevena již v počátečních stádiích na základě projevů zvýšené produkce nadledvinových hormonů. Častými příznaky jsou rychle progredující známky Cushingova syndromu, mezi které patří vznik obezity v oblasti břicha, krku a obličeje, přičemž končetiny zůstávají štíhlé, výskyt nafialovělých strií na kůži, bolest svalů apod. Dalšími příznaky jsou vysoký krevní tlak, zvýšená teplota, otoky dolních končetin či rozvoj mužských rysů u žen, jako je zhrubění hlasu, hirsutismus, což je zvýšený růst ochlupení u žen na místech ochlupení typických pro muže, nebo vypadávání vlasů. Projevy nádorů hormonálně nesekrečních bývají nevýrazné a často se projevují až pocitem nevolnosti, zvracením, tlakovými bolestmi břicha či bolestmi v zádech, které jsou způsobeny útlakem okolní rozměrné nádorové tkáně.

Jedinou účinnou možností léčby je kompletní chirurgické odstranění nádorové tkáně. Jiné léčebné metody, jako je chemoterapie či radioterapie, nevedou k uspokojivým výsledkům. Časná diagnostika onemocnění je proto naprosto zásadní [30, 31]. Pacientům s mutací TP53 genu, u kterých je pravděpodobnost vzniku tohoto nádoru vysoká, se proto doporučuje preventivně po třech až čtyřech měsících ultrazvuk břišních orgánů a pánve, kompletní analýza moči a krevní testy [16].

3.7.2 Nádory mozku

U pacientů s Li-Fraumeniho syndromem se nádory mozku vyskytují velmi často, a to jak u dětí, tak u dospělých pacientů. Mutace v genu TP53 jsou zodpovědné za 2 – 10 % dětských nádorů mozku [17].

Nádorová onemocnění centrálního nervového systému jsou velmi různorodou skupinou. Rozdělit je můžeme na primární nádory, které vycházejí přímo z centrálního nervového systému, sekundární nádory, tedy metastázy jiného nádoru, anebo nádory nepravé neboli pseudotumory. Tyto pseudotumory makroskopicky připomínají nádory pravé, ale na základě mikroskopického rozboru je upřesněn jejich různý původ. Může se jednat o absces, uložení patologického materiálu nebo to mohou být různé progresivní změny či benigní léze. Nejčastějším mozkovým nádorem je gliom, který vzniká z buněk podpůrné mozkové tkáně a tvoří až 50 % všech nádorů mozku.

Klinické projevy mozkových nádorů závisí především na jejich lokalizaci, ale většina příznaků je způsobena hlavně nitrolební hypertenzí. Zvýšený nitrolební tlak se pak projevuje

bolestmi hlavy, pocitem nevolnosti a zvracením, městnáním na očním pozadí, poruchami psychiky a vědomí. Dále může docházet ke změnám chování a psychiky, epileptickým záchvatům, poruchám hybnosti, řeči nebo obrně hlavových nervů. Nádory v pokročilém stádiu pak způsobují otok mozku s těžkým neurologickým postižením.

Nádory mozku jsou velmi různorodou skupinou nádorů, proto při volbě vhodné léčby je třeba zohlednit biologický charakter nádoru, jeho velikosti a lokalizaci v mozku a také věk a celkový stav pacienta. Mezi základní možnosti terapie patří chirurgické odstranění nádoru s případnou následnou radioterapií a chemoterapií. Hlavním cílem chirurgických zákroků je maximální možné odstranění nádoru s jejich cytoredukcí, což je snížení buněčné hmoty nádoru, bez poškození okolních částí mozku důležitých pro jeho správnou funkci. To často komplikuje skutečnost, že tyto nádory většinou nejsou přesně ohraničené a nádorové buňky prorůstají mezi zdravými. Navíc nádor často bývá lokalizován v blízkosti důležitých nervových struktur a drah, jejichž porušení by mohlo vést k poruchám hybnosti končetin, poruchám řeči či vidění. Na plánování vhodné léčby se podílí celý tým specialistů, jehož součástí je neurochirurg, radioterapeut, onkolog, neuroradiolog, neurolog a neuropatolog [32, 33].

Vzhledem k závažnosti mozkových nádorů je velmi důležitá jejich včasná diagnostika. Osobám s mutací genu TP53, u kterých je pravděpodobnost vzniku mozkových nádorů vysoká, je doporučována preventivní magnetická rezonance mozku vždy po roce a u dětí navíc ročně oční vyšetření k vyloučení nitrolební hypertenze [16].

