

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2021

Marie Netočná

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Syndromy chromozomální instability a jejich genetická diagnostika

Bakalářská práce

2021

Marie Netočná

UNIVERZITY OF PARDUBICE
FAKULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
Department of Biological and Biochemical Sciences

Chromosome Instability Syndromes and their Genetic Diagnostics

Marie Netočná

Bachelor thesis

2021

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Marie Netočná**
Osobní číslo: **C17366**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Syndromy chromozomální instability a jejich genetická diagnostika**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

- 1) Vypracujte literární rešerši o vzácné hereditární skupině syndromů chromozomální nestability.
- 2) Charakterizujte typ dědičnosti, vysvětlete etiopatogenezi a popište fenotypické projevy vybraných syndromů.
- 3) Rozvedte metodické postupy cytogenetické a molekulárně genetické diagnostiky.
- 4) Zohledněte současné a výzkumné možnosti v laboratorní diagnostice případně strategii cílené léčby onemocnění.
- 5) 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 pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Lucie Stříbrná, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Markéta Gančarčíková**
Katedra porodní asistence a zdravotně sociální práce
Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

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

Prohlašuji:

Práci s názvem „**Syndromy chromozomální instability**“ a jejich genetická diagnostika jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

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

V Pardubicích dne 16.7.2021

Marie Netočná

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala Mgr. Markétě Gančarčíkové za odborné vedení, trpělivost, ochotu a přátelský přístup, který mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Lucii Stříbrné, Ph.D. za vedení a poskytnutí cenných rad pro zpracování. Děkuji také své rodině a přátelům za jejich podporu a trpělivost při vypracovávání bakalářské práce, ale i během celého studia.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá charakteristikou vzácných vrozených syndromů chromozomální instability, tedy etiopatogenezí onemocnění a jeho fenotypovým projevem. Dále je v práci detailně popsána diagnostika onemocnění SCI, která se opírá jak o klinickou, tak především o laboratorní diagnostiku. V laboratorní diagnostice je uveden přehledný výčet metod od konvenční cytogenetické analýzy až po metody molekulárně genetické. V neposlední řadě se práce věnuje možným preventivním opatřením a léčbě SCI.

KLÍČOVÁ SLOVA

Chromozom, chromozomová nestabilita, syndrom, gen, mutace, karcinom, diagnostika, fenotypové projevy

TITLE

Chromosome Instability Syndromes and Their Genetic Diagnostics

ANNOTATION

The bachelor thesis deals with the characteristics of rare congenital syndromes of chromosomal instability, the etiopathogenesis of the disease and its phenotypic manifestation. Furthermore, there is a detailed SCI diagnosis, which is based on both clinical and mainly laboratory diagnostics. In laboratory diagnostics exist a clear list of methods from conventional cytogenetic analysis to molecular genetic methods. Finally, the thesis deals with possible preventive measures and treatment of SCI.

KEYWORDS

Chromosome, chromosome instability, syndrome, gene, mutation, carcinoma, diagnostics, phenotypic manifestations

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	9
SEZNAM TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	11
TERMINOLOGIE.....	13
ÚVOD	15
1 VZÁCNÁ HEREDITÁRNÍ SKUPINA SYNDROMŮ CHROMOZOMÁLNÍ INSTABILITY	16
1.1 DĚDIČNOST A PREVALENCE SYNDROMŮ CHROMOZOMÁLNÍ INSTABILITY V POPULACI	17
2 SYNDROMY CHROMOZOMÁLNÍ INSTABILITY	19
2.1 LOUIS-BAROVÉ SYNDROM ATAXIE TELEANGIEKTAZIE (AT)	19
2.2 NIJMEGEN BREAKAGE SYNDROM (NBS)	20
2.3 SYNDROM LIGÁZY IV (LIGIV)	24
2.4 BLOOMŮV SYNDROM (BS)	26
2.5 FANCONIHO ANÉMIE (FA)	30
2.6 WERNERŮV SYNDROM (WS)	34
2.7 XERODERMA PIGMENTOSUM (XP)	36
3 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA	39
4 MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA.....	40
4.1 MLPA (CNV- COPY NUMBER VARIANTION)	40
4.2 SANGEROVO SEKVENOVÁNÍ.....	43
4.3 MASIVNĚ PARALELNÍ SEKVENOVÁNÍ (NEXT GENERATION SEQUENCING, NGS)	45
4.3.1 Pyrosekvenování (Roche 454)	46
4.3.2 SOLiD.....	47
4.3.3 Ion Torrent	47
4.3.4 Illumina (Solexa).....	48
5 CYTOGENETICKÁ DIAGNOSTIKA	52
5.1 STRUKTURA KARYOTYPU	52
5.2 CHROMOZOMOVÉ ABERACE	52
5.3 VYŠETŘENÍ KARYOTYPU (G-PRUHOVÁNÍ)	54
5.4 VYŠETŘENÍ ZÍSKANÝCH CHROMOZOMOVÝCH ABERACÍ (ZCA).....	56
5.5 VYŠETŘENÍ SCE	57
6 LÉČBA	60
7 ZÁVĚR.....	61

8	POUŽITÁ LITERATURA	63
9	ZDROJE OBRÁZKŮ.....	75
10	ZDROJE TABULEK.....	77

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Typické rysy syndromů chromozomální instability	17
Obrázek 2: Teleangiektázie.....	20
Obrázek 3: Analýza mutací <i>NBS1</i>	21
Obrázek 4: Fenotyp obličeje dítěte u NBS.....	23
Obrázek 5: Duplexní palec.....	23
Obrázek 6: Pacient ve věku 12 let s typickými dysmorfními rysy pro LIGIV	26
Obrázek 7: <i>BLM</i> gen v genomickém umístění.....	27
Obrázek 8: Pacient s teleangiektatickým erytémem	28
Obrázek 9: Dvojčata s Fanconiho anemií	33
Obrázek 10: Gen <i>WRN</i>	35
Obrázek 11 Pacientka s WS	35
Obrázek 12: Poškozená dvoušroubovice UV zářením.....	36
Obrázek 13: Princip MLPA.....	41
Obrázek 14: Elektroforeogram metody MLPA s využitím probemixu pro gen ATM	42
Obrázek 15: Vizualizace analýzy dat pro gen ATM metodou MLPA.....	43
Obrázek 16: Chemická struktura ddNTP a jeho princip při syntéze nového úseku DNA	44
Obrázek 17: Výsledný sekvenogram: ukázka výsledku analýzy pacienta s detekovanou missense variantou v <i>BLM</i> genu (<i>BLM:c.1642C>T</i>)	45
Obrázek 18: Můstková amplifikace	49
Obrázek 19: Vlastní sekvenování	50
Obrázek 20: Chromozomové aberace	54
Obrázek 21: Karyotyp chlapce (46,XY) s diagnostikovaným Bloomovým syndromem	56
Obrázek 22: Vyšetření ZCA chlapce s BS.....	57

Obrázek 23: Ukázky výměn sesterských chromatid.....	58
Obrázek 24: SCE u chlapce s Bloomovým syndromem.....	59

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Kombinační čtverec pro genotyp	18
Tabulka 2 Přehled syndromů chromozomální nestability v celosvětové populaci	18
Tabulka 3 Klinické vlastnosti pacientů s deficitem DNA ligázy IV	25
Tabulka 4 Výskyt rakoviny u 136 osob BS.....	30
Tabulka 5 Identifikované geny Fanconiho anémie a jejich umístění.....	32

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

A – adenin

ALL – akutní lymfocytární leukémie

AML – akutní myeloidní leukémie

APS – adenosin 5'-fosfosulfát

AT – Ataxie teleangiektazie

ATP – adenosintrifosfát

BMI – Body Mass Index

BRCT – BRCA 1 C-terminální doména

BrdU – bromdeoxyuridin

BS – Bloomův syndrom

C – cytosin

CNV – copy number variantion

DBS – double-strand breaks

ddATP – dideoxyadenin trifosfát (ddTTP, ddCTP, ddGTP)

ddNTP – dideoxynukleotid trifosfát/ dideoxynukleotidy

DEB – diepoxybutan

DM – diabetes mellitus

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTP – deoxynukleotid trifosfát

emPCR – emulzní PCR

FA – Fanconiho anémie

FHA – fork head-associated domain

FISH – Fluorescenční *in situ* hybridizace

FPG – Fluoresce Plus Giemsa

G – guanin

G-band – G-pruhování

GIT – gastrointestinální trakt

CHOPN – chronická obstrukční plicní nemoc

IDDM – inzulin dependentní diabetes mellitus

LIGIV – Syndrom ligázy IV

MDS – myelodysplazie/ myelodysplastický syndrom

MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

MMC – mitomycin C

MPS – masivně paralelní sekvenování

MPSS – Massively Parallel Signature Sequencing

NBS – Nijmegen breakage syndrom

NER – nukleotidová excizní reparace

NGS – Next Generation Sequencing

NHEJ – nehomologní koncový spojovací mechanismus

NIDDM – non-inzulin dependentní diabetes mellitus

PCR – polymerázová řetězová reakce

RPO – pravá oligonukleotidová sonda

SCE – výměna sesterských chromatid (Sister Chromatide Exchanges)

SCI – Syndromy chromozomální instability (CIS)

SOLiD – Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection

T – thymin

TLS – translesní syntéza DNA

WS – Wernerův syndrom

XP – Xeroderma pigmentosum

ZCA – získané chromozomové aberace (Slovník cizích slov, 2005; Velký lékařský slovník, 2021)

TERMINOLOGIE

Aberace: strukturní změna chromozomů, např. zlomy, delece, translokace

Alela: konkrétní forma genu

Amplifikace: zmnožení DNA, zvýšení počtu kopií příslušného úseku pro její další vyšetření

Báze: heterocyklické sloučeniny purin a pyrimidin, které tvoří součást nukleotidů

Bialelický: lokus, ve kterém jsou známy dvě alely

Bilaterální: oboustranný

Denaturace: změna fyzikálních a fyziologických vlastností látek vedoucí ke změně či ztrátě jejich přirozených funkcí

DNA knihovna: kolekce klonovaných DNA fragmentů genomu určitého organismu

Exon: část genu, která obsahuje vlastní dědičnou informaci

Fenotyp: pozorovatelný vzhled či vlastnost jedince, který je výsledkem jeho dědičných vloh genotypu a působení prostředí

Gap: poškozená oblast chromozomu

Gen: základní jednotka dědičnosti

Genom: soubor všech struktur nesoucích genetickou informaci ve formě DNA

Genotyp: souhrn všech dědičných vloh jedince uložený v genech

Heterozygot: jedinec, který má ve svém genovém páru dvě různé alely

Homozygot: jedinec, který má ve svém genovém páru dvě stejné alely

Hybridizace: křížení

Chromozom: buněčná struktura v jádře eukaryotních buněk

Intron: část genu, která neobsahuje vlastní dědičnou informaci nutnou pro tvorbu bílkoviny

Karyotyp: soubor chromozomů uspořádaný podle jejich jednotlivých druhů v diagramu

Lokus: místo na chromozomu, kde je lokalizován určitý gen

Malformace: vrozená vývojová vada

Missense mutace: bodová mutace, při které je změněn příslušný kodon což vede k záměně aminokyseliny

Mutace: změna genetické informace

Nukleotid: základní stavební jednotka nukleových kyselin

Prenatální: před narozením

Replikace: proces zdvojení DNA

Sekvence: pořadí

Sekvenogram: znázorňuje pořadí jednotlivých nukleotidů

Sesterská chromatida: jedno ze dvou vláken zdvojeného chromozomu

Telomera: koncová část chromozomu

Templát: polynukleotidový řetězec, který slouží jako matrice pro zdroj informací při tvorbě nukleových kyselin (Slovník cizích slov, 2005; Velký lékařský slovník, 2021)

ÚVOD

Předložená bakalářská práce se zaměřuje na souhrn poznatků o vzácné hereditární skupině syndromů chromozomální instability, pro kterou je typická porucha reparace DNA. V důsledku toho jsou buňky postiženého jedince velmi citlivé k okolním negativním vlivům a snadno v nich dochází ke kumulaci aberací s následným vznikem nádorového bujení.

Úvodní stránky práce popisují obecně syndromy chromozomální instability s charakteristikou typu dědičnosti a prevalencí v celosvětové populaci.

Dále se práce zabývá výčtem syndromů s jejich etiopatogenezí, tedy příčinou, která vede k rozvoji onemocnění. Syndromy jsou popisovány z hlediska genotypu, tak i jejich fenotypických projevů velmi často prostupujících v malignity, u kterých je třeba jednat rychle a rozvážně.

Diagnóza onemocnění se určuje podle klinických příznaků pacienta společně s laboratorním vyšetřením. Důležitou částí bakalářské práce je proto laboratorní diagnostika, která využívá metod klasické konvenční cytogenetické analýzy, ale i sofistikovaných a nejmodernějších postupů molekulární genetiky, jakým je přístup sekvenování nové generace. Prenatální diagnostika je možná v případě známé, resp. detekované mutace v rodině, která bývá pro rodinu typická až unikátní. V práci jsou zmíněné základní principy laboratorních diagnostických metod.

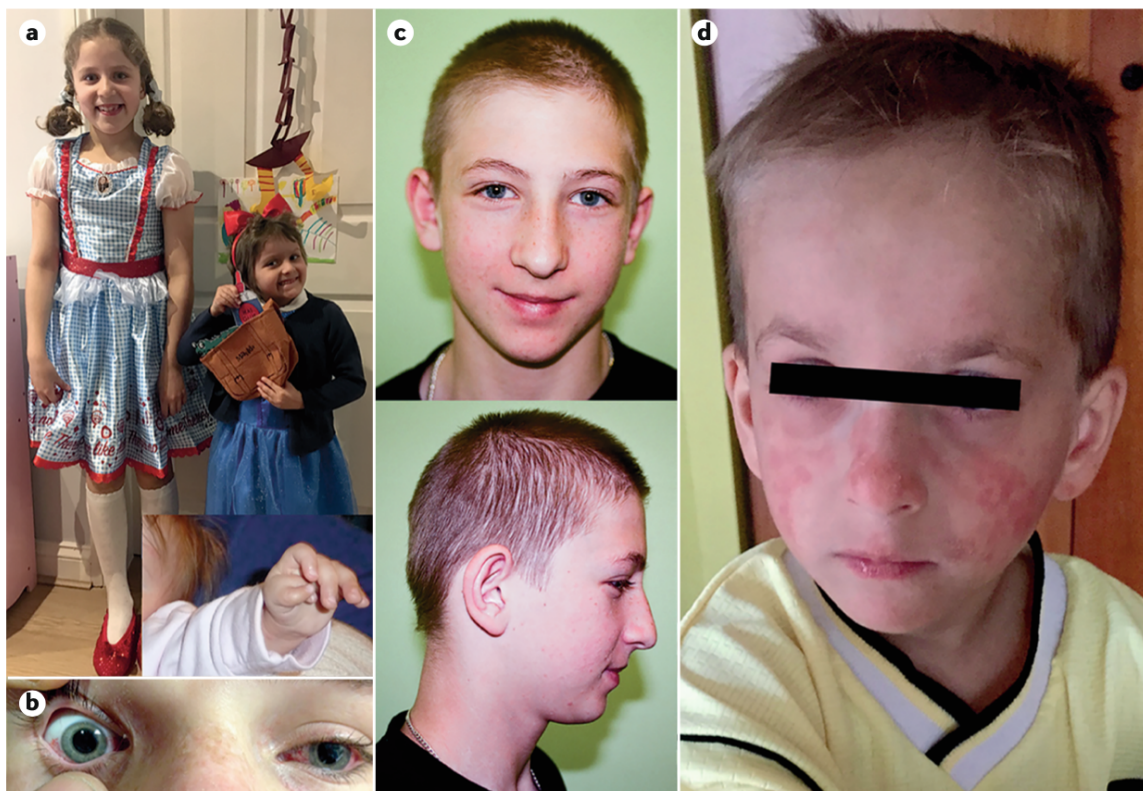
Závěr práce se věnuje strategii léčby syndromů chromozomálních instabilit spolu s jejich včasnou prevencí. Terapie zahrnuje především zmírnění symptomů daného onemocnění s cílem zkvalitnit a prodloužit život pacienta postiženého takto závažným genetickým onemocněním.

1 VZÁCNÁ HEREDITÁRNÍ SKUPINA SYNDROMŮ CHROMOZOMÁLNÍ INSTABILITY

Syndromy chromozomální instability jsou velmi vzácnou skupinou onemocnění s převažujícím autozomálně recesivním typem dědičnosti asociovaných s poruchou reparačních mechanismů DNA, které vedou k chromozomové nestabilitě, zlomům chromozomů a řadě fenotypových konsekvencí zahrnující zvýšenou tendenci k rozvoji nádorových onemocnění.

Mezi tyto syndromy patří Loius-Barové syndrom ataxie teleangiektazie (AT), Nijmegen breakage syndrom (NBS), syndrom ligázy IV (LIGIV), Bloomův syndrom (BS), Fanconiho anemie (FA), Wernerův syndrom (WS) a Xeroderma pigmentosum (XP). Jejich fenotyp se projeví díky chybám, které se vyskytnou u oprav DNA řetězce při nedostatečné funkci DNA enzymů (ligáza I, ligáza II, ligáza IV, kináza, helikáza, topoizomeráza) (Seemanova, 2006). Každá porucha má individuální vzor poškození chromozomů, tudíž i základní porucha bývá často odlišná (Taylor, 2019). CSI zvyšují riziko vzniku určitých malignit (Wu, 2016).

Typické fenotypové projevy syndromů chromozomální instability jsou ukázány na Obrázku 1, a to konkrétně na Obrázku 1a) mikrocefálie a hypoplazie, tedy vrozené zmenšení obličeje a velmi malá postava, kterou vidíme u 5leté dívky (vpravo) ve srovnání s její zdravou 8letou sestrou (vlevo). U dívky menšího věku je diagnostikována Fanconiho anémie. Ve vloženém Obrázku 1a je snímek duplexního (dvojitého) palce postižené dívky před chirurgickou operací. Pro ataxii telangiektázi (Obrázek 1b) jsou typické oční teleangiektázie v podobě červených nitek. Vzhled Nijmegen breakage syndromu se týká převážně obličeje a lebky (mikrocefalie). Na Obrázku 1c) lze vidět výraznou střední část obličeje s dlouhým nosem, zatímco čelo a brada jsou méně výrazné. Chlapec s Bloomovým syndromem (Obrázek 1d) je vyfocen s charakteristickým erytémem, který je typický pro BS a vzniká v důsledku fotosenzitivity na sluneční světlo (Riboldi, 2020; Taylor, 2019;).



Obrázek 1: Typické rysy syndromů chromozomální instability (Převzato z: Taylor, 2019, <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0113-0>)

1.1 Dědičnost a prevalence syndromů chromozomální instability v populaci

Syndromy chromozomální instability (CIS) nesou obvykle autozomálně recesivní dědičnost (Wu, 2016). Dědičnost recesivního znaku znamená, že postižený jedinec nese v genotypu obě mutantní alely, a proto je recesivním homozygotem (Tabulka 1). Jeho rodiče jsou zpravidla zdraví heterozygoti, tedy přenašeči („Aa“). Pravděpodobnost postižení lze odvodit z kombinačního čtverce pomocí dominantních (zdravých) alel označených písmenem „A“ a recesivních (nemocných) alel označených písmenem „a“. Riziko postižení ze čtyř potenciálních potomků lze poté vyjádřit jako 25 % (Kočárek, 2008). Autozomálně recesivní i dominantní typ dědičnosti jsou pro obě pohlaví stejná, protože podmíněné geny jsou uloženy na nepohlavních chromosomech (Gregor, 2019).

Tabulka 1: Kombinační čtverec pro genotyp (Upraveno podle: Kočárek, 2008, http://www.fnmotol.cz/_sys_/FileStorage/download/2/1318/vybrane_aspekty_lekarske_genetiky.pdf)

		Otec	
		A	a
Matka	A	AA zdravý dominantní homozygot	Aa zdravý heterozygot (přenašeč)
	a	Aa zdravý heterozygot (přenašeč)	aa postížený recesivní homozygot

Syndromy chromozomální nestability vznikají při zvýšeném poškození chromozomů nebo při zvýšeném počtu sesterských chromatid, ale i kombinací obou dvou (Germain, 1982).