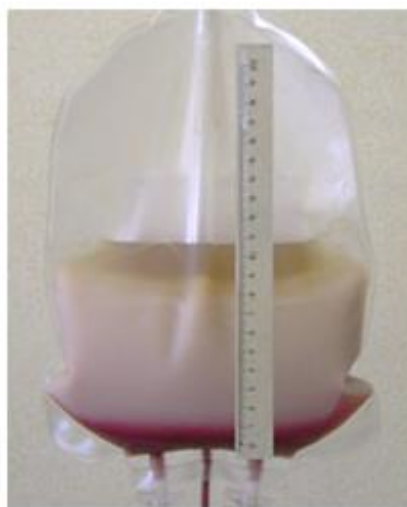
3.7.3 Leukémie

V případě leukémie se nejedná pouze o jedno onemocnění, ale skupinu nemocí s různou prognózou. Projevují se poruchou funkce kostní dřeně, a to konkrétně množením určitých skupin bílých krvinek v kostní dřeni a většinou i v krvi. Jedná se o onemocnění zhoubné povahy, i když různé typy leukémií se i tímto liší. Některé typy leukémie jsou málo zhoubné, jiné naopak vysoce agresivní. Zhoubnost leukémií spočívá v nedostatečné funkci imunitního systému. Zmnožené bílé krvinky nevykonávají svou obrannou funkci a naopak utlačují zdravé krvetvorné i jiné buňky v lidském těle [34].

Leukémie můžeme rozdělit na akutní a chronické. Akutní leukémie probíhají většinou rychle a neléčené mohou způsobit smrt nemocného během dnů nebo týdnů od svého vzniku, zatímco chronické formy mají pomalý a postupný průběh a nemocný může žít i měsíce až roky bez léčby, než je nemoc rozpoznána. Dále leukémie dělíme podle skupin bílých krvinek, ze kterých vznikají. Pokud nemoc postihuje tvorbu monocytů nebo granulocytů, jedná se

o leukémii myeloidní, a pokud postihuje tvorbu lymfocytů, je to leukémie lymfatická. Konečným výsledkem dělení jsou pak tedy čtyři hlavní skupiny, a to akutní myeloidní leukémie (AML), akutní lymfoblastická leukémie (ALL), chronická myeloidní leukémie (CML) a chronická lymfocytární leukémie (CLL) [34].

Klinické projevy leukémií odpovídají změnám v krevním obrazu. Zmnožení rakovinných bílých krvinek způsobuje snížení počtu zdravých bílých krvinek, červených krvinek i krevních destiček. Anémie neboli chudokrevnost je stav, kdy je snížen počet červených krvinek (erytrocytů) nebo množství červeného krevního barviva hemoglobinu, a způsobuje celkové pocity únavy a slabosti, ztrátu tělesné výkonnosti, nemocní se při námaze zadýchávají a snadno se unaví. Trombocytopenie neboli snížený počet krevních destiček v krvi způsobuje zvýšenou krvácivost. Nejčastěji se jedná o krvácení z nosu, dásní, kožní tečkovité a splývavé krvácení. Dále se v krevním obraze může vyskytovat neutropenie, což je nedostatek určité skupiny bílých krvinek – neutrofilů, a způsobuje slabost, únavu a náchylnost k infekcím, neboť je snížena obranyschopnost organismu. Zmnožení rakovinných bílých krvinek může způsobit také to, že se tyto krvinky hromadí v různých orgánech, které se zvětšují. Proto jako další příznaky se mohou objevovat zvětšené uzliny, a to například na krku, v podpaždí nebo v třísech. Dále se může objevovat takzvaná hepatosplenomegalie, což je zvětšení jater a sleziny. Velmi často objevují také bolesti končetin a páteře, horečky nad 38°C, zvýšené noční pocení a váhový úbytek, který dosáhl více než 10 % hmotnosti za posledních šest měsíců. Na obrázku č. 9 je zobrazen vak s leukemickými buňkami. Z tohoto obrázku je patrné, že zmnožené rakovinné bílé krvinky způsobují velké snížení počtu zdravých krevních buněk [34, 35, 36].



Obrázek 9: Vak s leukemickými buňkami po jejich odběru z krve metodou tzv. leukaferézy. Silná bílá vrstva mezi červenou vrstvou (červené krvinky) a žlutou vrstvou (krevní plasma) představuje masu leukemických bílých krvinek. Převzato z: Zdroje obrázků [8].

Pro stanovení diagnózy leukémie je zapotřebí provést laboratorní vyšetření vzorku krve – krevní obraz a vyšetření krve na průtokovém cytometru, který je schopen detekovat typické povrchové znaky nádorových buněk leukémií. Dále se provádí vyšetření kostní dřeně, jejíž vzorek se odebírá nejčastěji z lopaty kosti kyčelní nebo z kosti hrudní, a ultrazvukové vyšetření, díky kterému můžeme posoudit stav jater, sleziny, uzlin a dalších orgánů, které mohou být při onemocnění leukémií poškozeny [34].

V případě leukémií se jedná o velmi různorodou skupinu onemocnění, a proto i při volbě vhodné léčby záleží na mnoha různých faktorech. Obecně lze říci, že v současné době už je toto onemocnění dobře léčitelné a často i plně vyléčitelné. V některých případech, jako jsou například časná stádia chronické lymfocytární leukémie, jsou pacienti pouze pravidelně sledováni a většinou nevyžadují terapii. Základem léčby zejména akutních leukémií je chemoterapie. Jejím principem je podávání cytostatik, což jsou syntetické léky zastavující buněčný růst. Tyto látky, podávané ve formě tablet, nitrožilních injekcí nebo infuzí, se dostávají krevním oběhem do tkání, kde ničí nádorové buňky. Cytostatika, která se při chemoterapii používají, ale bohužel nejsou specifická pouze pro nádorové buňky a poškozují i buňky zdravé, což se může projevit celou řadou nežádoucích účinků, jako je zvracení, průjemy, vypadávání vlasů, poškození sliznic, infekční komplikace, poškození krvetvorby a další. Cílem chemoterapie je tedy zničit populace nádorových buněk v těle pacienta za cenu co nejmenšího poškození zdravých tkání.

Chemoterapie se navíc často kombinuje s léky, které nejsou chemoterapeutiky. Jedná se o takzvané biologické léky, které jsou významnou součástí léčby chronických leukémií. Významným protinádorovým lékem k léčbě CLL se v 60. letech 20. století stal chlorambucil, který poškozuje DNA buněk, jež se poté nemohou dělit. Další skupinou protinádorových preparátů jsou monoklonální protilátky. Ty jsou schopné působit cíleně na nádorovou buňku a způsobit její zánik buď samostatně anebo v kombinaci s chemoterapeutiky. Mechanismus účinku je následující: navodí cytolýzu prostřednictvím aktivace komplementu, aktivují cytotoxicitu závislou na protilátce a současně indukují apoptózu. Do této skupiny patří protilátka rituximab či ofatumumab. Další možností léčby jsou transplantace kostní dřeně. Před samotnou transplantací je použita intenzivní a agresivní chemoterapie, která úplně zničí krvetvorbu pacienta. Následně je krvetvorná tkáň dárce převedena formou nitrožilní infuze pacientovi, kde krvetvorbu obnoví. Kromě takzvaných kurativních léčebných postupů, jejichž cílem je nemoc vyléčit, existují i postupy paliativní, jejichž snahou je zlepšit kvalitu života a

prodloužit jej v případě, že nemoc není možné vyléčit úplně. Dále existují symptomatické léčebné postupy, které léčí pouze příznaky nemoci [34, 36].

3.7.4 Nádory prsu

Karcinom prsu je u žen nejčastější malignitou a podle údajů z roku 2005 představuje v České republice 21 % všech nádorů. V současné době průměrně u jedné z devíti žen bude v průběhu jejího života diagnostikován karcinom prsu a jedna ze třiceti žen na tuto chorobu zemře. Incidence karcinomu prsu ale stále meziročně stoupá a stoupá také s věkem potenciální pacientky. Nádory prsu jsou velmi různorodé a na jejich vzniku se podílí mnoho na sobě nezávislých faktorů, což vede k nevyzpytatelnému biologickému chování. Karcinom prsu je totiž schopen recidivovat (vracet se) i po dlouholetém období remise, tedy vymizení příznaků a projevů onemocnění [37, 38].