Tabulka 2: Přehled syndromů chromozomální nestability v celosvětové populaci (Upraveno podle: Čepová, 2004, <http://ulgrs.upol.cz/portal/wp-content/uploads/2010/11/ulg00019.pdf>)

Syndromy chromozomální nestability	Frekvence v populaci
Ataxie teleangiectázie	1:30 000–1:100 000
Bloomův syndrom	1:1 000 000–1:2 000 000
Fanconiho anémie	1:300 000
Nijmegen breakage syndrom	1:60 000–1:70 000
Wernerův syndrom	1:2 000 000–1:3 000 000
Xeroderma pigmentosum	1:1 000 000

Tabulka 2 shrnuje přehled syndromů chromozomální instability, podle níž jsou nejrozšířenějšími syndromy v populaci Ataxie teleangiectázie s frekvencí 1:30 000-1:100 000 a Nijmegen breakage syndrom s frekvencí 1:60 000-1:70 000 (Čepová, 2004).

2 SYNDROMY CHROMOZOMÁLNÍ INSTABILITY

2.1 Louis-Barové syndrom ataxie teleangiektazie (AT)

Ataxia telangiektázie (OMIM 208900) je autozomálně recesivně dědičné onemocnění. V roce 1926 ji poprvé popsali dva lékaři, Ladislav Syllaba a Kamil Henner (Wu, 2016).

AT je způsobena mutací v genu *ATM*, který je umístěn v chromozomovém lokusu 11q23 (Seemanová, 2006). Gen *ATM* (LRG_135) je složen z 63 exonů a kóduje protein ATM serin/threonin proteinovou kinázu o velikosti 350 kDa, která je zahrnuta v řadě rozdílných molekulárních mechanismů. Klíčová role proteinkinázy je oprava dvouvláknových zlomů DNA (z angl. *DNA double-strand breaks*, DBS), udržení genomové stability, regulace buněčného cyklu a buněčného přežití (Gatti, 1998; Lavin, 2008).

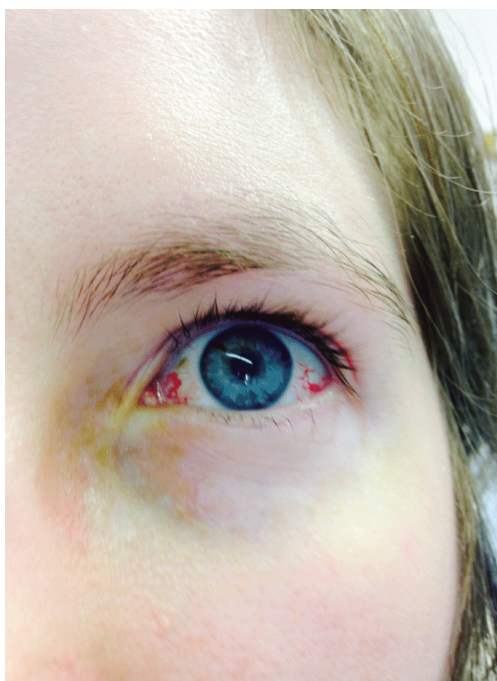
Ztráta funkce proteinu *ATM* způsobí aberantní proliferaci buněk v reakci na dvouvláknové zlomy DNA, což má za následek zvýšené riziko vzniku nádorového onemocnění a zvýšenou citlivost na radiosenzitivitu. Dále porucha proteinu *ATM* v kontrole buněčného cyklu může způsobit malformace, které se mohou projevit jako gonadální dysgeneze. *ATM* je také důležitý pro produkci imunoglobulinů a přežití lymfoidních buněk, proto nález patogenní varianty v genu *ATM* může vysvětlit, proč dochází k vyššímu riziku vzniku nádoru lymfoidního systému a manifestaci autoimunitního onemocnění (Riboldi, 2020; Taylor, 2019).

AT je v alelické heterogenitě význačná. Převážná část mutací v genu *ATM* vede ke zkrácení proteinu, a tedy k jeho instabilitě. U malého počtu pacientů může vlivem bodových či sestříhových mutací docházet k zachování aktivity *ATM* proteinkinázy. Existuje i lokusová heterogenita, do níž patří mutace v genu *MRE11* tvořící klinický fenotyp AT a dále mutace genu *RNF168*, které mají převážně imunologický defekt (Taylor, 2014).

Mezi klinické příznaky ataxie teleangiektazie se zejména řadí růstová retardace, imunodeficience s převážně nižší hladinou imunoglobulinů IgA, někdy i IgG, opakující respirační a bronchiální infekce, gonadální dysgeneze a vysoké riziko vzniku lymfomů. Kožní příznaky doprovází skvrny *café-au-lait* a předčasné stárnutí, které se projeví šedivěním a změnami na kůži. Dalšími klinickými příznaky mohou být muskulární slabost, zvýšená elasticita, infertilita. Vysoká hladina sérového alfa-fetoproteinu převládá u dvou třetin pacientů s AT (Krutílková, 2009; Seemanová, 2006).

Dalšími fenotypovými projevy AT jsou příznaky specifické, jež zahrnují hypoplazii mozečku. Do mozečku se nedostávají Purkyňovy buňky, a to způsobí časnou ataxii, které se

projeví ve věku batolete nejistým či opožděným sedem a později jako nestabilní chůze, což vede k neschopnosti chůze kolem puberty. Ve věku prvních školních let mohou mít pacienti problém s viděním a čtením, což ovlivňuje nastupující dysartrie a okulomotorická apraxie. Louis-Barové syndrom se také projeví v batolecím věku jako „andělský“ zjev dítěte, typický pro blond'até, modrooké děti se světlou kůží a je převážně míněn právě pro svůj tzv. „trpitelský“ výraz za každé situace (Riboldi 2020; Seemanová, 2006).



Obrázek 2: Teleangiektázie (Převzato z: Advances in clinical neuroscience and rehabilitation, 2015, <https://acnr.co.uk/2015/07/the-clinical-variability-of-ataxia-telangiectasia-an-update/>)

Téměř u všech pacientů s AT se vyskytují teleangiektázie, které se obvykle projevují po dosažení věku 6 let, přičemž mechanismus vzniku není zcela znám. Teleangiektázie vzniká jako rozšíření krevních cév kapilár či drobných žilek. Teleangiektázie jsou lokalizovány v očích, zejména ve spojivkách a na obličejí v místech volně vystavených slunci, především na tvářích a uších (Cabana, 1998; Riboldi, 2020). U diagnostikovaných pacientů se také může vyskytnout zvýšená hladina cholesterolu a triglyceridů, glukózová intolerance a inzulin dependentní diabetes mellitus (IDDM), nízká hladina vitamínu D a osteopenie (Taylor, 2019).

2.2 Nijmegen breakage syndrom (NBS)

První zmínka o Nijmegen breakage syndromu (OMIM 251260) byla v roce 1979 v Nizozemsku (Hustinx, 1979). Jedná se o autozomálně dědičnou poruchu, která se může také nazývat jako Nijmegen zlomový syndrom. V první kapitole jsme se již dozvěděli, že autozomálně recesivní dědičnost je charakterizována stejným postižením pro obě pohlaví, a to

z důvodu nesoucích genů na nepohlavních chromozomech (Gregor, 2019; Chrzanowska, 2012; Kafková, 2012).

Onemocnění způsobuje mutace v genu *NBN1* (dříve *NBS1*). Tento gen je lokalizován v chromozomovém lokusu 8q21. Nejčastěji se jedná o tzv. slovanskou mutaci c.657del5, kterou způsobuje delece 5 bází (Kafková, 2012). Zmíněný gen *NBN1* kóduje protein nibrin, který je součástí komplexu pro opravu DNA a je potřebný k reparaci dvouvláknových DNA zlomů. Laboratorní nálezy NBS zahrnují chromozomální nestabilitu v T-lymfocytech, B-lymfocytech a ve fibroblastech. Zároveň z cytogenetických studií vyplývá, že karyotyp je normální (46,XY či 46,XX), ale dochází k chromozomovému přeskupení, tzv. aberaci, chromozomů 7 a 14. Přestavby zahrnující chromozomy 7 a 14 jsou v místech 7p13, 7q34 a 14q11 (Chrzanowska, 2012; Kafková, 2012; Kniffin, 2009).



Obrázek 3: Analýza mutací *NBS1* (Převzato z: Seemanová, 2006, <http://www.dnalab.cz/publikace/NBS/NBS%20Seemanov%C3%A1%20E%20-%20JMG%203-2006.pdf>)

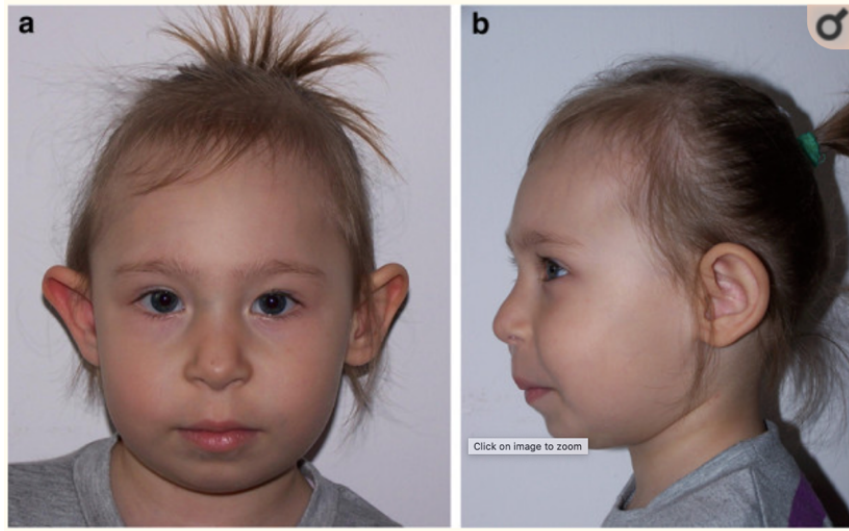
Obrázek 3 zobrazuje strukturu genu *NBS1* společně s jeho produktem, jež je protein nibrin. Na genu *NBS1* je celkem 11 mutací, které jsou označeny mutacemi 657del5 a 643C>T. Nibrinový protein a dva proteinové fragmenty vznikají již ze zmíněné mutace 657del5 (Seemanová, 2006). FHA (z angl. *fork head-associated domain*) je doména fosfopeptidů se zřetelnou specifitou pro epitopy, které obsahují fosfothreonin. Doména byla nalezena u 200

různých proteinů, mezi jejíž funkce jsou popisovány transkripce, transport proteinů, degradace proteinů a opravy DNA (Durocher, 2002). BRCT (BRCA 1 C-terminální) doména byla poprvé zjištěna v proteinu *BRCAl* jako marker vyskytující se při karcinomu prsu. BRCT obsahuje přibližně 95 aminokyselin a nachází se ve velkém počtu proteinů, které mají funkci rekombinace, opravy DNA a řízení buněčného cyklu při poškození DNA (Seemanová, 2006; Zhang, 1998). Ionizující záření aktivuje ATM kinázy a během ozařování buněk dochází k fosforylaci na serinu, což způsobí disociaci dimeru ATM a jeho následnou aktivaci. Aktivace ATM je podporována komplexem Mre11, který patří mezi reparační proteiny (Ćmielová, 2010).

Onemocnění NBS se vyskytuje celosvětově s výrazně vyšší prevalencí mezi střeoevropskou a východoevropskou populací a jsou publikované případy u obyvatele z České republiky, Polska, Ruska a Ukrajiny (Chrzanowska, 1995 a 2012; Kondratenko, 2007; Kostyuchenko, 2009; Seemanova, 1985).

Nijmegen breakage syndrom má hlavní klinické znaky stejné jako AT. U NBS se nevyskytují cerebelární projevy, na rozdíl od AT. Pro klinický fenotyp NBS je typická mikrocefalie, která je pozorována již u novorozence. Faciální dysmorfie se vyskytuje u všech pacientů, ale s postupujícím věkem je více zjevná. U obličeje dominuje střední část obličeje, která je zvýrazněna dlouhým nosem. Zatímco čelo i brada nejsou dominantní vzhledem k nedostatečnému vývoji lebky (viz Obrázek 1c).

Na Obrázku 4 je dívka ve věku 3,5 let s fenotypickými projevy mikrocefalie, vysokého čela, malého nosu, mikrognácií a větších dysplastických ušních boltců.



Obrázek 4: Fenotyp obličeje dítěte u NBS (Převzato z: Chrzanowska, 2012, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3314554/>)

Mentální fenotyp u NBS je popisován jako normální až mírně opožděný v ojedinělých případech je popisována střední mentální retardace. Dalším klinickým projevem je růstová retardace, přičemž u poloviny pacientů se vyskytnou drobné skeletální anomálie, jako je (duplexní) dvojitý palec, viz Obr. 5.



Obrázek 5: Duplexní palec (Převzato z: Chrzanowska, 2012, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3314554/>)

Dále jsou pozorovány kožní projevy, jako jsou tzv. pigmentové skvrny bílé kávy (*café-au-lait*), vitiligo a předčasné šedivění. Pacienti mohou trpět různými infekcemi močových cest nebo renálními chorobami z důvodu výskytu různých anomálií močových cest či ledvin. U dívek se vyskytuje hypergonadotropní hypogonadismus. Vývoj puberty u chlapců postupuje podobně jako u zdravých chlapců, ale zatím nejsou žádné zprávy, že by měli pacienti mužského rodu s NBS své vlastní potomky. Predispozice k malignitám u NBS je velice zvýšená. Ve věku 20 let riziko vzniku nádorových onemocnění stoupá, které může přejít v akutní lymfocytickou leukémii, lymfomy, mozkové tumory a gonadoblastomy (Bouchalová, 2017; Chrzanowska, 2012; Kočárek, 2008; Taylor, 1019).

2.3 Syndrom ligázy IV (LIGIV)

Syndrom ligázy IV nebo deficit DNA ligázy IV (OMIM 606593) je vzácné onemocnění, které je charakterizováno taktéž recesivně autozomální dědičností. Prevalence ve světové populaci není známa, protože je zatím globálně popsáno 28 případů (datováno k roku 2016). Etiologie je způsobena homozygotní nebo složenou heterozygotní mutací genu *LIGIV/LIG4*, který je lokalizován na chromozomu 13q22. DNA ligáza IV je jednou ze složek nehomologního koncového spojovacího mechanismu (NHEJ), jehož hlavní funkcí je oprava dvouřetězcových zlomů DNA (Altman, 2016; Gennery, 2012; Kniffin, 2012; Seemanova, 2006). Pacienti s deficitem DNA ligázy IV mají variabilní fenoty. Všichni pacienti vykazují senzitivitu na ionizující záření (Altman, 2016). Nejčastější klinické projevy jsou shrnuty u čtyř pacientů v Tabulce 3 (Driscoll, 2001).

Tabulka 3: Klinické vlastnosti pacientů s deficitem DNA ligázy IV (Upraveno podle: Driscoll, 2001, [https://www.cell.com/molecular-cell/fulltext/S1097-2765\(01\)00408-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1097276501004087%3Fshoall%3Dtrue#](https://www.cell.com/molecular-cell/fulltext/S1097-2765(01)00408-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1097276501004087%3Fshoall%3Dtrue#))

Vlastnosti	Pacient 411BR	Pacient 2303	Pacient 2304	Pacient 99P0149
Věk	9	46	48	9
Obličejové rysy	ptačí vzhled	Seckelův syndrom	Seckelův syndrom	Seckelův syndrom
Mikrocefalie	mikrocefalie při narození, ve věku 9 let není zřejmá	mikrocefalie	mikrocefalie	mikrocefalie
Vývojové/růstové zpoždění	globální vývojové zpoždění	zpomalený růst	zpomalený růst	trpaslictví, vývojové/mentální zpoždění
Imunodeficit	pancytopenie (cytopenie, lymfopenie, trombocytopenie)	pancytopenie, myelodysplasie, sinusitida	chronické respirační infekce	pancytopenie
Kožní stavy	plantární bradavice	chronické kožní stavy, fotodermatitida, teleangiektázie	fotodermatitida, psoriáza (lupenka)	vícenásobné psoriasiformní erytrodermické skvamózní kožní skvrny
Rakovina	X	X	X	X
Další		hypotyreóza, diabetes typu II, hypogonadismus	hypotyreóza, amenorea (nepřítomnost menstruace)	atypické zranění kostí
LIG4 genotyp	8C>T (A3V); 26C>T (T9I); 833G>A (R278H) homozygot	1738C/T (R/X580); 2440C/T (R/X814) složený heterozygot	1738C/T (R/X580); 2440C/T (R/X814) složený heterozygot	2440C/T (R/X814); 1406G/A (G/E469) složený heterozygot



Obrázek 6: Pacient ve věku 12 let s typickými dysmorfními rysy pro LIGIV (Převzato z: Gruhn, 2007, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17224058/>)

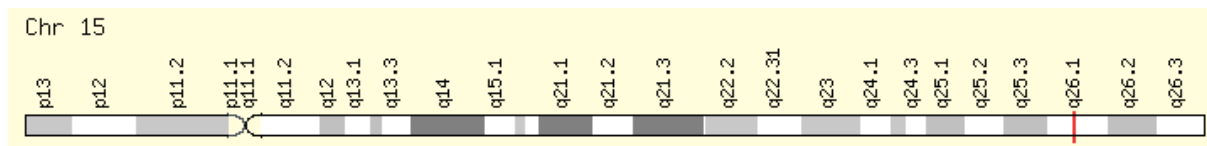
Na Obrázku 6 je pacient s klinickými znaky asociovanými se syndromem ligázy IV, který má vrozenou mikrocefalii a nadměrnou vzdálenost očí od sebe (hypertelorismus). U pacienta dominuje široký nos a tenký horní ret (Gruhn, 2007).

2.4 Bloomův syndrom (BS)

V roce 1954 dermatolog David Bloom popsal tři dětské pacienty s velmi podobným fenotypovým projevem. U těchto dětí byl nápadný telangiektatický erytém a malý vzrůst (Bloom, 1954). Bloomův syndrom (OMIM 210900) je vzácné autozomálně recesivní onemocnění, které je ve světové populaci 1:1 000 000 a u populace aškenázských Židů je frekvence nosičství 1:100 (Bouchalová, 2017; Čepová, 2004).

Onemocnění je způsobené mutacemi genu *BLM*, který je lokalizován na chromozomu 15 v lokusu 15q26.1, viz Obrázek 7 (Bouchalová, 2017; Gene CRDS, 2020). *BLM* protein zabraňuje výměnám sesterských chromatid a podílí se na udržování stability genomu. *BLM* je

gen obsahující 1417 aminokyselin kódující protein s 22 exony, jedná se o DNA-helikázu, která patří do RecQ domény. RecQ obsahuje u lidí proteiny WRN, REcQ1, REcQ4 a RecQ5. Jedna analýza RecQ z *Escherichia coli* nastínila, že tato doména vytváří tzv. strukturu okřídlené helixy, která se váže na DNA (Bouchalová, 2017; Gene CRDS, 2020; Cheok, 2005; Wu, 2016).



Obrázek 7: *BLM* gen v genomickém umístění (Převzato z: Gene Cards, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BLM&keywords=bloom,syndrome#summaries>)

U Bloomova syndromu se mohou vyskytovat i jiné aberace chromozomů, gapy a zlomy. V současné době jsou zaznamenány čtyři typy mutací, u třetiny pacientů byly detekovány inserce a delece, u další třetiny byly nalezeny nonsense mutace, které vedou k předčasnému ukončení translace a mají za následek zkrácení proteinu *BLM* genu. U 12 % jde o mutace intronů a čtvrtý typ je missense mutace. Také byla zaznamenána 12-15 x vyšší frekvence výskytu spontánních výměn sesterských chromatid (SCE), (Kočárek, 2008; Bouchalová, 2017). Při stanovení diagnózy BS nestačí jen samotná analýza SCE, protože zvýšené frekvence hladiny SCE byly evidovány u osob s bíalelickými patogenními variantami v genech *RMI1*, *RMI2* a *TOP3A*. Typickým nálezem pro BS je také zvýšená kvadiradiální konfigurace chromozomů (Qrs) (Flanagan, 2019).