Karcinom prsu může být dlouhou dobu bez zjevných a výrazných příznaků, přičemž lokální příznaky si může každá žena odhalit sama při pravidelném samovyšetřování prsu. Jsou to např. změna tvaru a velikosti prsu, změna tvaru bradavky, ekzém bradavky, výtok z bradavky, změna charakteru kůže prsu, bolesti prsu nebo hmatná bulka v prsu nebo v podpaží. Celkové příznaky vyplývají až z přítomnosti metastáz a patří sem bolesti v kostech, nechutenství, hubnutí, teploty nebo dušnost [37].

Ke stanovení diagnózy je, stejně jako u jiných tumorů, důležitá podrobná rodinná i osobní anamnéza a dále fyzikální vyšetření pohledem a pohmatem. V případě, že je hmatná rezistence, určí se její velikost, konzistence a pohyblivost proti spodině a kůži. Pohmatem se zároveň vyšetřují i uzliny v podpaží, nadklíčku a na krku. Některé nálezy ovšem nejsou tímto fyzikálním vyšetřením zjištělné, proto další nezbytnou součástí vyšetření jsou zobrazovací metody, především mamografie. Mamografie je rentgenologické vyšetření měkkým zářením, jehož cílem je vyhledat nehmotnou patologickou změnu a stanovit její velikost a vztah k okolním strukturám. Pod kontrolou mamografu lze také provést odběr tkáně na histopatologické vyšetření. Ze zobrazovacích metod se dále využívá ultrasonografické vyšetření, které se využívá jako doplňkové vyšetření především u mladých žen s hmatnou rezistencí, kde může být mamografie nepřehledná, dále magnetická rezonance nebo pozitronová emisní tomografie (PET), která může odlišit nenádorový původ rezistence od nádorového. Po zhodnocení stavu nemocného a před stanovením terapie je nutné provést ještě biochemické vyšetření, jehož součástí je stanovení nádorových markerů. Ty se vyšetřují opakovaně ke sledování průběhu léčby a i po jejím ukončení ke stanovení možné progresse

onemocnění. Před plánovaným chirurgickým zákrokem se ještě provádí hematologické vyšetření, které zhodnotí stav krvetvorby [37].

Léčebná strategie je určována podle klinického stadia nemoci a podle prognostických faktorů, mezi které patří například velikost tumoru, jeho histologický typ a stupeň diferenciacie, stav hormonálních receptorů a další. Bohužel ale ani podle těchto faktorů nelze přesně vyčlenit skupiny pacientek, které by byly léčeny stejným způsobem. V léčbě nádoru prsu se používají všechny léčebné metody typické pro nádorová onemocnění, mezi které patří chirurgický výkon, radioterapie, chemoterapie či hormonální terapie. Chirurgická léčba je jedním ze základních léčebných postupů. V současné době je snaha nahrazovat radikální operační výkony (mastektomie) konzervativními operačními technikami, jejichž cílem je kromě histologické verifikace neboli ověření stavu tkáně a odstranění tumoru především přijatelný kosmetický efekt pro pacientku a minimalizování výskytu lokální recidivy nemoci. Mastektomie je takzvaný sanační výkon, jehož cílem je odstranění prsu s kožním krytem a částí velkého prsního svalu. Tento zákrok je velice individuální a nestandardní a provádí se už jen ojediněle. Indikací pro tento zákrok je krvácení, silně zapáchající tumory, syndrom mizejícího prsu v nádoru a podobně. Na stanovení správného léčebného postupu se podílí celý tým specialistů, do kterého patří lékaři hodnotící zobrazovací metody, patolog, klinický onkolog, radioterapeut a chirurg. Od samého počátku léčby by měla být zajištěna také rehabilitace a psychosociální péče [37, 38, 39].

4 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo z genetického, klinického a lékařského hlediska definovat problematiku genu TP53 a onemocnění vázající se k mutacím v tomto genu, tzv. Li-Fraumeniho syndrom.

Gen TP53 je označován jako „strážce genomu“, a to především kvůli jeho roli v ochraně organismu proti vzniku nádorových onemocnění. Tento gen má schopnost navodit apoptózu buněk, které jsou pro tělo nežádoucí nebo nebezpečné. Gen TP53 dokáže i pozastavit buněčný cyklus, čímž poskytne reparačním mechanismům čas potřebný na opravy poškozené DNA. Mutace v tomto genu způsobují Li-Fraumeniho syndrom, což je onemocnění s autosomálně dominantní dědičností.

Kromě zárodečných mutací genu TP53 se na vzniku Li-Fraumeniho syndromu mohou podílet i mutace v genu CHEK2, jehož funkce spočívá v reparaci DNA, regulaci buněčného cyklu a programované buněčné smrti – apoptózy. Další možnou příčinou tohoto syndromu jsou mutace nově vzniklé, tzv. *de novo* mutace genu TP53. Tyto mutace nově vznikají u daného jedince a ani jeden z rodičů je ve svém genetickém materiálu nemá.

U Li-Fraumeniho syndromu rozlišujeme dvě formy tohoto onemocnění. Jednou z nich je klasická forma Li-Fraumeniho syndromu a druhou je Li-Fraumeni like syndrom, který nemá některé znaky klasické formy onemocnění.

Genetické testování pacientů s podezřením na Li-Fraumeniho syndrom by se mělo provádět u všech dětí s nádorem nadledviny, kdy je pravděpodobnost nalezení mutace genu TP53 až 80%, dále u nádorů choroidálního plexu, což je hustě prokrvená část mozku, která tvoří mozkomíšni mok, u kostních nádorů neboli osteosarkomů a rhabdomyosarkomů neboli nádorů příčně pruhovaného svalstva. Toto testování musí být indikováno klinickým genetikem po provedení genetického poradenství a po podepsání informovaného souhlasu. U rizikových rodin se provádí také genetické testování CHEK2 genu, ačkoli jeho význam v etiologii Li-Fraumeniho syndromu je zatím nejasný. Prediktivní neboli presymptomatické testování mutací genu TP53 je v České republice možno provádět až osobám starším 18 let, a to především kvůli tomu, že není možné rizikovým osobám v dětském věku nabídnout účinnou prevenci a kvůli riziku možného poškození dítěte a jeho rodiny diagnózou tak závažného syndromu. Do té doby je všem rizikovým dětem doporučováno preventivní sledování.

Včasná diagnostika a léčba nádorového onemocnění zásadním způsobem ovlivňuje osud jedinců s Li-Fraumeniho syndromem, ale bohužel chybí jednoznačné doporučení efektivních screeningových metod, které by umožnily spolehlivě odhalit vznik nádorového onemocnění. Je tomu tak především kvůli velké různorodosti nádorů, které se u těchto pacientů vyskytují, a také kvůli relativně nízkému počtu postižených jedinců, resp. rodin. Je známo, které typy nádorů se objevují nejčastěji, avšak u pacientů s Li-Fraumeniho syndromem většinou překvapí naprosto nečekanými lokalizacemi a také rychlostí vzniku nádorů, a proto navrhnout spolehlivou preventivní péči je velice komplikované. Navrhovaná preventivní péče pro dospělé osoby je provádění celotělového vyšetření pomocí pozitronové emisní tomografie s využitím celotělové magnetické rezonance pro detekci nádorů prsu a mozku. U dětí se doporučuje kombinace fyzikálního vyšetření, laboratorních vyšetření, ultrazvuku břicha a magnetické rezonance mozku včetně neurologických kontrol.

5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] CAMPBELL, Neil A. a Jane B. REECE. *Biologie*. 1. vyd. Brno: Computer Press, c2006, 1332 s. ISBN 80-251-1178-4.
- [2] ALBERTS, Bruce, Dennis BRAY, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS, Martin RAFF, Keith ROBERTS a Peter WALTER. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 2005, 740 s. ISBN 80-902906-2-0.
- [3] BYRTUSOVÁ, Hana. *Návrh výuky genetiky v přírodopisu a výchově ke zdraví*. Brno, 2013. 113 s. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Fakulta pedagogická. Vedoucí práce Mgr. et Mgr. Lenka Falková.
- [4] NUSSBAUM, Robert L., Roderick R. MCINNES a Huntington F. WILLARD. *Klinická genetika*. 6. vyd. Praha: Triton, c2004, 426 s. ISBN 80-7254-475-6.
- [5] ČÁSLAVSKÁ, Barbora. *Heredita dětských očních onemocnění*. Brno, 2017. 72 s. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. Vedoucí práce MUDr. Miroslav Dostálek, Ph.D.
- [6] FAIRBANKS, Daniel J. a William Ralph ANDERSEN. *Genetics: the continuity of life*. Pacific Grove, CA: Wadsworth Pub., 1999, 820 s. ISBN 0-534-25272-9.
- [7] SRŠEŇ, Štefan a Klára SRŠŇOVÁ. *Základy klinické genetiky a její molekulární podstata*. 3. preprac. a rozšíř. vyd. Martin: Osveta, 2000, 409 s. ISBN 80-8063-021-6.
- [8] TVARŮŽKOVÁ, Zuzana. *Genomická analýza B-lymfocytů v průběhu léčby chronické lymfocytární leukémie*. Brno, 2011. 170 s. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Fakulta přírodovědecká. Vedoucí práce doc. RNDr. Šárka Pospíšilová, Ph.D.
- [9] ZEMÁNKOVÁ, Soňa. *Význam regulací signální cesty proteinu p53 v protinádorové léčbě: inhibice p53*. Pardubice, 2009. 73 s. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce doc. MUDr. Martina Řezáčová, Ph.D.
- [10] KOZLER, Petr. *Intrakraniální nádory*. 1. vyd. Praha: Galén, 2007, 277 s. ISBN 978-80-7262-452-2.