Hlavním klinickým znakem pro BS je charakteristický deficit růstu, který ovlivňuje výšku, hmotnost, ale i obvod hlavy. Plod postižený BS je menší, přičemž porodní hmotnost u chlapců bývá okolo 1760 g a u postižených dívek kolem 1754 g. V dospělosti je průměrná výška u mužů 149 cm, u žen je 138 cm a průměrná hmotnost se pohybuje u mužů okolo 41,3 kg a u žen kolem 36,6 kg. Obličejové rysy bývají variabilní a nerozeznatelné od svých vrstevníků. U převážné části pacientů se jedná o úzkou a dlouhou tvář s retrognácií (abnormální postavení čelisti ustupující dozadu) nebo s micrognácií (abnormálně málo vyvinutá čelist) s dominujícím nosem a výraznými ušními boltci. Děti s BS mají sníženou chuť k jídlu, růst je pomalý a k jejich přírůstku na váze mohou pomoci výživové doplňky nebo perkutánní endoskopická gastronomie (PEG). V období dětství a dospívání mají pacienti málo podkožního tuku, ale u adolescentů se situace mění a může se u nich později vyvinout i centrální obezita (Cunnif, 2016; Flanagan, 2019).

Kůže dětí při narození je normální, ale vývojem jedince se stává citlivou na slunce. Citlivost na slunce způsobí zarudnutí na tvářích, na nosu případně na rukou. Tato vyrážka se vyvíjí v teleangiektatický erytém, viz Obrázek 8 (Flanagan, 2019). Vyrážka se může vyvinout i v poikilodermu. Mezi další kožní projevy patří cheilitida, alopecie areata (velká ztráta vlasů) a puchýře. Pacienti s BS mají zvýšené riziko onemocnění karcinomem kůže. Nejčastějším nádorem kůže bývá bazocelulární karcinom, který se vyvíjí ve spinocelulární karcinom. Převážně se nádory kůže objevují v okolí hlavy, krku nebo paží, což jsou části, které jsou volně exponované slunci (Cunnif, 2016).



Obrázek 8: Pacient s teleangiektatickým erytémem (Převzato z: Singh, 2010, Dostupné z: 10.4103/1817-1745.76124)

Na Obrázku 8 je desetiletý chlapec, který měl po několika měsících od narození vyrážku na obličeji, což naznačovalo fotosenzitivitu kůže. U chlapce byl popsán fenotyp erytematózních šupinatých plaků s teleangiektazií v oblasti tváří, nosu, dolního rtu, uší a krku, dále byly popsány klinické znaky typické pro BS, jakými jsou zakrslý růst či úzké a štíhlé tváře. Na tomto podkladu výše zmíněných znaků u pacienta diagnostikovali Bloomův syndrom (Singh, 2010).

Dalším klinickým projevem je imunodeficience. Při laboratorní analýze imunitního systému jsou koncentrace plazmatických imunoglobulinů až abnormálně nízké. Nejčastěji jsou

postiženy imunoglobuliny typu IgM a IgA, v nějakých případech i IgG. Počet B buněk a T buněk bývá normální. U některých pacientů bývají snížené hodnoty CD4, přičemž nedostatečná imunita může přecházet v infekci horních dýchacích cest nebo gastrointestinální infekci. U žádného pacienta s BS zatím nebyla popsána oportunní infekce (Cunnif, 2016; Flanagan, 2019).

V dospělosti jsou muži neplodní a ženy subfertilní. Pacienti mužského pohlaví mají normální pubertální vývoj. Spermioqram dospělého muže vykazuje známky azoospermie nebo oligospermie. Byl popsán jeden případ, kdy se pacient s BS stal otcem. Ženy mají naopak opožděnou pubertu a brzkou menopauzu, ale i přesto jsou často plodné (Cunnif, 2016; Flanagan, 2019; Taylor, 2019).

U většiny pacientů s BS je pozorována normální inteligence, pouze ojediněle je diagnostikována mentální retardace. Někteří měli problémy ve škole s předměty týkající se abstraktního myšlení, ale naopak mnoho z nich vynikalo při studiích a získali akademické tituly (Cunnif, 2016; Flanagan, 2019).

Bloomův syndrom doprovází řadu závažných onemocnění, které mohou průběh nemoci zhoršovat nebo předčasně ukončit. Mezi tyto nemoci patří chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN), myelodysplazie, diabetes mellitus (DM) a rakovina (Flanagan, 2019).

Chronické obstrukční plicní onemocnění je závažné zánětlivé plicní onemocnění, nazývané také jako chronická bronchitida či emfyzém vedoucí k dušnosti. CHOPN je nevyléčitelné a často u pacientů s BS je příčinou úmrtí (Cunnif, 2016; Mathers, 2006).

Myelodysplázie neboli myelodysplastický syndrom je onemocnění, ke kterému dochází při poškození vyzrávání a diferenciaci buněk kostní dřeně. Myelodysplázii diagnostikovali lékaři u 23 osob s BS a u 7 z nich se dále vyvinula v akutní myeloidní leukémii (AML) (Flanagan 2019; Komrokji, 2015; Steensma, 2014).

Zdravotní komplikace mohou zahrnovat zvýšené riziko diabetu. Jedná se o diabetes mellitus typu 2 (NIDDM), které není závislé na inzulinu. Paradoxně byl diabetes zpozorován u osob s nízkým BMI. Z registru 281 pacientů BS bylo diagnostikováno 16,7 %, tedy 47 pacientů s DM (Flanagan, 2019; Wu, 2016).

Nejčastější komplikací u pacientů BS je nádorové onemocnění, které patří mezi nejzávažnější onemocnění, a proto je rakovina převládající příčinou časného úmrtí. Nádorové onemocnění se objevuje před dosažením 20. roku života a nejčastěji ve formě akutní leukémie nebo maligních lymfomů. Později se nádorové onemocnění může manifestovat jako karcinom

jazyka, laryngu, plic, jícnu, střeva, kůže, prsu a děložního čípku. U jednoho pacienta s BS je typická multiplicita nádorů (Flanagan, 2019; Krutílková, 2009; Taylor, 2019).

Tabulka 4: Výskyt rakoviny u 136 osob BS (Upraveno podle: Cunniff, 2016, 10.1159/000452082.)

Místo / typ rakoviny	Věk při diagnóze (rozmezí)	Celkový počet diagnostikovaných
Karcinom		
Tenké a tlusté střevo	35 (16-49)	31
Kůže	32 (18-46)	27
Horní gastrointestinální a respirační cesty	38 (25-48)	22
Genitální a močové cesty	17 (<1-43)	19
Prsa	35 (21-48)	17
Dolní dýchací cesty	33 (26-40)	9
Játra	15	1
Hematologický		
Lymfom	22 (4-49)	35
Akutní lymfocytární leukémie	20 (5-40)	13
Akutní myeloidní leukémie	18 (2-47)	27
Další		
Sarkom	16 (4-30)	4
Zárodečná buňka	24 (22-26)	2
Meduloblastom	3	1
Retinoblastom	1	1
Metastáze - primární neznámý	34 (28-33)	3
Všechny rakoviny	27 (<1-49)	212

V Tabulce 4 je zobrazen výskyt nádorového onemocnění z registru 136 osob s BS, u kterých bylo diagnostikováno celkem 212 nádorů. Nejčastěji se vyskytují lymfomy a leukémie. Podle tabulky 4 byl průměrný věk ALL 20 let (rozmezí 5-40) a pro AML byl průměrný věk 18 let (rozmezí 2-47). K rozvoji AML došlo podle registru dvakrát častěji než k ALL. Před výskytem AML byla diagnostikována myelodysplázie (MS). Lymfom byl diagnostikován v průměrném věku 22 let (rozmezí 4-49) a mezi něj se řadily B-buňky a T-buňky. Podle statistiky se lymfom objevil v 75 % jako primární nádor, v sekundárním případě se objevil asi u 25 % případů (Cunniff, 2016).

2.5 Fanconiho anémie (FA)

Fanconiho anémie (OMIM 227650) byla poprvé popsána švýcarským pediatrem Guidem Fanconim v roce 1927, který ve své publikaci popsal rodinu se třemi bratry, u nichž diagnostikoval pancytopenii, makrocytózu a fyzické abnormality (Fanconi, 1927). Ke konci

šedesátých let byli pozorováni pacienti s FA se zvýšeným počtem chromozomových zlomů. Podle dalších studií se nakonec vysvětlilo, že diepoxybutan (DEB) nebo mitomycin C (MMC), které patří mezi zesíťující DNA činidla, mají specifické účinky na zvýšení lomivosti chromozomů, a tudíž tyto látky mohli identifikovat pacienty s FA s aplastickou anémií bez jakýkoliv vrozených vývojových vad, a naopak pacienti FA bez aplastické anémie s vrozenými vývojovými vadami (Auerbach, 2009; Lipton, 2018).

Fanconiho anémie (FA) patří mezi heterogenní poruchu s autozomálně recesivní dědičností. Výjimkou je mutace v genu *FANCB*, která je přenášena X-vázanou recesivní dědičností. FA je charakterizována selháním funkce kostní dřeně, vrozenými nebo vývojovými abnormalitami a zvýšenou náchylností k malignitám (Krutílková, 2009).

FA se vyskytuje po celém světě 1:300 000. Nejrozšířenější je u Židů aškenázského původu (varianta *FANCC*, *BRCA2*), Severoevropanů (*FANCC*), romské populace Španělska (*FANCA*) a u černošské populace Jihoafričanů (*FANCG*), (Mehta, 2018).

Mutace genů způsobují Fanconiho anémii a jsou rozděleny do komplementačních skupin, které jsou shrnuté v tabulce 5 i s jejich umístěním na chromozomech. Tyto geny produkují proteiny, které jsou začleněny do buněčného procesu nazývaný jako FA dráha (cesta). Při vytváření nových kopií DNA, tedy při replikaci DNA se dráha FA aktivuje kvůli možnému poškození DNA. FA dráha je poslem pro proteiny poškozených částí a obnoví tak replikaci DNA, která může nadále pokračovat. FA buňky mají na buněčném stupni zvýšené chromozomální aberace a jsou citlivé na interlinkdová zesíťovací činidla DNA (ICL). DNA ICL blokují replikaci a transkripci DNA. Určité léky proti malignitám spolu s nakupenými toxickými látkami, které jsou produkovány v těle, mohou zapříčinit ICL. Fanconiho anémie byla u 80–90 % pacientů zapříčiněna mutacemi tří genů – *FANCA*, *FANCC* a *FANCG*. Naopak mutace v genech *FANCE* a *FANCF* způsobují 8 % popsaných případů, dále 3 % případů jsou způsobeny mutacemi genu *FANCD1*, který je totožný s genem *BRCA2* (Younghoon, 2010; Wu, 2016; Mehta, 2018; Taylor, 2019; *U.S. National Library of Medicine*, 2020).

Tabulka 5: Identifikované geny Fanconiho anémie a jejich umístění (Upraveno podle: Wu 2016, 10.21037/tp.2016.03.04; Mehta, 2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1401/#fa.Summary>)

Komplemtační skupina	Gen	Chromozomový lokus	Gen	Chromozomový lokus
FA-A	<i>FANCA</i>	16q24.3		
FA-B	<i>FANCB</i>	Xp22.31		
FA-C	<i>FANCC</i>	9p22.3		
FA-D1	<i>FANCD1</i>	13q12.3	<i>BRCA2</i>	13.q13.1
FA-D2	<i>FANCD2</i>	3p25.3		
FA-E	<i>FANCE</i>	6p21.3		
FA-F	<i>FANCF</i>	11p15		
FA-G	<i>FANCG</i>	9p13		
FA-I	<i>FANCI</i>	15q26.1		
FA-J	<i>FANCI</i>	17q22	<i>BRIP1</i>	17q23.2
FA-L	<i>FANCL</i>	2p16.1		
FA-M	<i>FANCM</i>	14q21.3		
FA-N	<i>FANCN</i>	16p12	<i>PALB2</i>	16p12.2
FA-O	<i>FANCO</i>	17q25.1	<i>RAD51C</i>	17q22
FA-P	<i>FANCP</i>	16p13.3	<i>SLX4</i>	16p13.3
FA-Q	<i>FANCO</i>	16p13.12	<i>ERCC4</i>	16p13.12
FA-R	<i>FANCR</i>	15q15		
FA-S	<i>FANCS</i>	17q21		
FA-T	<i>FANCT</i>	1q32.1	<i>UBE2T</i>	1q32.1
FA-U			<i>XRCC2</i>	7q36.1
FA-V			<i>MAD2L2</i>	1.p36.22
FA-W			<i>RFWD3</i>	16q23.1

U pacientů s FA dále nalézáme gapy, chromozomové zlomy, a také i triradiály a kvadriradiály z nehomologních chromozomů (Bouchalová, 2017).

Lidé s FA jsou postiženi selháním kostní dřeně, a proto mají sníženou produkci krevních buněk. Nedostatek leukocytů vede k infekcím. Obvykle dochází k neutropenii. Erytrocyty přenášejí kyslík do tkání a jejich nedostatek způsobuje anémii, jejímž hlavním klinickým znakem je únava. Snížená funkce trombocytů, tedy trombocytopenie může vést k nadměrnému krvácení. Trombocytopenii často doprovázejí i zvýšené hodnoty fetálního hemoglobinu. U pacientů se může rozvinout také myelodysplastický syndrom a řada onkologických onemocnění hematologického typu (Auerbach, 2009; Gersten, 2016; Taylor, 2019; *U.S. National Library of Medicine*, 2020).

Přibližně u 75 % případů FA se vyskytují vrozené malformace. Dalšími projevy asociovanými s FA jsou růstová retardace s nízkou porodní hmotností a mikrocefalií. Na kůži se zpravidla objevují skvrny *café-au-lait*, hypopigmentace nebo hyperpigmentace. Někdy se mohou rozvinout i vývojové vady srdce či ledvin, mohou se vyskytnout i skeletální anomálie např. skolióza a anomálie především na palci jako je hypoplazie nebo nadpočetný palec (viz Obrázek 9). U těchto pacientů je dále typická mentální retardace, hypogonadismus, anomálie uší a hluchota. U zbylých 25 % případů se žádné vývojové vrozené vady spolu s dysmorfickými symptomy neobjevují (Auerbach, 2009, Krutílková, 2009; Mehta, 2018; Puchmajerová, 2016).



Obrázek 9: Dvojčata s Fanconiho anemií (Převzato z: Auerbach, 2009, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2742943/>)

Na Obrázku 9 jsou patnáctiletá jednovaječná dvojčata, která mají detekovanou patogenní variantu v genu *FANCA*. Dvojče A (vlevo, ruce nahoře) má hypoplastický levý palec, je po operaci s pravým bifidním palcem a chybí ji levá klíční kost. Dvojče B (vpravo) má jednostrannou absenci kosti vřetenní, dále je zde absence obou palců (dole) a chybění pravé klíční kosti (Auerbach, 2009).

Fanconiho anémii doprovází i řada endokrinních onemocnění, které zahrnují sníženou funkci hypofýzy s hypogonadismem, nedostatek růstového hormonu, sníženou funkci štítné žlázy, nedostatek inzulínu nebo odolnost vůči glukózové intoleranci (Auerbach, 2009).

Zhruba polovina pacientek FA je neplodná. Těhotenství bývá rizikové a je spojeno s výrazným selháním kostní dřeně. Muži jsou naopak zřídka plodní. U mužů jsou nalézány běžné genitální malformační nálezy, výsledky ze spermiogramu ukazují na snížený počet spermií a abnormální spermatogenezi (Auerbach, 2009).

Naděje ke zdokonalení léčby daly kmenové buňky kostní dřeně a pupečnickové krve, avšak ty musí být s pacientem kompatibilní. Bohužel i tak je u pacientů zvýšené riziko hematologických i solidních nádorů. Riziko u akutní myeloidní leukémie (AML) je zvýšené asi 500krát než u běžné populace. Většinou se AML diagnostikuje mezi 15 až 35 lety. Incidence u dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku (HNSCC) je 500 až 700krát vyšší než u normální populace. HNSCC se vyskytuje nejčastěji v okolí ústní dutiny, např. v jazyku, a postihuje pacienty mezi 20. až 40. rokem života. Dalšími nehematologickými nádory, které se objevují u 25-30 % pacientů jsou nádory kůže, GIT a pohlavních orgánů. U pacientů s komplementační skupinou FA-D1 (*FANCD1/BRCA2*) dochází k brzkému vývoji akutní leukémie, zpravidla k akutní lymfoblastické leukémii (ALL) a k solidním tumorům, zejména k meduloblastomu, nefroblastomu a jiným. Díky mutaci v genu *BRCA2* lze očekávat zvyšující se riziko karcinomu prsu (Krutílková, 2009; Mehta, 2018; Puchmajerová, 2016; Seemanová, 2008).

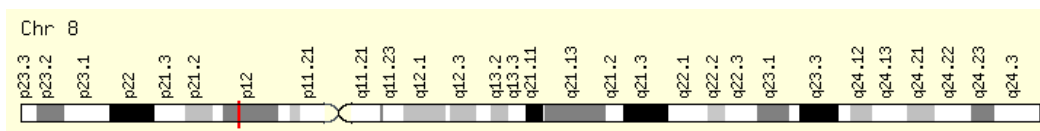
2.6 Wernerův syndrom (WS)

Wernerův syndrom (OMIM 277700) je vzácnou genetickou poruchou s autozomálně recesivní (AR) dědičností, jež charakterizuje progerie, tedy předčasné stárnutí. Němec Otto Werner v roce 1904 popsal rodinu, v níž byli čtyři sourozenci, kteří vykazovali předčasné šedivění vlasů (Werner, 1904). Termín „Wernerův syndrom“ jako první aplikovali Oppenheimer a Kugel (1934). V roce 1966 byl pomocí pozičního klonování objeven gen *WRN*, který způsobuje toto onemocnění (Gebhart, 1988; Oshima, 2016b; Sandoval, 2013).

Frekvence syndromu je ve světové populaci udávána mezi 1: 2 000 000 – 1: 3 000 000, avšak v některých zemích je prevalence onemocnění vyšší. V Japonsku je detekováno přibližně 1: 20 000 – 1: 40 000 patogenních variant v genu *WRN* v heterozygotním stavu a podobně tomu je i v sardinské populaci, kde je prevalence odhadována na 1: 50 000 (Čepová, 2004; Oshima, 2016a).

Onemocnění je způsobené kauzálními mutacemi genu *WRN*, který je lokalizován na chromozomovém lokusu 8p12 (viz Obrázek 10), přičemž gen *WRN* kóduje celkem 1432

aminokyselin. Tento gen patří do genové domény RecQ DNA helikáz a doprovází děje při opravě DNA, replikaci, transkripci a dále je asociován s délkou telomer. Bylo popsáno více než 70 patogenních variant v různých exonech genu *WRN* a mezi frekventní variantu je řazena patogenní varianta c.1105C>T (Bouchalová, 2017; Gene (NCBI), 2020; Lebel, 2017; Maierhofer, 2017; Oshima, 2016a).



Obrázek 10: Gen *WRN* (Převzato z: GeneCards, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=WRN&keywords=WRN,gene>)

Wernerův syndrom patří k jednomu z mála syndromů, u kterého se pacienti výrazně fenotypicky neprojevují. Prvním příznakem je zpomalený růst. Zhruba po 20. roce věku nastává progerie, která se projeví atrofii kůže, ztrátou podkožního tuku, bilaterálními očními zákaly, šedivěním a ztrátou vlasů (Krutílková, 2009; Oshima, 2016b).



Obrázek 11 Pacientka s WS (Převzato z: Hisama, 2006, DOI:10.1126/sageke.2006.10.pe18)

Na Obrázku 11 je skupina fotografií zachycující pacientku s WS v přibližných dekadách jejího života. U pacientky byla nalezena kauzální mutace, delece nukleotidů v pozici 2089 až 2825 (c. 2089-2825del; p.M696fsX705), v homozygotním stavu v genu *WRN* (Hisama, 2006). V dětství nejevila žádné abnormality (viz Obrázek 11, Age 8), avšak ve věku 36 let byla na operaci s šedým zákalem a v 56 letech měla bércové vředy v oblasti kotníku (Hisama, 2006).