- [11] NAVRÁTILOVÁ, Jarmila, Viktor HORVÁTH, Alois KOZUBÍK a Jan ŠMARDA. Lidský nádorový supresor p53 zastavuje růst a indukuje diferenciaci ptačích monoblastů. In: *Edukační sborník: XXXI. Brněnské onkologické dny a XXI. Konference pro sestry a laboranty*. Brno: Masarykův onkologický ústav, 2007. s.371 – 373. ISBN 978-9780-86793-09-2.
- [12] ŠIMEČKOVÁ, Šárka. *Buněčná senescence a nádorová onemocnění*. Brno, 2011. 35 s. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Fakulta přírodovědecká. Vedoucí práce Mgr. Karel Souček, Ph.D.
- [13] NOVOTNÝ, Jiří. *MS analýza proteinů a jejich posttranslačních modifikací se zaměřením na fosforylaci*. Pardubice, 2018. 140 s. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.
- [14] LIEROVÁ, Anna. *Chromozomálne nálezy u pacientov s mnohopočetným myelómom*. Pardubice, 2012. 54 s. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Mgr. Miroslava Jandová.
- [15] ŠMARDOVÁ, Jana a Jana KOPTÍKOVÁ. Brazílský příběh mutace p53 R337H. In: *Klinická onkologie* [online]. 2014, 27(4), s. 247–254 [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/187/4515.pdf>
- [16] FORETOVÁ, Lenka, Jaroslav ŠTĚRBA, Petr OPLETAL, Vladimír MACH, Jiří LISÝ, Katarína PETRÁKOVÁ, Markéta PALÁCOVÁ, Marie NAVRÁTILOVÁ, Renata GAILLYOVÁ, Alena PUCHMAJEROVÁ, Anna KŘEPELOVÁ a Eva MACHÁČKOVÁ. Li-Fraumeni syndrom – návrh komplexní preventivní péče o nosiče TP53 mutace s použitím celotělové magnetické rezonance. In: *Klinická onkologie* [online]. 2012, 25(1), s. 49–54. [cit. 8.12.2018]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/172/4062.pdf>. ISSN 1802-5307.
- [17] PLEVOVÁ, Pavlína, Věra KRUTÍLKOVÁ, Katarína PETRÁKOVÁ, Markéta PALÁCOVÁ, Lenka FORETOVÁ a Jan NOVOTNÝ. Syndrom Li-Fraumeni. In: *Klinická onkologie* [online]. 2009, 22(1), s.20–22. [cit. 16.12.018]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/149/3447.pdf>.