Mentální retardace, dysmorfie, skeletální anomálie či jiné vývoje abnormality nejsou běžnými rysy WS, pokud jsou u pacienta přítomny, tak jsou patrně následkem nedávných poruch. Přibližně mezi 20–30. rokem věku doprovází WS řada běžných, ale i závažnějších nemocí. Mezi tyto poruchy se řadí diabetes mellitus 2. typu, hypogonadismus (např. ztráta fertility, atrofie varlat nebo vaječnicků), osteoporóza, ateroskleróza a malignity. Pacienti se v průměru dožívají 47 let. Nejčastější příčinou smrti jsou nádorová onemocnění nebo selhání

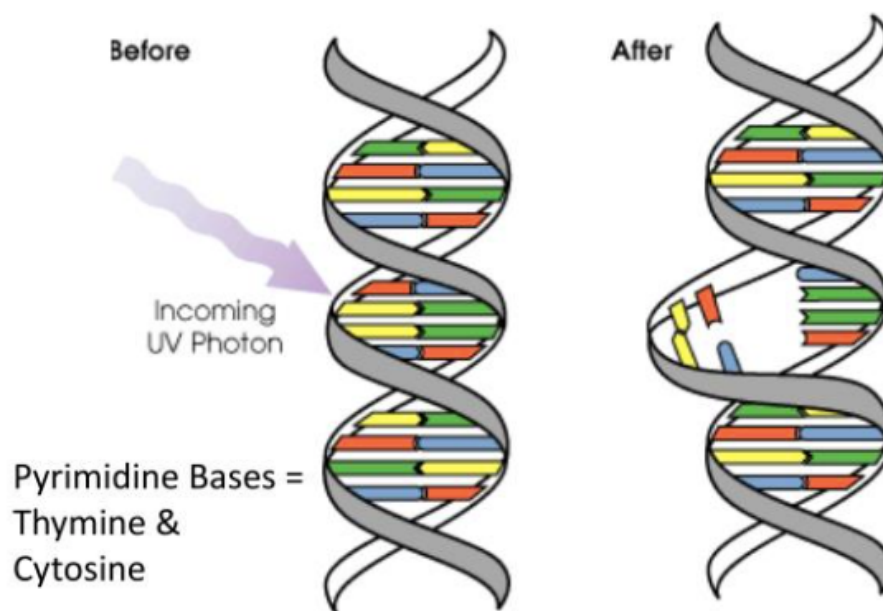
kardiovaskulárního systému, tedy infarkt myokardu. Nejběžnější formou rakoviny jsou sarkomy měkkých tkání, osteosarkomy, melanomy, meningiomy, karcinomy štítné žlázy a hematologické malignity (např. leukémie), (Krutílková, 2009; Oshima, 2016a; Oshima, 2016b).

2.7 Xeroderma pigmentosum (XP)

Xeroderma pigmentosum (XP) je vzácné autozomálně recesivní onemocnění, které je charakterizováno přecitlivělostí na sluneční světlo. Jako první popsali XP Hebra a Kaposi v roce 1874 (Hebra, 1874). Kaposi zaznamenal u pacientů suchou kůži a mnoho kožních nádorů v mladém věku (Black, 2016; Bouchalová, 2017; Cleaver, 1968; Reed, 1969).

Prevalence je 1:1 000 000 v USA i v Evropě. V některých populacích je riziko onemocnění vyšší, a to zejména v Japonsku (1: 22 000), severní Africe (Maroko, Libye, Egypt) a na Blízkém Východě (Turecko, Izrael, Sýrie), (Hirai, 2006; Kleijer, 2008; Kraemer, 1985).

Příčinou onemocnění jsou mutace vznikající při nukleotidové excizní reparaci (NER). Excizní reparace umožňuje poškozenou bázi odstranit a vyměnit za správnou. Pacienti se syndromem XP nejsou schopni opravit poškození způsobené UV zářením (viz Obrázek 12), (DiGiovanna, 2012; Slaninová, 2006).



Obrázek 12: Poškozená dvoušroubovice UV zářením (Převzato z: Wan, 2014, <https://www.slideserve.com/wan/ultraviolet-uv-disinfection>)

Mutace jednotlivých genů způsobující XP jsou rozděleny do komplementačních skupin, které jsou značené XP-A, XP-B, XP-C, XP-D, XP-E, XP-F, XP-G a XP-V (Bouchalová, 2017). Mutaci v komplementační skupině XP-A způsobuje gen *XPA* a u každé skupiny to pokračuje

obdobně. Gen *XPA* je lokalizován na chromozomovém lokusu 9p22.3 a kóduje replikační protein A. Tento podtyp XP-A je nejběžnější v Japonsku (Krutílková, 2009; Sugasawa, 2010; Black, 2016). Gen *XPB* (*ERCC3*) je umístěn na chromozomovém lokusu 2q21 (Black, 2016; Krutílková, 2009). Gen *XPC* je lokalizován na chromozomu 3p25. Při poškození DNA nereagují na opravu vazebné faktory DNA genu *XPC*, a proto dochází ke zvýšené tvorbě maligních nádorů v oblasti kůže a sliznic vlivem přecitlivělosti na slunce. Mutace genu *XPC* jsou nejrozšířenější v USA, Africe a v Evropě (Black, 2016; Krutílková, 2009; Sugasawa, 2010). Gen *XPD* (*ERCC2*) je umístěn na chromozomovém lokusu 19q13.2. Gen *XPE* kóduje *DDB2* a je situovaný na chromozomu 11p12-p11 (Black, 2016; Krutílková, 2009). Na DNA se váže buď heterodimer *DDB1* nebo *DDB2*. Tento heterodimer má funkci rozpoznat poškození DNA a pomocí NER jej opravit. Gen *XPF* je lokalizován na chromozomovém lokusu 16p13.3-p13.13. Gen *XPG* kóduje *ERCC5* a je umístěn na chromozomu 13q33. U komplementačních skupin XP-A až XP-G je poškozen systém NER. Naopak u variantní XP-V je NER účinný, ale není účinná oprava translesní syntézy DNA (TLS). XP varianta (XP-V) je způsobena mutacemi v genu *POLH*. Tento gen je lokalizován 6p21.1. Gen *POLH* obsahuje 11 exonů a 10 intronů (Black, 2016; Fassihi, 2016; ; Lehmann, 2011; Krutílková, 2009; Sugasawa, 2010).

Typickým nálezem v karyotypu jsou strukturní aberace, které zahrnují zlomy, gapy, dicentrické chromozomy, ring chromozomy a acentrické fragmenty (Bouchalová, 2017).

Rodiče probanda jsou heterozygotní přenašeči, kteří nemají klinické projevy a jejich sourozenci mají 50% riziko, že budou nosiči patogenní varianty pro XP. Sourozenci probanda mají při početí 25% šanci postižení, 50% šanci být asymptomatickými nosiči a 25% šanci, že nezdědí žádnou patogenní variantu od svých rodičů (Christen-Zaech, 2009).

Fenotypické projevy jsou charakterizovány především očními, kožními a nervovými defekty. Kožní symptomy začínají mezi 1-2 rokem věku. U všech pacientů se objevuje na kůži četná hyperpigmentace. Kůže je nepřetržitě vystavená slunci a způsobuje, že je pokožka suchá se zvýšenou pigmentací, a to je důvodem, že se tento syndrom nazývá Xeroderma pigmentosum neboli „suchá pigmentovaná kůže“. U převážné části jedinců se na kůži vytvoří puchýřky, erytém, poikilodermu a xerózu (DiGiovanna, 2012; Kraemer, 1987; Kraemer, 1994).

Oční abnormality jsou přibližně ve stejném měřítku jako ty kožní. Pacienti trpí fotofobií. UV záření zasahuje přední část oka, tedy spojivky, rohovky a víčka. Ve spojivkách vznikají záněty. Těžká keratitida způsobuje zakalení rohovky a vaskularizaci. Atrofie víček způsobuje

ektropii, entropii nebo v těžkých případech i úplnou ztrátu vícečetek (Brooks, 2013; DiGiovanna, 2012; Dollfus, 2003; Kraemer, 1987; Kraemer, 1994).

Neurologické abnormality se mohou vyskytovat již v dětství. Defekty nervového systému se vyskytují zhruba u 25 % jedinců a řadí se mezi ně mikrocefalie, snížená inteligence, ztráta sluchu a snížená funkce šlachových reflexů. Při infekci horních cest může u některých pacientů dojít k potížím s polykáním. Při pitvevním ohledáním pacientů s XP byla zjištěna i absence neuronů, obzvláště v mozku a mozečku, což podporuje fenotypické projevy spojené s neurologickými abnormalitami (DiGiovanna, 2012; Lai, 2013; Rapin, 2000; Viana, 2013).

U osob s příznaky neurodegenerace je průměrný věk úmrtí 29 let a u osob, které nejeví žádné neurologické abnormality je střední věk úmrtí 37 let. Nejčastější příčinou smrti je z 34 % karcinom kůže, z 31% neurologická degenerace a z 17 % rakovina vnitřních orgánů (Kraemer, 2003). Nádorové onemocnění je u XP nejčastější příčinou předčasné smrti. Kožní nádory se mohou vyskytnout již od 8 let a 2/3 pacientů na ně umírá do 20 let věku. Mladší jedinci pod 20 let mají zvýšené riziko rakoviny kůže bez melanomu. Jedinci nad 20 let mají 2 000krát vyšší riziko kožního melanomu. U některých pacientů exponovaných slunečnímu záření se vyskytují karcinomy v okolí dutiny ústní a na špičce jazyka. XP je asociovaná s řadou nádorových onemocnění jakými jsou karcinomy dělohy, prsu, slinivky břišní, žaludku, ledvin, varlat, tumory mozku a míchy nebo i leukémie. Některé karcinogeny v cigaretovém kouři mají schopnost se vázat na DNA, což může způsobit narušení integrity a poškození DNA a u pacientů s XP, kteří mají porušen mechanismus NER, může cigaretový kouř ve zvýšené míře přispět ke vzniku karcinomu plic (Bradford, 2011; Butt, 2010; Fassihi, 2016; Lai, 2013; Kraemer, 1987; Kraemer, 1994).

3 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

Každý syndrom chromozomální instability se liší svým fenotypovým projevem. Diagnóza onemocnění se nejčastěji určuje díky klinickým příznakům jedince a pomocí rutinních laboratorních metod. Předjít onemocnění v současnosti není možné, ale může se využít prenatální či preimplantační diagnostika, která je dostupná pro rodiny s dítětem postiženým syndromem chromozomální nestability (Taylor, 2019).

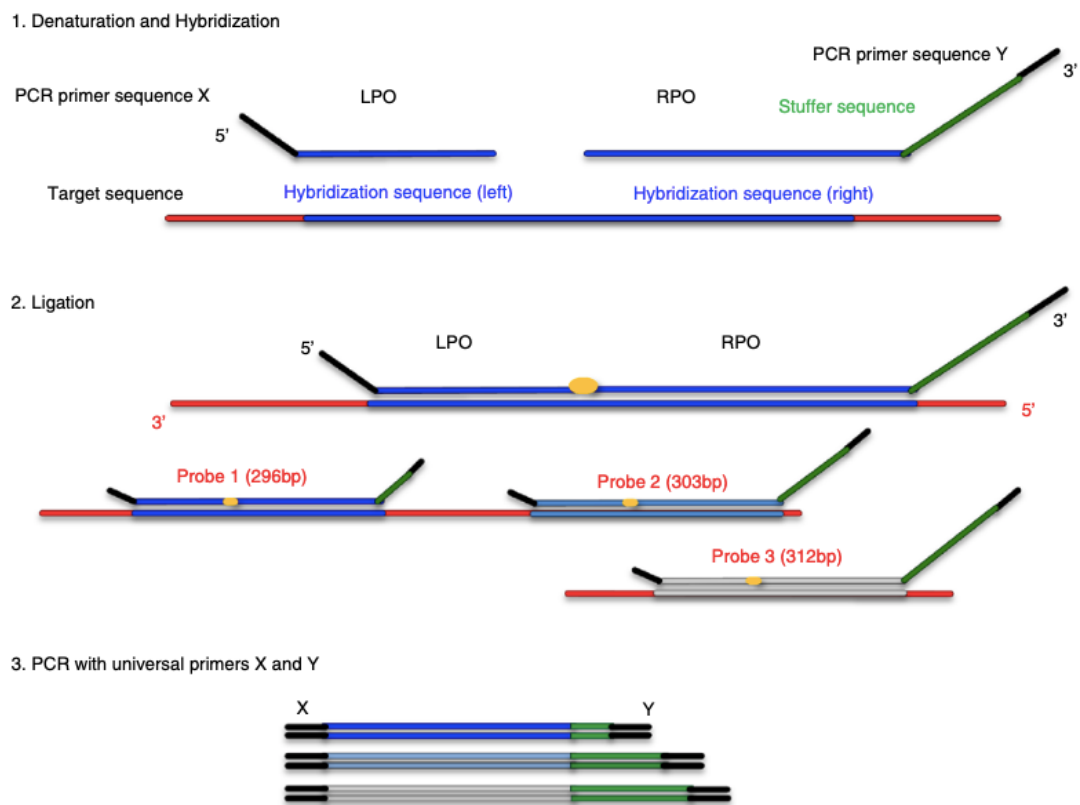
Mezi molekulárně genetická vyšetření patří metoda MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) a MPS (masivně paralelní sekvenování). Mezi standardní cytogenetická vyšetření se řadí vyšetření karyotypu pomocí klasické konvenční cytogenetické analýzy (G-pruhování) a také vyšetření spontánních chromozomových aberací (ZCA). Dalším cytogenetickým vyšetřením je detekce sesterských chromatidových výměn (SCE) z periferních lymfocytů pomocí techniky FPG (Fluorescence Plus Giemsa) (Schouten, 2002; Šípek, 2010-2014; Šedivcová 2013).

4 MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA

4.1 MLPA (CNV- copy number variantion)

V roce 1985 byla založena amsterdamská společnost MRC Holland Janem Schoutenem. V roce 2002 Schouten popsal techniku mnohonásobné amplifikace závislé na ligaci sond MLPA (z angl. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). Firma MRC Holland stále pokračuje s inovací nových vyšetření dle metody MLPA a v roce 2020 představili tzv. digitalMLPA™, která umožňuje číst více cílových sekvencí (mrcholland.com, 2021; Schouten, 2002).

Technologie MLPA je založená na multiplexní polymerázové řetězové reakci, při které získáme elektroferogram se změnami abnormálních počtů kopií analyzované DNA. Rozdílem od normální multiplexní PCR je v tom, že v MLPA není amplifikována DNA, protože se v MLPA amplifikují sondy hybridizované s cílovou sekvencí DNA (Höming-Hölzel, 2012; Schouten, 2019). MLPA probemixy mají sondy, které cílí na určitou genomovou sekvenci. MLPA sonda se skládá ze dvou částí: levé a pravé oligonukleotidové sondy (LPO a RPO). LPO obsahuje celkem 50 oligonukleotidů spolu s hybridizační sekvencí vedle které je navázaná sekvence primeru PCR X (značená černě). RPO obsahuje 30 oligonukleotidů a jako u první sondy obsahuje také hybridizační sekvenci a sekvenci primeru PCR Y. Na Obrázku 13 můžete vidět, že RPO má také nehybridizující sekvenci, která udává konkrétní délku sondy (značená zeleně) (Höming-Hölzel, 2012; MLPA-General-Protocol, 2019).



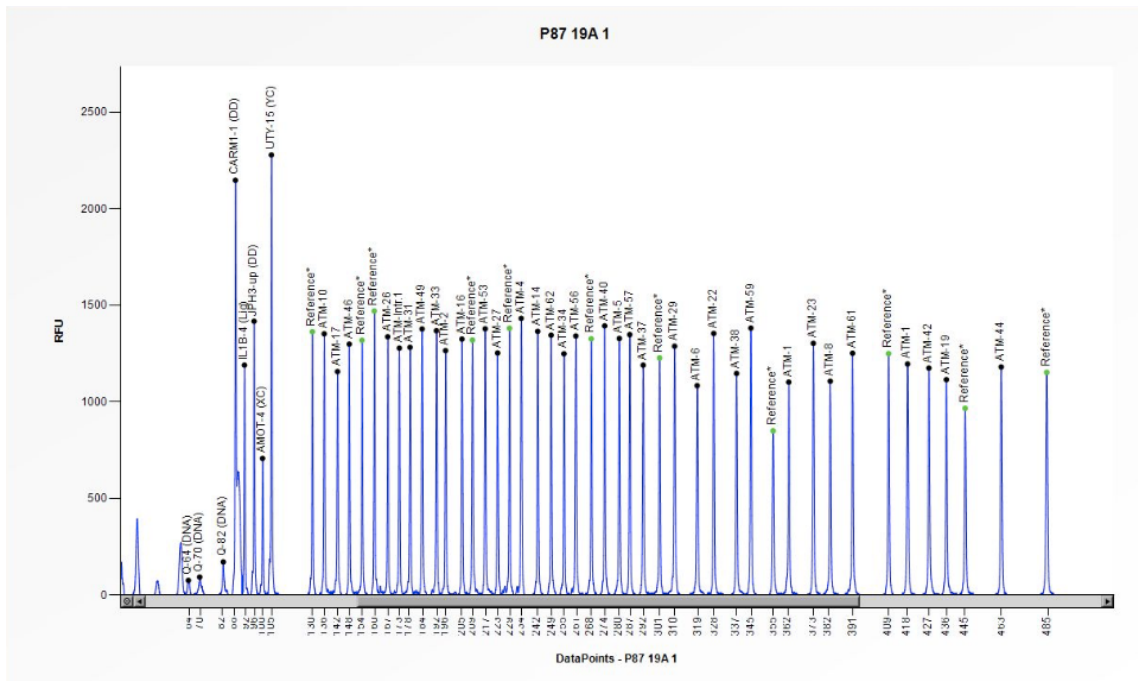
Obrázek 13: Princip MLPA (Převzato z: Höming-Hölzel, 2012, doi:10.1097/PDM.0b013e3182595516)

Celý proces začíná od purifikované DNA vzorku denaturací, poté je přidána směs tzv. MLPA prób a dochází k hybridizaci prób na cílené sekvenční DNA. Proces hybridizace trvá 16 hodin, a tak zpravidla bývá plánován přes noc. Po hybridizaci následuje ligace. Sondy jsou enzymaticky ligovány a vzniká templát pro následnou PCR reakci. V multiplexní PCR jsou všechny ligované sondy amplifikovány za použití jediného univerzálního páru primerů (PCR primer X a Y). Posledním krokem je separace fragmentů pomocí kapilární elektroforézy, protože výsledné produkty amplifikované MLPA mají různé délky sekvencí. Každý výsledný fragment odpovídá určité MLPA sondě (Höming-Hölzel, 2012; MLPA-General-Protocol, 2019).