- [18] BOLČÁK, Karol a Lenka FORETOVÁ. FDG-PET/CT u syndromu Li-Fraumeni. In: *Edukační sborník: XXXIV. Brněnské onkologické dny a XXIV. Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky*, Brno 22. – 24. dubna 2010. Brno: Masarykův onkologický ústav v Brně, 2010, s. 174–175. ISBN 978-80-86793-15-3.
- [19] FORETOVÁ, Lenka, Zdeněk SEDLÁČEK, Anna KŘEPELOVÁ, Marie NAVRÁTILOVÁ, Dita HANOUSKOVÁ, Miroslava MIKOVÁ, Jana HÁZOVÁ, Petr KUGLÍK, Jana ŠMARDOVÁ a Eva MACHÁČKOVÁ. Syndrom Li-Fraumeni – diagnostické a preventivní možnosti. Kazuistika pacientky s delecí celého genu TP53. In: *Edukační sborník: XXXIV. Brněnské onkologické dny a XXIV. Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky*, Brno, 22. – 24. dubna 2010. Brno: Masarykův onkologický ústav v Brně, 2010, s. 108–109. ISBN 978-80-86793-15-3.
- [20] MOHELNÍKOVÁ-DUCHOŇOVÁ, Beatrice, Zdeněk KLEIBL, Ondřej HAVRÁNEK, Ivona HLAVATÁ, Lenka FORETOVÁ, Jan NOVOTNÝ, Petr POHLREICH, Ivana HOLCÁTOVÁ, Pavel VODIČKA a Pavel SOUČEK. Úloha genetických alterací v genu CHEK2 v etiologii kolorektálního karcinomu a karcinomu pankreatu. In: *Edukační sborník: XXXIV. Brněnské onkologické dny a XXIV. Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky*, Brno, 22. – 24. dubna 2010. Brno: Masarykův onkologický ústav v Brně, 2010, s. 109–110. ISBN 978-80-86793-15-3.
- [21] MEDICINE CONSULTANT. *Studie ukazuje proveditelnost protokolu screeningu u pacientů s Li-Fraumeni syndromem* [online]. 2019 [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <https://cze.medicine-consultant.com/study-shows-feasibility-cancer-screening-protocol-95871>
- [22] NATIONAL CANCER INSTITUTE. Division of Cancer Epidemiology and Genetics. *Frederick P. Li, M.D., pioneer in genetic causes of cancer, including Li-Fraumeni Syndrome, who had his start at NCI, dies* [online]. [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <https://dceg.cancer.gov/news-events/people-in-the-news/archive/frederick-li-obituary>
- [23] KUBÁČKOVÁ, Kateřina, Jana PRAUSOVÁ, Petr URIE, Alena PUCHMAJEROVÁ, Zdeněk LINKE, Jiří KOZÁK, Pavel DUPAL a Vít CAMPR. Li-Fraumeni syndrom: quadruplicita osteosarkomů a sarkomů měkkých tkání. In: *Edukační sborník: XXXV. Brněnské onkologické dny a XXV. Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky*, Brno, 21. – 23. dubna 2011. Brno: Masarykův onkologický ústav v Brně, 2011, s. 228. ISBN 978-80-86793-17-7.

- [24] ŘÍHOVÁ, Lenka. *Dědičné nádorové systémy u člověka*. České Budějovice, 2016. 73 s. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta zemědělská. Vedoucí práce Ing. et Ing. Božena Hosnedlová, Ph.D.
- [25] VAŠÍČKOVÁ, Petra, Eva MACHÁČKOVÁ, Jana HÁZOVÁ, Eva ŠTAHLOVÁ HRABINCOVÁ, Marie NAVRÁTILOVÁ, Marek SVOBODA a Lenka FORETOVÁ. Molekulárněgenetické testování genu TP53 v MOÚ Brno – syndrom Li-Fraumeni. In: *Sborník abstrakt: XXXVIII. brněnské onkologické dny a XXVIII. konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky*, Brno, 24. – 25. dubna 2014. Brno: Masarykův onkologický ústav, s. 28–29. ISBN 978-80-86793-32-0.
- [26] ŠTEFÁNEK, Jiří. *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online]. [cit. 2019-04-13]. Dostupné z: <https://www.stefajir.cz/?q=intron>
- [27] KŘÍHOVÁ, Miroslava. *Použití metody MLPA pro stanovení nebalancovaných změn genomu*, 2015. 46 s. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, fakulta zdravotně sociální. Vedoucí práce Mgr. Ondřej Scheinost.
- [28] MRC-Holland – MLPA. *MLPA* [online]. [cit. 2019-04-14]. Dostupné z: http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_fNPBLedDVp38p-CxU2h0mQ..
- [29] FRYŠÁK, Zdeněk. Současný klinický přístup k nádorům nadledvin. In: *Interní medicína pro praxi* [online]. 2001, 9, s. 407–409 [cit. 30.03.2019]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2001/09/05.pdf>
- [30] HARTMANN, Igor, Filip ČTVRTLÍK, Zdeněk FRYŠÁK, Martin DOLEŽAL, Pavel RAJMON a Vladimír ŠTUDENT. Adrenokortikální karcinom. In: *Urologie pro praxi* [online]. 2016, 17(5), s. 206–209 [cit. 30.03.2019]. Dostupné z: <https://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2016/05/02.pdf>
- [31] MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV. *Nádory nadledvin* [online]. [cit. 30.03.2019]. Dostupné z: <https://www.mou.cz/c74-nadory-nadledviny/di122>
- [32] FADRUS, Pavel, Radek LAKOMÝ, Petra HÜBNEROVÁ, Ondřej SLABÝ, Miloš KEŘKOVSKÝ, Tomáš SVOBODA, Václav VYBÍHAL, Eduard NEUMAN, Soňa KRYŠTOFOVÁ, Marek SOVA a Martin SMRČKA. Intrakraniální nádory – diagnostika a terapie. In: *Interní medicína pro praxi* [online]. 2010, 12(7 a 8), s. 376–381 [cit. 31.03.2019]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2010/07/10.pdf>