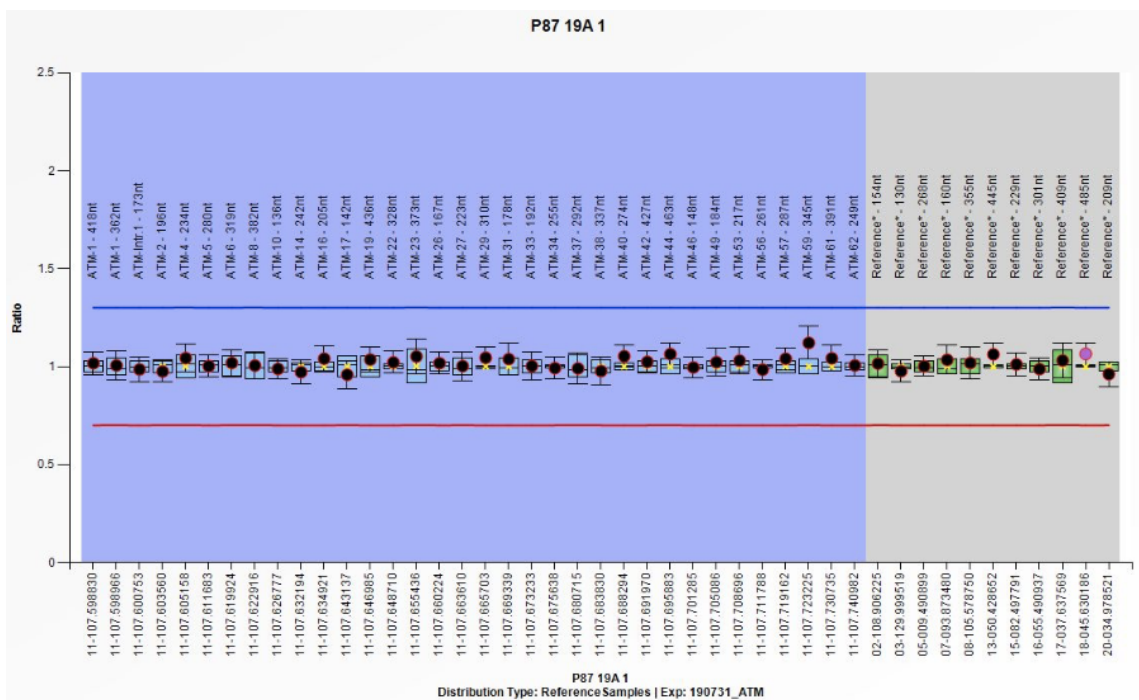
Technologie MLPA umožňuje rozlišit i sekvenční, které se liší pouze v jediném nukleotidu. MLPA se z tohoto důvodu používá k detekci známých mutací či ke stanovení metylačního stavu sekvencí DNA. Společnost MRC Holland nabízí MLPA probemixy pro detekci např.: aneuploidie chromozomů 13, 18, 21 X a Y, delece nebo duplikace specifických

chromozomových oblastí, mikrolece či mikroduplikace zahrnující pouze jeden nebo více exonů. Celkově jsou probemixy k dispozici pro více než 100 genů.

Technologie MLPA je spolehlivá metoda, která generuje výsledky do 24 hodin. Patří mezi nákladově efektivní metodu, protože vyžaduje jen standardní vybavení, které má majoritní část laboratoří zabývajících se molekulárně genetickou diagnostikou (Höming-Hölzel, 2012; Schouten, 2019).



Obrázek 14: Elektroforeogram metody MLPA s využitím probemixu pro gen ATM (se svolením Laboratoře lékařské genetiky s.r.o., Pardubice)



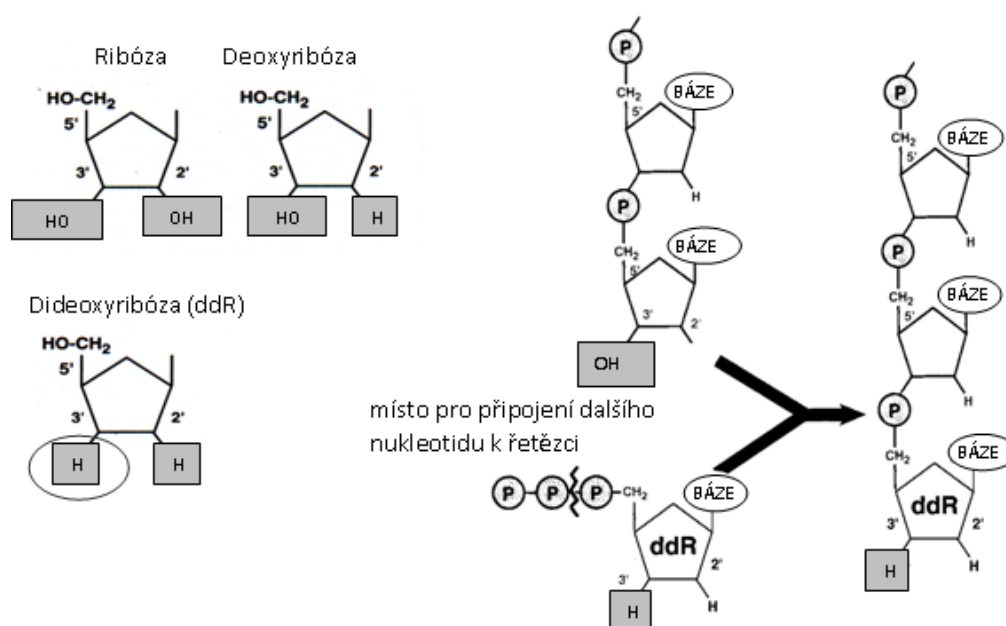
Obrázek 15: Vizualizace analýzy dat pro gen ATM metodou MLPA (se svolením Laboratoře lékařské genetiky s.r.o., Pardubice)

4.2 Sangerovo sekvenování

Sangerovo sekvenování poprvé popsal Frederick Sanger v roce 1977 (Sanger, 1977). Tato metoda se řadí mezi (enzymatické) metody přímého sekvenování DNA, díky kterému zjistíme přesné pořadí (sekvence) nukleotidů v molekule DNA. Dnes se do popředí dostává metoda masivně paralelního sekvenování, pod anglickým názvem Next Generation Sequencing (NGS), protože zachycuje analýzu genomu ve větším měřítku, čímž se zefektivní analýza, zrychlí diagnostika a snižují se náklady na analýzu. Sangerova metoda má i tak široké využití, protože se využívá pro sekvenování krátkých úseků a také pro verifikaci výsledků z techniky NGS (Bártová, 2011; D'argenio, 2015; Mendel, 2020).

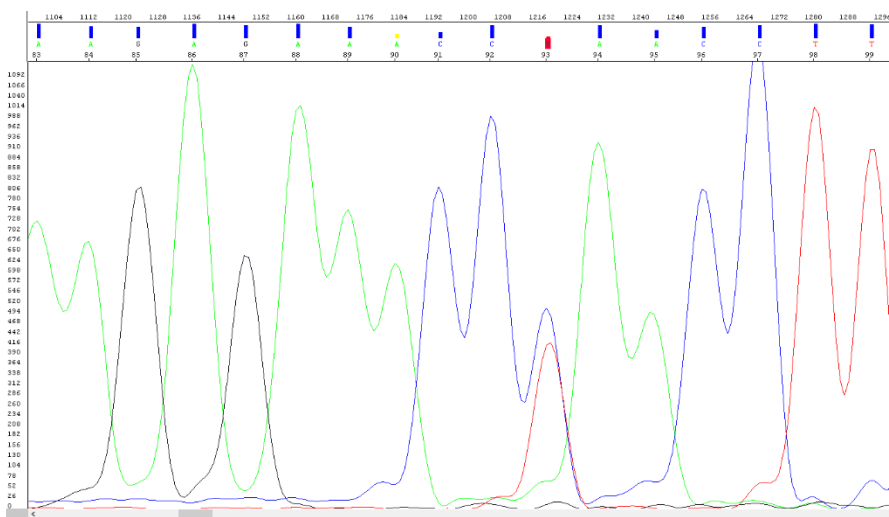
Principem metody sekvenování dle Sangera je využití asymetrické PCR k syntéze kopií DNA a následnou detekcí amplikonů pomocí fragmentační analýzy, která se provádí na genetickém analyzátoru pomocí kapilární elektroforézy. Při reakci se používá jeden primer, což vede k syntéze jednoho řetězce v jednom směru od 5'→3'. Pro sekvenaci je potřeba DNA primer, templátová DNA, DNA polymeráza, deoxynukleotidtrifosfáty (dNTP), které se do nového úseku člení podle komplementarity DNA bazí, v neposlední řadě jsou přidány modifikované dideoxynukleotidtrifosfáty (ddNTP). Dideoxynukleotidy (ddNTP) postrádají -

OH skupinu na 3 uhlíku a tím zastaví syntézu nového řetězce. Navázání dalšího nukleotidu totiž vede přes -OH skupinu pomocí fosfodiesterové vazby. DdNTP jsou fluorescenčně značeny a každý ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP je označen jinou barvivem (Bártová, 2011; Heather, 2016; Mendel, 2020; Sanger, 1977; Šedivcová, 2013).



Obrázek 16: Chemická struktura ddNTP a jeho princip při syntéze nového úseku DNA (Převzato z: Bártová, 2011, <https://labguide.cz/klasicke-metody-sekvenovani/>)

Pro stanovení sekvence DNA se používá genetický analyzátor (sekvenátor). První komerčně využívaný přístroj pro Sangerovo sekvenování byl od firmy Applied Biosystems. Detekce, jak už jsem zmínila, probíhá kapilární elektroforézou, která probíhá v tekuté či gelové matrici. Fluorescenčně značené produkty se rozdělí dle velikosti a rychlosti s jakou putují kapilárou. Na konci kapiláry je laserový detektor, který za sebou snímá emise fluorescenčního značení. Získané informace se zpracovávají softwarem, který výsledný záznam vyobrazí jako sekvenogram. Sekvenogram zobrazuje po sobě jdoucí barevné píky, které odpovídají sekvenci nukleotidů analyzované DNA. Barevné píky označují jednotlivé nukleotidy. Adenin se značí zeleně, cytosin modře, thymin červeně a guanin žlutě anebo černě (Bártová, 2011; Šedivcová, 2013).



Obrázek 17: Výsledný sekvenogram: ukázka výsledku analýzy pacienta s detekovanou missense variantou v BLM genu (BLM:c.1642C>T) (se svolením Laboratoře lékařské genetiky s.r.o., Pardubice)

4.3 Masivně paralelní sekvenování (Next generation sequencing, NGS)

Metoda masivně paralelního sekvenování se řadí do tzv. sekvenování nové generace (NGS), v ČR se užívá název Masivně paralelní sekvenování (z angl. *Massively Parallel Signature Sequencing = MPSS*) (Brenner, 2000). Na začátku 21. století upoutala NGS pozornost především díky své vysoké kapacitě, rychlému zpracování a citlivosti analýzy. Sekvenování první generace patřilo metodě Sangerovo sekvenování a Maxam-Gilbertově metodě (Maxam, Gilbert, 1977). Do druhé generace sekvenování patří NGS, proto můžeme předpokládat, že bude výkonnější. Zatímco Sangerovou metodou můžeme sekvenovat najednou desítky až stovky sekvencí o délce až 1000 bází s citlivostí okolo 15 %, tak pomocí nové technologie můžeme sekvenovat desítky milionů až miliardy sekvencí o délce 600 bází s citlivostí okolo 1 % (Šedivcová, 2013; Tom, 2018).

V průběhu několika let se vystřídaly různé NGS platformy, mezi které patří pyrosekvenování (Roche 454), sekvenování pomocí ligace – SOLiD (Life Technologies) a sekvenování založené na změnách elektrického potenciálu – Ion semiconductor sequencing (Life Technologies). Nejpoužívanější technologií je Illumina, která využívá sekvenování syntézou. Každá zmíněná metoda dominuje svou vlastností. Roche 454 poskytuje největší délku čtení, SOLiD je charakterizován nejvyšší přesností a Illumina zprostředkovává nejvíce dat za nízké náklady (Koubková, 2014; Tom, 2018).

4.3.1 Pyrosekvenování (Roche 454)

V roce 1985 bylo poprvé popsáno sekvenování podle syntézy a v roce 1987 P. Nyren popsal sledování DNA polymerázy pomocí bioluminiscence (Melamede, 1985; Nyren, 1987). První technologie NGS byla představena společností 454 Life Science (nyní Roche) v roce 2005. Tato technologie je založena na principu tzv. pyrosekvenování. Pyrosekvenování je řetěz enzymatických reakcí, při kterých dochází k navázání DNA bází do nově vznikajících vláken DNA a zároveň dochází k emisi viditelného světla (Dijk, 2014; Liu, 2012; Koubková, 2014).

Proces startuje vytvořením DNA knihovny, kdy se na DNA štěpí dvouvláknové fragmenty, na jejichž koncích se vážou krátké specifické adaptory A a B. Adaptor B má na svém 5' konci označený biotin. Na dvouvláknových fragmentech jsou magnetické kuličky, které jsou denaturovány. Fragment, na kterém je navázán adaptor A, to je ten, který není označen biotinem, je proto uvolněn z DNA knihovny. Takto vzniklá knihovna DNA se chystá k hybridizaci na speciálních DNA kuličkách, které slouží jako primer pro následnou amplifikaci. Amplifikace probíhá tzv. emulzní PCR (emPCR). Každá kulička je při amplifikaci v olejové emulzi s vodou a vyprodukuje přibližně 10^7 kopií templátu. Jakmile skončí emPCR, uvolní se jednotlivé kuličky z emulze a následuje promývací krok, kdy se dochovají pouze kuličky s amplifikovanou DNA. Kuličky s navázaným templátem jsou napipetovány do jamek tzv. pikotitrační destičky (PTP), do každé jamky se pipetuje jedna kulička. PTP se dělí do čtyř vrstev, do kterých se postupně dávkuje další důležité druhy kuliček potřebné pro správnou pyrosekvenační reakci. Mezi tyto komponenty patří kuličky s enzymy sulfurylázou, luciferázou, apyrázou a DNA polymerázou. Dále jsou nezbytné substráty adenosin 5'-fosfosulfát (APS) a luciferin. Na PTP proudí dílčí nukleotidy v přesně daném pořadí. Pro docílení komplementarity se včlenění DNA polymeráza do nově vznikajícího řetězce, což způsobí uvolnění pyrofosfátu. Pyrofosfát je pomocí enzymu ATP sulfurylázy přeměněn na ATP, jež dodává energii pro reakci luciferinu, který pomocí enzymu luciferázy je oxidován na oxyluciferin. Zároveň dochází k emisi viditelného světla, které se detekuje CCD čipem. Nespotřebovaná energie ve formě ATP a další nukleotidy jsou degradovány enzymem apyrázou. Následná sekvence je odečítána na tzv. pyrogramu. Pro analýzu dat se využívá sekvenační software (Froňková, 2013; Liu, 2012; Koubková, 2014).

Firma Roche na konci roku 2013 oznámila ukončení podpory platformy Roche 454, protože bylo nahrazeno novějšími a konkurenčně lepšími technologiemi od společností Illumina a Ion Torrent (Hollmer, 2013).

4.3.2 SOLiD

Technologie SOLiD (z angl. *Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*) byla představena v roce 2007 společností Applied Biosystems (dnes Life Technologies). Jak název napovídá, jedná se o sekvenování ligací pomocí DNA ligázy, nikoliv sekvenování syntézou. Nejprve se vytvoří DNA knihovna, která pracuje na obdobném principu, jako u již zmíněné techniky Roche 454. Amplifikace tedy opět probíhá na emulzní PCR a na DNA se štěpí krátké adaptory komplementární k adaptorům na magnetických kuličkách. Amplifikační produkty se přenesou na skleněný povrch a vloží se do kazety umožňující fluidní průtok. K sekvenování dochází pomocí zvláštních sond, které mají délku osm nukleotidů. Každá sonda má na sobě odlišnou fluorescenční barvu a obsahuje známou sekvenci prvních dvou bází. Celkem je možných 16 dinukleotidových sekvencí, které jsou značeny čtyřmi fluorescenčními barvami, což znamená, že každé barvivo značí 4 dinukleotidy. Platforma SOLiD umožní přečíst každou polohu nukleotidu celkem dvakrát a totožnost nukleotidu se určí pomocí analyzované barvy. V současné době se využívají sekvenátory SOLiD 5500 System a 5500xl System (Heather, 2016; Koubková, 2014; Morozova, 2008).

Technologie SOLiD má nejnižší chybovost z metod NGS. Její přesnost je 99,94 %, a to díky možnosti, že každá základna je čtena dvakrát. Nevýhodou SOLiD je nejkratší čtení a dlouhá doba celkové analýzy (Dijk, 2014).

4.3.3 Ion Torrent

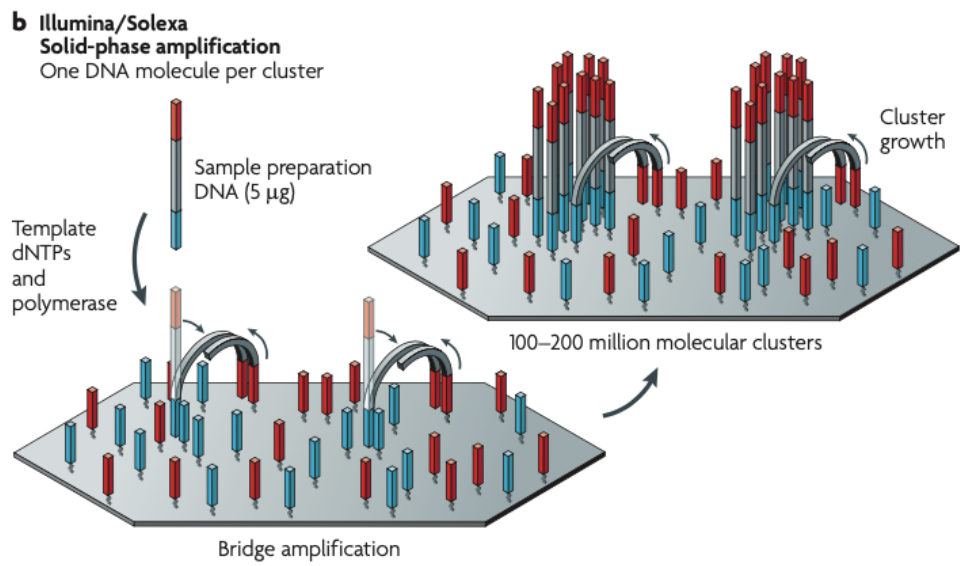
V roce 2010 představila společnost Ion Torrent (nyní Life Technologies) přístroj *Personal Genome Machine* (PGM). Tento program vyvinul Jonathan Rothberg, který je zakladatelem firmy 454 Life Science. Tato metoda sekvenování se podobá systému Roche 454, avšak hlavní rozdíl je v tom, že místo pyrofosfátu je při reakci uvolňován proton, který je detekován pomocí iontových senzorů. PGM využívá polovodičovou technologii, která je založena na schopnosti převádět chemický signál na digitální. Zároveň tento systém nevyžaduje optickou detekci fluorescenčně značených nukleotidů a kamerové sekvenování. DNA knihovna se připravuje obdobně jako u předešlých metod pomocí emPCR. Ion Torrent při reakci uvolňuje proton H^+ v průběhu syntézy nově vznikajícího řetězce, který je katalyzován DNA polymerázou. Při uvolnění H^+ dochází ke změně pH, která je zaznamenávána na polovodičovém čipu. PGM rozpozná, zda je nukleotid přidán či ne. Jestliže nukleotid není komplementární, tak čip nezachytí žádný signál. Pokud jsou naopak přidány dva komplementární nukleotidy, tak je detekován dvojnásobný signál (Dijk, 2014; Liu, 2012; Koubková, 2014).

Díky tomu, že platforma Ion Torrent nepoužívá žádné zobrazovací techniky, patří mezi nejrychlejší metodu s nízkými náklady (Liu, 2012). Mezi hlavní nevýhodu iontového sekvenování patří vyšší chybovost v detekci homopolymerních oblastí, jako byla u technologie Roche 454 (Khodakov, 2016).

4.3.4 Illumina (Solexa)

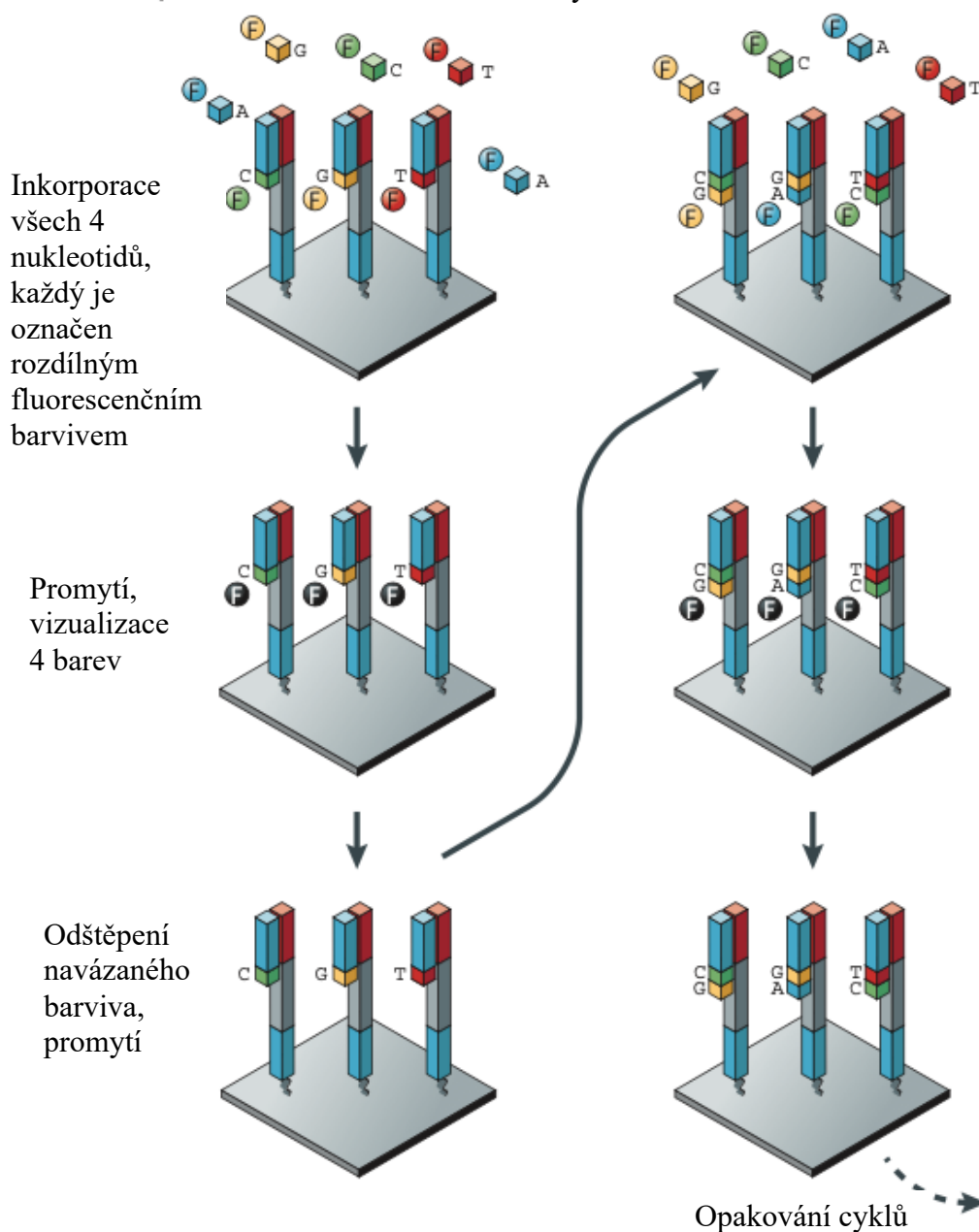
Na sekvenčním trhu se v roce 2006 objevila platforma Solexa, kterou převzala v roce 2007 společnost Illumina. Princip platformy je založen na sekvenování pomocí syntézy (SBS), kdy dochází k postupnému přidávání nukleotidových bází značených fluorescenčním barvivem (Ansorge, 2008; Khodakov, 2012).

U této technologie se knihovna připravuje štěpením DNA na fragmenty o velikosti maximálně 800 bází. Fragmenty DNA jsou na koncích zarovnány, fosforylovány a adenylovány na 3'-konci. Na konce fragmentů se váží adaptory. Díky adaptorům jsou fragmenty hybridizovány k reakční komůrce, která má funkci pevného nosiče a její povrch je pokryt doplňkovými adaptéry. Každý fragment hybridizuje a tvoří strukturu tzv. mostu (mezi odborníky používán i anglický termín *bridge*), kterou můžete vidět na Obrázku 18. Následně probíhá amplifikace a je přidána směs reagentů potřebná pro PCR. Adaptory, které jsou navázané na pevném povrchu, slouží jako primery pro syntézu DNA. V dalším cyklu PCR je adaptor opět prodloužen o reakční směs. Celý proces amplifikační PCR se cyklicky několikrát opakuje, až se na povrchu komůrky vytvoří klastry, které tvoří asi 1000 namnožených a identických kopií DNA. Klastry jsou připravené k vlastní sekvenaci, která je znázorněna na Obrázku 19. Pro sekvenování se používá reakční směs, která se nanáší na povrch pevného nosiče. Reakční směs obsahuje primery, čtyři reverzibilní terminátorové nukleotidy, z níž je každý nukleotid značený jinou fluorescenční barvou a DNA polymerázu. Jakmile dojde k začlenění nukleotidu do řetězce DNA je nukleotid detekován a identifikován pomocí fluorescenčního barviva CCD kamerou. Cyklus syntézy je opakován po odstranění terminační skupiny na 3'-konci nukleotidu a fluorescenčního barviva z báze (Ansorge, 2008; Koubková 2014).



Obrázek 18: Můstková amplifikace (Převzato z: Metzker, 2009, Dostupné z: 10.1038/nrg2626)

a Illumina/Solexa · Reverzibilní terminátory



Obrázek 19: Vlastní sekvenování (Upraveno od Metzker, 2009, 10.1038/nrg2626)

První používaný sekvenátor byl Illumina Genome Analyzer, jehož běh trval 2-3 dny a umožnil přečíst 35 bází o velikosti 1 Gb dat. V současnosti společnost Illumina nabízí tyto přístroje: iSeq, MiniSeq, MiSeq Series, MiSeqDx System, NextSeq 550 Instrument, NextSeq 550Dx Instrument, NextSeq 1000 & 2000 a NovaSeq 6000 (Illumina, 2021; Koubková, 2014).

Illumina je nejčastější používanou platformou z NGS. Většina protokolů pro přípravu DNA knihoven je kompatibilní se systémem Illumina. Illumina nabízí produkci více dat za

méně času i peněz v porovnání s ostatními platformami NGS i se Sangerovým sekvenováním. Mezi její nevýhodu patří technicky náročné vkládání vzorku. Její další nevýhodou je vyšší chybovost, která vzniká překrýváním jednotlivých klastrů (Dijk, 2014; Koubková, 2014).

5 CYTOGENETICKÁ DIAGNOSTIKA

5.1 Struktura karyotypu

Lidský karyotyp (karyogram) je složen z 23 párů chromozomů (celkem 46 chromozomů). Autozomy jsou nepohlavní chromozomy (somatické) a značí se arabskými číslicemi od 1 do 22. Člověk má 22 párů autozomů. Gonozomy jsou pohlavní chromozomy a u člověka se skládají z jednoho páru. Gonozomy se značí písmeny X a Y a jsou umístěny na konci karyogramu.

Lidské chromozomy se řadí do následujících skupin:

Skupina A – chromozomy 1, 2, 3 (velké metacentrické)

Skupina B – chromozomy 4, 5 (velké submetacentrické)

Skupina C – chromozomy 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, X (střední submetacentrické)

Skupina D – chromozomy 13, 14, 15 (střední akrocentrické)

Skupina E – chromozomy 16, 17, 18 (malé submetacentrické)

Skupina F – chromozomy 19, 20 (malé metacentrické)

Skupina G – chromozomy 21, 22 (akrocentrické), Y

Metacentrické chromozomy mají stejně dlouhá ramena. Submetacentrické chromozomy mají jedno rameno mírně kratší než druhé. Akrocentrické chromozomy mají jedno rameno radikálně kratší.

Chromozomy se nejlépe pozorují při buněčném dělení v procesu metafáze. Metafázické chromozomy mají vzhled dvou ramen, která jsou ve středu ztenčená a spojená. Oblast, která spojuje dvě ramena, se nazývá centromera. Pouze jedno rameno se nazývá chromatida. Koncová část ramen se nazývá telomera. Ramena většinou nejsou stejně dlouhá, a proto se rozlišují ramena na krátká (p rameno) a dlouhá (q rameno).

Součet všech chromozomů se pak nazývá karyotyp. Fyziologicky se mužský karyotyp značí 46,XY a ženský karyotyp se značí 46,XX (O'Connor, 2008; Šípek, 2010-2014).

5.2 Chromozomové aberace

Cytogenetičtí pracovníci mohou detekovat genetické změny (mutace), tedy různé chromozomové abnormality. Chromozomové aberace se označují také jako chromozomové

mutace. Mezi základní typy strukturálních aberací patří chromozomové delece, duplikace, inverze, inzerce a translokace.

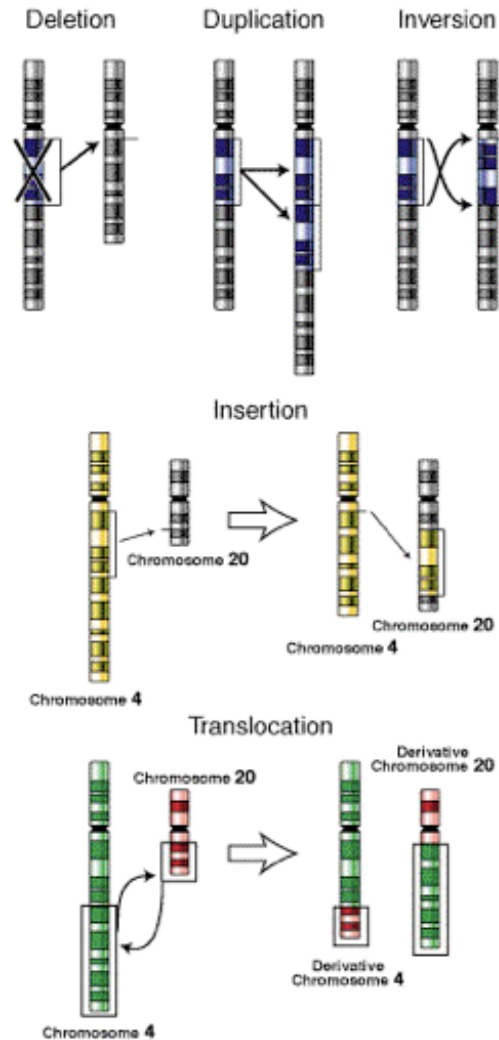
Delece je ztráta jednoho či více nukleotidů v DNA což v tomto případě znamená, že úsek chromozomu chybí. Delece se může projevit na konci z jednoho raménka (terminální delece) nebo ve střední části chromozomu (intersticiální delece).

Duplikace je zdvojení (znásobení) určité části chromozomu.

Inverze vzniká dvěma zlomy na jednom chromozomu, kde se uvolněný fragment chromozomu otočí o 180 stupňů a připojí se na stejný chromozom v otočené pozici.

Inzerce vzniká skokem minimálně 3 chromozomálních zlomů na jiný chromozom.

Translokace je výměna určité části chromozomu (nukleotidu) mezi dvěma chromozomy (Kočárek; O'Connor, 2008; Šípek, 2010-2014).



Obrázek 20: Chromozomové aberace (Převzato z: Šípek, 2010-2014, <http://genetikabiologie.cz/mutace>)

5.3 Vyšetření karyotypu (G-pruhování)

Vyšetření karyotypu se využívá v lékařské genetice při diagnostice vývojově vrozených vad (VVV), genetických poruch, ale i nádorových onemocnění (O'Connor, 2008).

Vyšetření chromozomů se provádí z plodové vody, fetální krve, choriových klků, z tkání potráceného plodu, periferní krve, nebo kostní dřeně. V současnosti se v laboratořích používá konvenční cytogenetická analýza (tzv. G-band, dle přípravy a použité barvicí techniky) nebo metoda FISH (Fluorescenční *in situ* hybridizace).

Postup při klasické konvenční cytogenetické analýze je následující:

- Odběr periferní krve
- Kultivace T lymfocytů 72 h ve sterilním prostředí při 37 ° C

- Hypotonie roztokem 0,075M KCl
- Fixace směsí methanolu a kyseliny octové v poměru 3:1, fixace probíhá 3- 5krát
- Příprava nativních preparátů
- Barvení technikou G pruhování
- Analýza karyotypu z 20 mitóz ve světelném mikroskopu

Při barvení se nanese na metafázické chromozomy enzym trypsin a poté se struktury barví Giemsovým barvivem. Po přidání barviva jsou na každém z chromozomů vidět světlé a tmavé pruhy, tzv. G-pruhy, které jsou na každém chromozomu přesně definované a z toho důvodu se dají jednotlivé chromozomy od sebe rozlišit a zcela určit (Kočárek, 2010; Makaturová, 2012; Zemanová, Centrum nádorové cytogenetiky; Zima, 2007).

G-pruhy se nejčastěji rozlišují při kondenzaci chromatinového vlákna. Tmavé G-pruhy zobrazují oblasti, které se tvoří později v buněčném cyklu a jsou poměrně více kondenzovány než světlé G-pruhy. Světlé G-pruhy se tedy reprezentují v rané oblasti buněčného cyklu, což znamená, že jsou více aktivní při transkripci. Na zbarvení pruhů mají také účinek báze v DNA. Ve tmavých pruzích převažují páry A-T a ve světlých dominují páry G-C (Kočárek, 2010).

G-pruhování (viz Obr. 19) se hodnotí podle pařížské nomenklatury. Na základě tohoto systému bylo ke každému z pruhů přiřčeno specifické číslo. Tato čísla mají využití pro popis strukturních aberací, anebo pro lokalizaci genů. Gen *BLM*, jehož kauzální mutace jsou asociovány s Bloomovým syndromem, je lokalizován na chromozomovém lokusu 15q26 a to znamená, že je gen lokalizován na pruhu 26 dlouhých ramen (q) chromozomu 15 (Kočárek, 2010; Wu, 2016).



Obrázek 21: Karyotyp chlapce (46,XY) s diagnostikovaným Bloomovým syndromem (Převzato se svolením Laboratoře lékařské genetiky s.r.o., Pardubice; Gančarčíková, 2020)

5.4 Vyšetření získaných chromozomových aberací (ZCA)

Díky vyšetření ZCA můžeme v buňkách maligních nádorů rozpoznat získané strukturní či početní změny (Zima, 2007).

Test ZCA se provádí odběrem periferní krve a následnou kultivací získaných lymfocytů, při kterém se hodnotí procento zastoupených buněk s chromozomální aberací. Postup přípravy nativního preparátu je podobný jako u klasické konvenční analýzy. Odběr je stejný jako u vyšetření karyotypu, kultivace je zkrácená na dva dny, protože se díky fytohemaglutininu získávají mitózy z prvního buněčného cyklu. K barvení se využívá Giemsovo barvivo, kde se hodnotí celé mitózy, anebo se používá metoda FISH (Fluorescenční *in situ* hybridizace), kde se pomocí sond obarví několik chromozomů a zjistí se jejich chromozomální zlomy a podle nich se vypočítá celkové zastoupení získaných chromozomálních aberací. Fyziologické hodnoty jsou do 3 % s nálezy aberantních buněk. Mezi hraniční hodnoty se řadí ty mezi 3 % až 5 % a patologické hodnoty jsou nad 5 %. Mezi chromozomové aberace patří duplikace, delece, inserce, inverze, translokace, které již byly zmíněny v kapitole 5.2 Chromozomové aberace.

Dalšími aberantními buňkami jsou izochromozom, ring chromozom, fragmentace, marker chromozom (Průša, 2012; Šípek, 2010-2014).

Vyšetření ZCA bylo provedeno u chlapce s BS z kazuistiky. ZCA byly nalezeny v 9,5 % z hodnocených mitóz. Pomocí vyšetření byla detekována přítomnost izochromatidových i chromatidových zlomů a s nimi vznikající acentrické fragmenty, pak ring chromozomy, chromozomové výměny a kvadriály, přičemž tyto nálezy jsou asociovány se syndromy chromozomových instabilit (Gančarčíková, 2020).



Obrázek 22: Vyšetření ZCA chlapce s BS (Převzato se svolením od Laboratoře lékařské genetiky s.r.o., Pardubice)

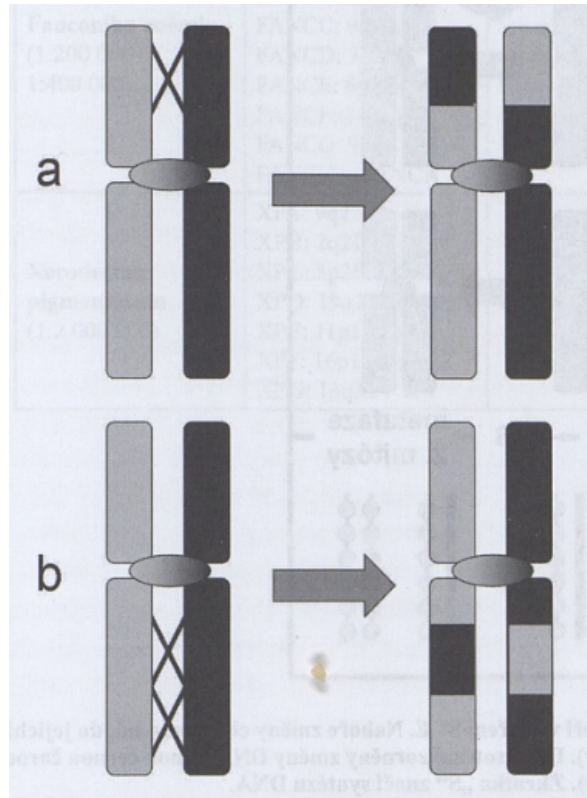
5.5 Vyšetření SCE

SCE neboli výměny sesterských chromatid („Sister Chromatide Exchanges“) patří mezi vnitřní chromozomové přestavby, při kterých vznikají vzájemné výměny chromozomových úseků mezi dvěma chromatidami totožného chromozomu.

Samotné SCE nejsou pro pacienta nijak vážné, ale jejich zvýšená frekvence ano, protože způsobuje poškození replikačních procesů. Zvýšené riziko SCE se uvádí také u pacientů, kteří

jsou vystaveni látkám s mutagenními účinky. Počet u zdravého jedince je fyziologicky 5-10 SCE na buňku.

Na Obrázku 23 můžete vidět možné výměny sesterských chromatid. Vlevo je chromozom před výměnou a vpravo již po výměně. Na Obrázku 23 a) se jedná o jednoduchou SCE a Obrázek 23 b) poukazuje na složitější SCE, tedy dvojitou výměnu sesterských chromatid.

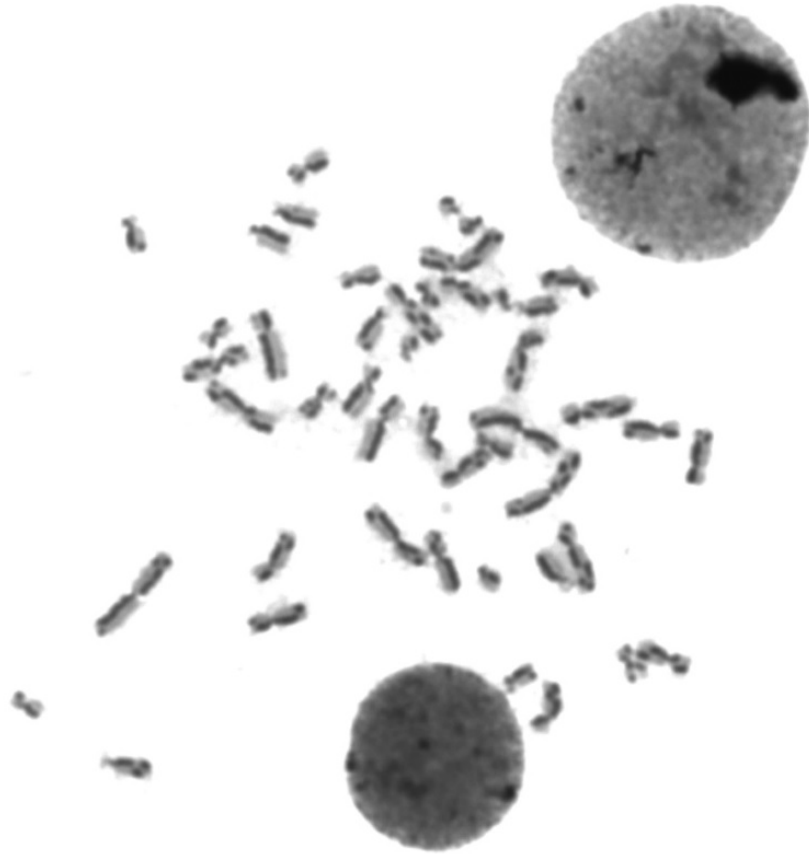


Obrázek 23: Ukázky výměn sesterských chromatid (Převzato z: Kočárek, 2010)

Detekce sesterských chromatidových výměn se provádí tzv. „harlekýnskou technikou“ zvanou FPG (Fluorescence Plus Giemsa). Tato technika používá Hoechst 33258 v kombinaci s barvením Giemsa, aby se získaly cytologické preparáty zbarvené Giemsou odlišně značených chromatidů (Perry, 1974). Jako první jsou lidské lymfocyty ošetřeny kultivační metodou, která využívá bromdeoxyuridin (BrdU). BrdU se při syntéze DNA včlení do polynukleotidového řetězce místo thymidinu a tím mění chromatinovou strukturu i barvitelnost chromatid. Přítomnost BrdU musí být v buňkách alespoň po dobu dvou replikačních cyklů. Další fází je barvení, které se realizuje pomocí fluorescenčního barviva Hoechst 33258 (dibenzil-midazol). Preparáty se posléze fluoreskují a obarví se Giemsovým roztokem. Sesterské chromatidy jsou odlišně barvitelné, a proto se mohou pozorovat jejich vzájemné výměny ve světelném mikroskopu (Kučerová, 1988; Kočárek, 2010).