- [33] MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV. *Nádory mozku a míchy* [online]. [cit. 2019-03-31]. Dostupné z: <https://www.mou.cz/c71-c72-nadory-mozku-a-michy/di97>
- [34] LINKOS: Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně. *Leukemie* [online]. 2006 [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/patient-a-rodina/onkologicke-diagnozy/leukemie-c91-c95/leukemie-1/>
- [35] STARÝ, Jan. Leukémie u dětí ve 21. století. In: *Česko-slovenská pediatrie*. 2015, 70(2), s. 67–69. ISSN 0069-2328.
- [36] PANOVSÁ, Anna a Michael DOUBEK. Chronická lymfocytární leukemie – diagnostika a léčba. In: *Onkologie* [online]. 2013, 7(3), s. 117–120 [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2013/03/04.pdf>
- [37] PRAUSOVÁ, Jana. Karcinom prsu – problém i v 21. století. In: *Interní medicína pro praxi* [online]. 2010, 12(1), s. 26–32 [cit. 2019-04-06]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/int/2010/01/05.pdf>
- [38] CHOVANEC, Josef, Zuzana DOSTÁLOVÁ a Jana NAVRÁTILOVÁ. Karcinom prsu – aktuální problém. In: *Interní medicína pro praxi* [online]. 2008, 10(2), s. 84–89 [cit. 2019-04-06]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2008/02/10.pdf>
- [39] DUNDOVÁ, Ilona, Božena SŮVOVÁ, Vladislav TŘEŠKA, Ivana PAVLÍKOVÁ a Eva RYBYŠAROVÁ. Pokročilý karcinom prsu. In: *Interní medicína pro praxi* [online]. 2005, 1, s. 40–41 [cit. 2019-04-06]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2005/01/11.pdf>

6 ZDROJE OBRÁZKŮ

- [1] ALBERTS, Bruce, Dennis BRAY, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS, Martin RAFF, Keith ROBERTS a Peter WALTER. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 2005, s. 580. ISBN 80-902906-2-0.
- [2] U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. Genetics Home Reference. Your Guide to Understanding Genetic Conditions. *TP53 gene*. [online]. 2019, 26. 2. 2019 [cit. 2019-03-01]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TP53#location>
- [3] CAMPBELL, Neil A. a Jane B. REECE. *Biologie*. 1. vyd. Brno: Computer Press, c2006. ISBN 80-251-1178-4.
- [4] U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. Genetics Home Reference. Your Guide to Understanding Genetic Conditions. *What are the different ways in which a genetic condition can be inherited?* [online]. 2019, 19.03.2019 [cit. 2019-04-01]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/inheritance/inheritancepatterns>
- [5] VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE. *Vydavatelství VŠCHT Praha* [online]. [cit. 2019-04-13]. Dostupné z: https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/exon.html
- [6] BITESIZE BIO. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)* [online]. [cit. 2019-04-14]. Dostupné z: <https://bitesizebio.com/41396/mlpa/>
- [7] ŠMARDOVÁ, Jana a Jana KOPTÍKOVÁ. Brazílský příběh mutace p53 R337H. In: *Klinická onkologie* [online]. 2014, 27(4), s. 247–254 [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/187/4515.pdf>
- [8] LINKOS: Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně. *Leukemie* [online]. 2006 [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/patient-a-rodina/onkologicke-diagnozy/leukemie-c91-c95/leukemie-1/>