Laboratoř LLG s.r.o. provedla u chlapce s BS detekci sesterských chromatidových výměn (SCE) periferních lymfocytů pomocí techniky FPG.

Analýzou se zjistilo velmi zvýšené množství výměn sesterských chromatid v průměru 63 SCE / 1 buňku (rozsah 51-76) ve srovnání s interní kontrolou 6,5 SCE / 1 buňku (Gančarčíková, 2020).



Obrázek 24: SCE u chlapce s Bloomovým syndromem (Převzato se svolením od Laboratoře lékařské genetiky s.r.o., Pardubice)

6 LÉČBA

Syndromy chromozomální instability nelze vyléčit a případná léčba se zaměřuje na zmírnění symptomů onemocnění. Syndromy chromozomální instability mají vysoké riziko ke vzniku nádorových onemocnění, které komplikují terapii. Malignita se může projevit i před stanovením diagnózy, proto je důležité přesné určení diagnózy před samotným zahájením léčby. Prenatální diagnostika těchto závažných syndromů je možná v případě detekované familiární varianty, která bývá pro danou rodinu typická. Po cytogenetické a molekulární diagnostice je doporučeno sledovat preventivně stav pacienta. Pravidelné klinické vyšetření pacienti podstupují čtyřikrát ročně. Kontroly se kvůli velkému riziku zaměřují na screening solidních nádorů a hematologických chorob. Dále se sledují hodnoty krevního obrazu, kostní dřeně, glykemie, hormonů, lipidů a hladiny protilátek. Každého půl roku se doporučuje také gynekologické a mamografické vyšetření. Pacienti podstupují gastroscopické vyšetření v případě gastrointestinálních obtíží (Krutílková, 2009; Seemanová, 2006; Štefánek, 2011).

Včasná diagnostika je důležitá pro preventivní opatření. Nález nádorového onemocnění v počátečních stádiích je klíčové a preventivní opatření může být vysoce účinné pro odhalení nádorového onemocnění v iniciální fázi. Pacienti se zvýšenou citlivostí na ionizační záření mají doporučené dermatologické vyšetření jednou ročně. Důležitá je ochrana proti UV záření, jejíž prevencí je: oděv, krémy s vysokým faktorem, brýle s UV filtrem a minimalizace pobytu venku. Kauzální léčba syndromů není v současnosti možná. Jedinou terapií je snaha zmírnit symptomy nemoci s cílem zkvalitnit život pacienta. Intenzita terapie je obvykle přizpůsobena jednotlivci, ale je oproti obecným léčebným protokolům maligních onemocnění minimalizována tak, aby léčba nezhoršila dosavadní stav nemocného. Při léčbě malignit se musí vyloučit radioterapie, radiomimetické preparáty, alkylační látky a léčba cytostatiky smí být maximálně třetinová oproti obvykle užívané. Léčba u dětí je omezena pouze na chemoterapii. U některých pacientů je doporučována transplantace hematopoetických progenitorových buněk (Chrzanowska, 2012; Krutílková, 2009; Seemanová, 2006; Štefánek, 2011).

7 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se věnuje vzácné hereditární skupině syndromů chromozomální instability a jejich laboratorní diagnostice. Jak už název této skupiny odpovídá, tak se jedná o skupinu chorob s vysokým počtem chromozomálních a chromatidových zlomů. Mezi tyto syndromy patří Loius-Barové syndrom ataxie teleangiektazie, Nijmegen breakage syndrom, syndrom ligázy IV, Bloomův syndrom, Fanconiho anémie, Wernerův syndrom a Xeroderma pigmentosum. Prevalence v celosvětové populaci činí 1:30 000 až 1:3 000 000.

V práci jsou popsány podrobně jednotlivé syndromy, jejich etiopatogeneze a fenotypické projevy. Společným jmenovatelem syndromů chromozomálních instabilit je kauzální mutace v homozygotním nebo ve složeném heterozygotním stavu v genech zajišťující reparaci DNA při replikaci. Důsledkem poruchy těchto reparačních procesů je DNA v našich buňkách neustále poškozována kontaktem s nejrůznějšími fyzikálními a chemickými vlivy vnějšího prostředí, což zvyšuje pravděpodobnost somatických mutací. Pacienti mají vysoké riziko rozvoje různých maligních onemocnění. Velmi časté jsou výskyty nádorů především pak v dětském věku.

Klíčová je včasná a správná diagnostika syndromů chromozomálních instabilit. Při podezření na vzácné onemocnění SCI klinickým genetikem je indikováno genetické vyšetření. Laboratorní diagnostika poskytuje různé spektrum metod od zobrazovacích technik klasické cytogenetické analýzy s jejich modifikací, např. indukovanými spontánními aberacemi pomocí mitomicínu C či diepoxybutanu, tak metod molekulárně genetických. U molekulárně genetických metod se využívá kombinace jednotlivých technik, a to kvůli limitacím, které metody mají. Jako metodou volby se používá masivně paralelní sekvenování zaměřené na klíčové geny predisponující k syndromům chromozomální instability, jedná se o vyšetření několika genů v rámci jedné analýzy. Vzhledem k tomu, že sekvenace probíhá v krátkých úsecích čtení, mohly by analýze uniknout rozsáhlejší delece či duplikace těchto klíčových genů, a proto je v laboratorní diagnostice používaná technika MLPA, která tyto aberace odhalí.

Poslední část se věnuje prevenci a případné strategii léčby onemocnění. V současnosti nelze SCI vyléčit, a tak je terapie zaměřena především na zmírnění symptomů daného onemocnění s cílem zkvalitnit, usnadnit a prodloužit život pacienta. U syndromů chromozomální instability je narušen mechanismus reparace DNA, a tak pro jedince s nádorovým onemocněním musí být při terapii nádoru upraven léčebný protokol. Z léčby musí být vyloučena radioterapie, dále se podávají snížené dávky cytostatik a chemoterapie je

minimalizována. Je tedy nesmírně důležité včas rozpoznat tato závažná hereditární onemocnění, neboť nediagnostikovaného pacienta je možné nevhodnou léčbou poškodit.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ALTMANN T., GENNERY A. *DNA ligase IV syndrome. Orphanet Journal of Rare Diseases. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine: BioMed Central, 2016. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5055698/>*
- [2] AUERBACH AD. *Fanconi Anemia and its Diagnosis. Author Manuscript. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, USA: J. Med. Genet., 2009, 668((1-2), 4-10. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2742943/>*
- [3] BÁRTOVÁ E., LITERÁK I. *Sekvenování DNA. Molekulární biologie*[online]. 1.VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie; 2. Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, 2011 [cit. 2020-11-22]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-sekvenovani&lang=cz
- [4] REKAYA BM., MESSAOUD O., TALMOUDI F., NOUIRA S., OURAGINI H., AMOURI A., BOUSSEN H., BOUBAKER S., MOKNI M., MOKTHAR I., ABDELHAK S., ZGHAL M. *High frequency of the V548A fs X572 XPC mutation in Tunisia: implication for molecular diagnosis. J Hum Genet. 2009;54:426–9.*
- [5] BLACK JO. *Xeroderma Pigmentosum. Head Neck Pathol. 2016 Jun;10(2):139-44.*
- [6] BLM Gene (Protein Coding) *BLM RecQ Like Helicase. Gene Cards - The human gene database. Weizmann Institute of Science, 2020. Dostupné. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BLM&keywords=bloom,syndrome#summaries>*
- [7] BLOOM D. *Congenital telangiectatic erythema resembling lupus erythematosus in dwarfs. AMA Am J Dis Child 88:754-758 (1954).*
- [8] BOUCHALOVÁ K., HAJDÚCH M. *Prediktivní a prognostická onkologie. Univerzita Palackého v Olomouci, 2017. ISBN 9788024451510*
- [9] BRADFORD PT., GOLDSTEIN AM., TAMURA D., KHAN SG., UEDA T., BOYLE J., OH KS., IMOTO K., INUI H., MORIWAKI S., EMMERT S., PIKE KM., RAZIUDDIN A., PLONA TM., DIGIOVANNA JJ., TUCKER MA., KRAEMER KH. *Cancer and neurologic degeneration in xeroderma pigmentosum: long term follow-up characterises the role of DNA repair. J Med Genet. 2011;48:168–76.*
- [10] BRENNER S., JOHNSON M., BRIDGHAM J., GOLDA G., LLOYD D. H., JOHNSON D., CORCORAN K. (2000). *Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. Nature Biotechnology, 18(6), 630–634.*

- [11] BROOKS BP., THOMPSON AH., BISHOP RJ., CLAYTON JA., CHAN CC., TSILOU ET., ZEIN WM., TAMURA D., KHAN SG., UEDA T., BOYLE J., OH KS., IMOTO K., INUI H., MORIWAKI S., EMMERT S., ILIFF NT., BRADFORD P., DIGIOVANNA JJ., KRAEMER KH. *Ocular manifestations of xeroderma pigmentosum: long-term follow-up highlights the role of DNA repair in protection from sun damage*. *Ophthalmology*. 2013;120:1324–36
- [12] BUTT FM., MOSHI JR., OWIBINGIRE S., CHINDIA ML. *Xeroderma pigmentosum: a review and case series*. *J Craniomaxillofac Surg*. 2010;38:534–7
- [13] CABANA MD., CRAWFORD TO., WINKELSTEIN JA., CHRISTENSEN JR., LEDERMAN HM. *Consequences of the delayed diagnosis of ataxia-teleangiectasia*. *Pediatrics*. 1998; 102: 98-100
- [14] CLEAVER JE. *Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum*. *Nature*. 1968 May 18;218(5142):652-6
- [15] ČMIELOVÁ J., MUTHNÁ D. a J. VÁVROVÁ. *Genotoxický stres a poškození DNA u kmenových buněk*. *Zdravotnictví a medicína*. 1. Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta Hradec Králové, Ústav lékařské biochemie, 2. Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Katedra radiobiologie, 2010. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/a-poskozeni-dna-stres-u-kmenovych-bunek-448916>
- [16] CUNNIF C., BASSETTI JA. a ELLIS NA. *Bloom's Syndrome: Clinical Spectrum, Molecular Pathogenesis, and Cancer Predisposition*. *Molecular Syndromology*. Division of Medical Genetics, Department of Pediatrics, Weill Cornell Medical College, New York, N.Y., and b. Department of Cellular and Molecular Medicine, University of Arizona Cancer Center, Tucson, Ariz., USA: © 2016 S. Karger AG, Basel, 2016.
- [17] ČEPOVÁ I., ŠANTAVÁ A. *Syndromy chromozomální instability*. Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny FN a LF UP Olomouc, [online]. 2004, [cit. 2020-03-03]. Dostupné z: <http://ulgrs.upol.cz/portal/wp-content/uploads/2010/11/ulg00019.pdf>
- [18] D'ARGENIO V., MV. ESPOSITO, A. TELESE. *The molecular analysis of BRCA1 and BRCA2: Next-generation sequencing supersedes conventional approaches*. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2015, 446, 221-225. ISSN 00098981. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898115001989>
- [19] DIGIOVANNA JJ., KRAEMER KH. *Shining a light on xeroderma pigmentosum*. *J. Invest. Dermatol*. 2012 Mar;132(3 Pt 2):785-96.

- [20] DIJK EL., AUGER H., JASZCZYSZYN Y. a THERMES C. *Ten years of next-generation sequencing technology*. Elsevier. Trends in Genetics, 2014, 30(9), 418-426.
- [21] DOLLFUS H., PORTO F., CAUSSADE P., SPEEG-SCHATZ C., SAHEL J., GROSSHANS E., FLAMENT J., SARASIN A. *Ocular manifestations in the inherited DNA repair disorders*. Surv Ophthalmol. 2003;48:107–22.
- [22] DUROCHER D. a JACKSON SP. The FHA domain. Science direct – Elsevier. Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. 2002. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001457930103294X#FIG1>
- [23] *Fanconi anemia: Genetics Home Reference*. U.S. National Library of Medicine - USA.gov, [online]. 2020 [cit. 2020-04-14]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/fanconi-anemia>
- [24] FANCONI G. *Familiäre, infantile, perniziösartige Anämie* (perniziöses Blutbild and Konstitution). Jahrb Kinderheilk 1927; **117**(2): 257-280.
- [25] FASSIHI H., SETHI M., FAWCETT H., WING J., CHANDLER N., MOHAMMED S., CRAYTHORNE E., MORLEY AM., LIM R., TURNER S., HENSHAW T., GARROOD I., GIUNTI P., HEDDERLY T., ABIONA A., NAIK H., HARROP G., MCGIBBON D., JASPERS NG., BOTTA E., NARDO T., STEFANINI M., YOUNG AR., SARKANY RP., LEHMANN AR. *Deep phenotyping of 89 xeroderma pigmentosum patients reveals unexpected heterogeneity dependent on the precise molecular defect*. Proc Natl Acad Sci USA. 2016; 113: 236–45
- [26] FLANAGAN M. a CUNNIFF CM. Bloom Syndrome. GeneReviews®. University of Washington, Seattle: *J. Med. Genet.*, 2019. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1398/#bloom.Summary>
- [27] FROŇKOVÁ, E. *Sekvenování nové generace. Česko-slovenská patologie*. Laborař molekulární genetiky CLIP, Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha, 2013, **49**(3), 129-132.
- [28] GANČARČÍKOVÁ M., ŠTULLER V., I. SVĚTLÍKOVÁ , P. TOMČOVÁ, M. ŠENKEŘÍKOVÁ, A. ŠŤÁVOVÁ, D. PANCHÁRTEK, P. PRUSÁKOVÁ, V. KRULIŠOVÁ, R. MICHALOVSKÁ a Z. VLČKOVÁ. Laboraře lékařské genetiky s.r.o., GHC Genetics, s.r.o., 2020. *Vzácná vrozená onemocnění v komplexní cytogenetické a molekulárně genetické analýze* [poster]. In: 16. ročník konference RANK 2020 se uskutečnil 5. a 6. února 2020, Pardubice

- [29] GATTI R. a S. PERLMAN. *Homo sapiens ATM serine/threonine kinase (ATM)*, RefSeqGene (LRG_135) on chromosome 11. In: Reference Sequence Gene [online]. NCBI. GenBank, 1993 [cit. 2020-05-05]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_009830.1?&feature=any&fbclid=IwAR04gIL4r30KJC0d-ZHIVQdEax4KBye8P199T7dvMUSOhTYSzny9GXsWmq4
- [30] GEBHART E, BAUER R a RAUB U. *Spontaneous and induced chromosomal instability in Werner syndrome*. Human Genetics. 1) Institut für Humangenetik der Universität, Schwabachanlage 10, D-8520 Erlangen, Federal Republic of Germany; 2) Augenklinik mit Poliklinik der Universität, Schwabachanlage 6, D-8520 Erlangen, Federal Republic of Germany: © Springer-Verlag, 1988, 80, 135-139.
- [31] GENNERY, Andrew. *LIG4 syndrome*. Orphanet. © Orphanet version 5.35.0, 2012. Dostupné z: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=en&Expert=99812
- [32] GERSTEN T. Fanconi anemia. Medline Plus. U.S. National Library of Medicine: J Med Genet, 2016. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/ency/article/000334.htm>
- [33] GREGOR V., HORÁČEK J., ŠÍPEK A. *Vrozené vývojové vady* [online]. MUDr. Antonín Šípek, CSc. et al. ©, 2019 [cit. 2020-03-03]. Dostupné z: <http://www.vrozene-vady.cz/genetika/index.php?co=dedicnost>
- [34] GRUHN B., SEIDEL J., ZINTL F., VARON R. *Successful bone marrow transplantation in a patient with DNA ligase IV deficiency and bone marrow failure*. Orphanet J Rare Dis. 2, 5. 2007. PMID 17224058.
- [35] HEATHER JM., CHAIN B. *The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA*. Genomics [online]. 2016, 107(1), 1-8 DOI: 10.1016/j.ygeno.2015.11.003. ISSN 08887543. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0888754315300410>
- [36] HEBRA F., KAPOSÍ M. *On diseases of the skin including exanthemata*. Volume III. *N Sydenham Soc.* (1874) 61:252–8.
- [37] HIRAI Y., KODAMA Y., MORIWAKI S., NODA A., CULLINGS HM., MACPHEE DG., KODAMA K., MABUCHI K., KRAEMER KH., LAND CE., NAKAMURA N. *Heterozygous individuals bearing a founder mutation in the XPA DNA repair gene comprise nearly 1% of the Japanese population*. Mutat Res. 2006;601:171–8.
- [38] HISAMA MF., BOHR AV., OSHIMA J. *WRN's Tenth Anniversary*. PERSPECTIVES. Sci. Aging Knowl. Environ., 28 June 2006 Vol. 2006, Issue 10, p. pe18

- [39] HOLLMER M. *Roche to close 454 Life Sciences as it reduces gene sequencing focus*, Fierce Biotech, Oct 17, 2013. <https://www.fiercebiotech.com/medical-devices/roche-to-close-454-life-sciences-as-it-reduces-gene-sequencing-focus>
- [40] HÖMING-HÖLZEL C., SAVOLA S. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) in tumor diagnostics and prognostics*. *Diagnostic Molecular Pathology*. 2012, 21(4), 189-206.
- [41] CHEOK CF., WU L., GARCIA P., P. JANSČAK a I. HICKSON. *The Bloom's syndrome helicase promotes the annealing of complementary single-stranded DNA*. *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 2005. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article/33/12/3932/2400990>
- [42] CHRISTEN-ZAECH S., IMOTO K., KHAN SG., OH KS., TAMURA D., DIGIOVANNA JJ., BOYLE J., PATRONAS NJ., SCHIFFMANN R., KRAEMER KH., PALLER AS. *Unexpected occurrence of xerodermapigmentosum in an uncle and nephew*. *Arch Dermatol*. 2009;145:1285–91
- [43] CHRZANOWSKA K., GREGOREK H., BDEMBOWSKA-BAGINSKA B., KALINA M., DIGWEED M. *Nijmegen Breakage Syndrome (NBS)*. Orphanet Journal of Rare Diseases. Published online: National Center for Biotechnology Information, 2012. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3314554/>
- [44] CHRZANOWSKA KH., KLEIJER WJ., KRAJEWSKA-WALASEK M., BIAŁECKA M., GUTKOWSKA A., GORYLUK-KOZAKIEWICZ B., MICHAŁKIEWICZ J., STACHOWSKI J., GREGOREK H., ŁYSONŃ-WOJCIECHOWSKA G., JANOWICZ W., JÓŹWIAK S.: *Eleven Polish patients with microcephaly, immunodeficiency, and chromosomal instability: the Nijmegen breakage syndrome*. *Am J Med Genet* 1995, 57:462-471.
- [45] *Illumina sequencing platforms* [online]. 2021 [cit. 2021-03-23]. Dostupné z: <https://emea.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html>
- [46] KAFKOVÁ E., SEEMAN P., MARTINČEKOVÁ A, KŘENOVÁ Z., SEEMANOVÁ E., ŠTĚRBA J., LITZMAN J. *Nijmegen breakage syndromes - opomíjená primární imunodeficiencie. Kazuistiky*. Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně. Klinika dětské neurologie, DNA laboratoř UK LF a FN Motol. Klinika dětské onkologie LF MU a FN Brno. Ústav biologie a lékařské genetiky UK LF a FN Motol: DNA laboratoř, 2012, 66-70. Dostupné z:

- http://www.dnalab.cz/publikace/NBS/NBS%20imunodeficiencie%20Kafková_Litzman%20Alergie%204-2012.pdf
- [47] HUSTINX TW., SCHERES JM., WEEMAES CM., HAAR BG., JANSSEN AH. *Karyotype instability with multiple 7/14 and 7/7 rearrangements*. Hum Genet. 1979 Jun 19, 49(2):199-208
- [48] KHODAKOV D., WANG C., ZHANG DY. *Diagnostics based on nucleic acid sequence variant profiling: PCR, hybridization, and NGS approaches*. Advanced Drug Delivery Reviews. 2016, 105, 3-19. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2016.04.005
- [49] KLEIJER WJ., LAUGEL V., BERNEBURG M., Nardo T., FAWCETT H., GRATCHEV A., JASPERS NG., SARASIN A., STEFANINI M., LEHMANN AR. *Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy*. DNA Repair (Amst). 2008;7:744–50
- [50] KNIFFIN C. *LIG4 SYNDROME*. OMIM. Johns Hopkins University: OMIM® and Online Mendelian Inheritance in Man®, 2012. Dostupné z: <https://omim.org/entry/606593>
- [51] KNIFFIN C. *NIJMEGEN BREAKAGE SYNDROME; NBS*. OMIM. Johns Hopkins University: OMIM® and Online Mendelian Inheritance in Man®, 2009. Dostupné z: <https://www.omim.org/entry/251260>
- [52] KOČÁREK E., PÁNEK M., NOVOTNÁ D. *Klinická cytogenetika I úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1880-7.
- [53] KOČÁREK E. *Vybrané aspekty lékařské genetiky*. Ústav biologické lékařské genetiky FN Motol a LF UK Praha: Ústav dědičných metabolických poruch Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, 2008. ISSN http://www.fnmotol.cz/_sys_/FileStorage/download/2/1318/vybrane_aspekty_lekarske_genetiky.pdf
- [54] KOMROKJI RS., PADRON E., LIST AF., DEVITA VT., LAWRENCE TS., ROSENBERG SA. Chapter 111: *Myelodysplastic syndromes*. Principles and Practice of Oncology. 10th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 2015.
- [55] KONDRATENKO I., PASCHENKO O., PLYAKOV A., BOLOGOV A: *Nijmegen breakage syndrome*. Adv Exp Med Biol 2007, 601:61-67
- [56] KOSTYUCHENKO L., MAKUCH H., KITSERA N., POLISHCHUK R., MAKAREVYCH N., AKOPIAN H., *Nijmegen breakage syndrome in Ukraine: diagnostics and follow-up*. Centr Eur J Immunol 2009, 43:46-52

- [57] KOUBKOVÁ L., VOJTĚŠEK B., VYZULA R. *Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi: Next Generation Sequencing – Application in Clinical Practice*. Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno; Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno: Klin Onkol, 2014, (27), S61-68.
- [58] KRAEMER KH., DIGIOVANNA JJ. *Xeroderma Pigmentosum*. 2003 Jun 20 [Updated 2016 Sep 29]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1397/>
- [59] KRAEMER KH., LEE MM., ANDREWS AD., LAMBERT WC. *The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm*. Arch Dermatol. 1994;130:1018–21
- [60] KRAEMER KH., LEE MM., SCOTTO J. *Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases*. Arch Dermatol. 1987;123:241–50
- [61] KRAEMER KH., SLOR H. *Xeroderma pigmentosum*. Clin Dermatol. 1985;3:33–69.
- [62] KRUTÍLKOVÁ V., ECKSCHLAGER T. *Přehled syndromů spojených s rizikem nádorů dětského věku*. Klin Onkol, 2009, 45-49.
- [63] KUČEROVÁ M. *Vrozené a získané poruchy lidských chromozomů*: 177 stran. Praha: Avicenum, 1988.
- [64] LAI JP., LIU YC., ALIMCHANDANI M., LIU Q., AUNG PP., MATSUDA K., LEE CC., TSOKOS M., HEWITT S., RUSHING EJ., TAMURA D., LEVENS DL., DIGIOVANNA JJ., FINE HA., PATRONAS N., KHAN SG., KLEINER DE., OBERHOLTZER JC., QUEZADO MM., KRAEMER KH. *The influence of DNA repair on neurologic degeneration, cachexia, skin cancer and internal neoplasms: autopsy report of four xeroderma pigmentosum patients (XP-A, XP-C and XP-D)*. Acta Neuropathol Commun. 2013;1:4.
- [65] LAVIN, MF. *Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol., 2008, 9(10), 759-69. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18813293>
- [66] LEBEL M., MONNAT RJJ.. *Werner syndrome (WRN) gene variants and their association with altered function and age-associated diseases*. J Med Genet, 2017, 41, 82-97. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29146545>

- [67] LEHMANN AR., MCGIBBON D., STEFANINI M. *Xeroderma pigmentosum*. Orphanet J Rare Dis. 2011 Nov 01;6:70.
- [68] LIPTON, Jeffrey M. a Blanche P. ALTER. *Fanconi Anemia*. Medscape. WebMD, 2018. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/960401-overview>
- [69] LIU L., LI Y., LI S., HU N., HE Y., PONG R., LIN D., LU L., LAW M. *Comparison of next-generation sequencing systems*. J Biomed Biotechnol. 2012;2012:251364. Epub 2012 Jul 5.
- [70] MAIERHOFER A., FLUNKERT J. *Accelerated epigenetic aging in Werner syndrome*. *Aging (Albany NY)*: J Med Genet, 2017, 9(4), 1143-1152. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5425119/>
- [71] MAKATUROVÁ E., NASTOUPILOVÁ L., KŘIŽANOVÁ J., HANÁKOVÁ M., KALINA Z., WINKLER J. *Karyotyp člověka*. Masarykova univerzita Lékařská fakulta. 2012 Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js12/genetika/web/pdf/karyotyp_cloveka.pdf
- [72] MATHERS CD., LONCAR D. *Chronic obstructive pulmonary disease (COPD)*. World Health Organization. PLoS Medicine, 2006, 209-224. Dostupné z: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd))
- [73] MAXAM AM., GILBERT W., *A new method for sequencing DNA*. PNAS February 1, 1977 74 (2) 560-564; <https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.560>
- [74] MEHTA PA., TOLAR J. *Fanconi Anemia Synonym: Fanconi Pancytopenia*. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine: J Med. Genet., 2018. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1401/#fa.Summary>
- [75] MELAMEDE RJ., U.S. Patent 4863849. 1985
- [76] MENDEL Y., KAISERMANN J., PAWLOWSKI M. *Techniky molekulární biologie II*. Cambridge Stanford books. 514 stran, 2020.
- [77] MLPA [online]. © MRC Holland, 2021 [cit. 2021-03-30]. Dostupné z: <https://www.mrcholland.com>
- [78] MLPA® General Protocol: MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) *General Protocol for the detection and quantification of DNA sequences*. www.mrcholland.com, www.mlpa.com: MRC Holland B.V. Willem Schoutenstraat 1, 1057 DL Amsterdam, The Netherlands, 2019.

- [79]MOROZOVA O., MARRA MA. *Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics*. GENOMICS. BC Cancer Agency Genome Sciences Centre, Suite 100, 570 West 7th Avenue, Vancouver, BC V5Z 4S6, Canada, 2008, 92(5), 255-264. ISSN 08887543. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754308001651?via%3Dihub>
- [80]NYREN P., *Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity*. Anal Biochem 1987;167:235-8
- [81]O'CONNOR, C. (2008) *Karyotyping for chromosomal abnormalities*. Nature Education 1(1):27
- [82]OSHIMA J., MARTIN GM., HISAMA FM. *Werner Syndrome*. Gene Reviews. University of Washington, Seattle: GeneReviews® [Internet]., 2016a. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1514/>
- [83]OSHIMA J., SIDOROVA JM., MONNAT RJJ. *Werner Syndrome: Clinical Features, Pathogenesis and Potential Therapeutic Interventions*. Ageing Res. Rev. (2016b), 33, 105-114. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5025328/#R122>
- [84]PERRY P., WOLFF S. (1974). *New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids*. Nature, 251(5471), 156-158. doi:10.1038/251156a0
- [85]PRŮŠA R. *Průvodce laboratorními nálezy*. Praha: Raabe, c2012. ISBN 978-80-87553-68-8
- [86]PUCHMAJEROVÁ A., ŠVOJR K., NOVOTNÁ D., MACHÁČKOVÁ E., SUMERAUER D., SMÍŠEK P., KODET R., KYNČL M., KŘEPELOVÁ A., FORETOVÁ L. *Fanconiho anémie, komplementační skupina D1 v důsledku bíalelické mutace genu BRCA2 – kazuistika*. Linkos. Klin Onkol, 2016, 29(Suppl 1), S89-S92. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/200/4889.pdf>
- [87]RAPIN I., LINDENBAUM Y., DICKSON DW., KRAEMER KH., ROBBINS JH. *Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum*. Neurology. 2000;55:1442-9.
- [88]REED WB., LANDING B., SUGARMAN G., CLEAVER JE., MELNYK J. *Xeroderma pigmentosum. Clinical and laboratory investigation of its basic defect*. JAMA. 1969 Mar 17;207(11):2073-9.
- [89]RIBOLDI GM., SAMANTA D. a FRUCHT S. *Ataxia Telangiectasia (Louis-Bar Syndrome)*. Am J Med Genet. Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC., 2020. ISSN <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30137827>.

- [90] SANDOVAL H., DARDÓN P. *Werner's syndrome: incidental finding during pregnancy. BMJ Case Reports*. Published online: US National Library of Medicine National Institutes of Health, 2013. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3863017/>
- [91] SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, AR. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463
- [92] SEEMANOVA E., PASSARGE E., BENESKOVA D., HOUSTEK J., KASAL P., SEVCIKOVA M.: *Familial microcephaly with normal intelligence, immunodeficiency, and risk for lymphoreticular malignancies: a new autosomal recessive disorder*. *Am J Med Genet* 1985, 20:639-648.
- [93] SEEMANOVÁ E. *Syndromy chromozomální instability*. LÉKAŘSKÉ LISTY: GENETIKA. Oddělení lékařské genetiky ÚBLG 2. LF UK, Praha, 2006, 10-11.
- [94] SEEMANOVÁ E., SPERLING K., NEITZEL H., VARON R., HADAC J., BUTOVA O., SCHRÖCK E., SEEMAN P., DIGWEED M. *Nijmegen breakage syndrome (NBS) with neurological abnormalities and without chromosomal instability* [online]. In: . originally published online 20 Jul 2005; *J. Med. Genet.*, 2006 [cit. 2020-03-15]. Dostupné z: <http://www.dnalab.cz/publikace/NBS/NBS%20Seemanová%20E%20-%20JMG%203-2006.pdf>
- [95] SCHOUTEN JP., MCELGUNN CJ., WAAIJER R. et al (2002) *Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation dependent probe amplification*. *Nucleic Acids Res* 30(12):e57
- [96] SCHOUTEN J., van VUGHT P., GALJAARD RJ. (2019) *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) for Prenatal Diagnosis of Common Aneuploidies*. In: Levy B. (eds) *Prenatal Diagnosis. Methods in Molecular Biology*, vol 1885. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8889-1_11
- [97] SINGH A., AMBUJAN S., UMA AN. *The cytogenetics of Bloom's syndrome*. Department of Dermatology, Venereology, Leprology. Department of Anatomy, Mahatma Gandhi Medical College and Research Institute: *J Pediatr Neurosci.*, 2010, 5(2), 171-172.
- [98] SLANINOVÁ I. *Mutace, poškození DNA, „DNA repair“: Excizní reparace* [online] Masarykova univerzita: Biologický ústav LF MU, 2006, Dostupné z: https://is.muni.cz/el/med/jaro2006/BLTM0111p/um/p23_Mutace-06-web.pdf

- [99] Slovník cizích slov [online]. ABZ, 2005 [cit. 2021-7-14]. Dostupné z: <https://slovník-cizich-slov.abz.cz/>
- [100] STEENSMA DP., STONE RM., ABELOFF MD., ARMITAGE JO., NIEDERHUBER JE., KASTAN MB., MCKENNA WG., eds. *Myelodysplastic syndromes*. Abeloff's Clinical Oncology. 5th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier; 2014.
- [101] SUGASAWA K. *Regulation of damage recognition in mammalian global genomic nucleotide excision repair*. *Mutat Res*. 2010;685:29–37.
- [102] ŠEDIVCOVÁ M., MARTÍNEK P., STEHLÍK J., GROSSMANN P., KAŠPÍRKOVÁ J., VANĚČEK T. *Sekvenování – klasická metodika*. *Česko-slovenská patologie a soudní lékařství*. 2013, 49(3), 122-128; Bioptická laboratoř, s. r. o., Plzeň 1; Šiklův ústav patologie LF UK a FN, Plzeň
- [103] ŠÍPEK A. *Mutace; Chromozomy; Karyotyp člověka, Genetické testy*. *Genetika - biologie* [online]. ©2010-2014 [cit. 2020-05-14]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/mutace>
- [104] TAYLOR AM., LAST JL., BYRD PJ. a LAM Z. *Ataxia telangiectasia: more variation at clinical and cellular levels*. *Am J Med Genet*. © 2014 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons, 2014, 87(3), 199-208. ISSN <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25040471>.
- [105] TAYLOR A.M.R., ROTHBLUM-OVIATT C., ELLIS N.A. et al. *Chromosome instability syndromes*. *Nat Rev Dis Primers* 5, 64 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0113-0>
- [106] TOM N., PARDY F., KOTAŠKOVÁ J., PLEVOVÁK., POSPÍŠILOVÁ Š.. *Základní bioinformatické pojmy a postupy využívané pro analýzu DNA pomocí sekvenování nové generace*. *Transfúze Hematol. dnes*,24, 2018, No. 3, p. 174-180.
- [107] Velký lékařský slovník [online]. Copyright Maxdorf, 2021 [cit.2021-7-14]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/>
- [108] WERNER O Kiel University. SCHMIDT and KLAUNING; Kiel: 1904. *On Cataract Associated in Conjunction with Scleroderma*, [doctoral dissertation]
- [109] VIANA LM., SEYYEDI M., BREWER CC., ZALEWSKI C., DIGIOVANNA JJ., TAMURA D., TOTONCHY M., KRAEMER KH., JOSEPH B., NADOL JB. Jr. *Histopathology of the inner ear in patients with xeroderma pigmentosum and neurological degeneration*. *Otol Neurotol*. 2013;34:1230–6.

- [110] WERNER O Kiel University. SCHMIDT and KLAUNING; Kiel: 1904. *On Cataract Associated in Conjunction with Scleroderma*, [doctoral dissertation]
- [111] *WRN RecQ like helicase* [Homo sapiens (human)]. Gene (NCBI). J Med Genet, 2020. Gene ID: 7486. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7486#top>
- [112] WU ZH. *Phenotypes and genotypes of the chromosomal instability syndromes*. Transl Pediatr 2016;5(2):79- 83.
- [113] YOUNGHOON K., ALAN A. *Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability*. Genes Dev. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine: J Med Genet, 2010, 24(16), 1680-1694. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2922498/>
- [114] ZEMANOVÁ Z. *Klasická a onkologická cytogenetika*. I. Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky, VFN a 1. LF UK v Praze: Centrum nádorové cytogenetiky ÚKBLD VFN a 1.LF UK v Praze. Dostupné z: <https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/654/Klasická%20a%20onkologická%20cytogenetika-Zemanová%20Z.pdf>
- [115] ZHANG X., MORÉRA S., BATES PA., WHITEHEAD PC., COFFER AI., HAINBUCHER K., NASH RA., STERNBERG MJ., LINDAHL T. FREEMONIT PS. *Structure of an XRCC1 BRCT domain: a new protein-protein interaction module*. THE EMBO JOURNAL. Am J Med Genet, 1998, 17(21), 6404–11. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1170965/>
- [116] ZIMA T. *Laboratorní diagnostika*. Univerzita Karlova v Praze. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-246-1423-6.

9 ZDROJE OBRÁZKŮ

- [1] TAYLOR A.M.R., ROTHBLUM-OVIATT C., ELLIS N.A. *et al.* *Chromosome instability syndromes*. *Nat Rev Dis Primers* **5**, 64 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0113-0>
- [2] HENSIEK A., TAYLOR M. *The clinical variability of Ataxia Telangiectasia – an update*. In: *Advances in clinical neuroscience and rehabilitation* [online]. The Wellington Hospital part of HCA Healthcare UK, 2015 [cit. 2020-03-03]. Dostupné z: <https://www.acnr.co.uk/2015/07/the-clinical-variability-of-ataxia-telangiectasia-an-update/>
- [3] SEEMANOVÁ E., SPERLING K., NEITZEL H., VARON R., HADAC J., BUTOVA O., SCHRÖCK E., SEEMAN P., DIGWEED M. *Nijmegen breakage syndrome (NBS) with neurological abnormalities and without chromosomal instability* [online]. In: . originally published online 20 Jul 2005; *J. Med. Genet.*, 2006 [cit. 2020-03-15]. Dostupné z: <http://www.dnalab.cz/publikace/NBS/NBS%20Seemanová%20E%20-%20JMG%203-2006.pdf>
- [4] CHRZANOWSKA K., GREGOREK H., DEMBOWSKA-BAGINSKA B., KALINA M. a M. DIGWEED. *Nijmegen Breakage Syndrome (NBS)*. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. Published online: National Center for Biotechnology Information, 2012. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3314554/>
- [5] GRUHN B., SEIDEL J., ZINTL F., VARON R. *Successful bone marrow transplantation in a patient with DNA ligase IV deficiency and bone marrow failure*. *Orphanet J Rare Dis.* **2**, 5. 2007. PMID 17224058.
- [6] BLM Gene (Protein Coding) BLM RecQ Like Helicase. *Gene Cards - The human gene database*. Weizmann Institute of Science, Life Map Science. Dostupné. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BLM&keywords=bloom,syndrome#summaries>
- [7] SINGH A., AMBUJAN S., UMA AN. *The cytogenetics of Bloom's syndrome*. Department of Dermatology, Venereology, Leprology. Department of Anatomy, Mahatma Gandhi Medical College and Research Institute: *J Pediatr Neurosci.*, 2010, **5**(2), 171-172. DOI: 10.4103/1817-1745.76124.
- [8] AUERBACH AD. *Fanconi Anemia and its Diagnosis*. Author Manuscript. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, USA: *J. Med. Genet.*, 2009, **668**((1-2), 4-10. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2742943/>

- [9] HISAMA MF., BOHR AV., OSHIMA J. *WRN's Tenth Anniversary*. PERSPECTIVES. Sci. Aging Knowl. Environ., 28 June 2006 Vol. 2006, Issue 10, p. pe18
- [10] WRN Gene (Protein Coding) WRN RecQ Like Helicase. *Gene Cards - The human gene database*. Weizmann Institute of Science. Life Map Science. Dostupné z: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=WRN&keywords=WRN,gene>
- [11] WAN D. *Ultraviolet (UV) Disinfection*: PowerPoint PPT Presentation. In: *SlideServe* [online]. 2014 [cit. 2020-05-12]. Dostupné z: <https://www.slideserve.com/wan/ultraviolet-uv-disinfection>
- [12] ŠÍPEK A. *Mutace*. *Genetika - biologie* [online]. ©2010-2014 [cit. 2020-05-14]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/mutace>
- [13] GANČARČÍKOVÁ M., V. ŠTULLER, I. SVĚTLÍKOVÁ, P. TOMČOVÁ, M. ŠENKEŘÍKOVÁ, A. ŠŤÁVOVÁ, D. PANCHÁRTEK, P. PRUSÁKOVÁ, V. KRULIŠOVÁ, R. MICHALOVSKÁ a Z. VLČKOVÁ. Laboratoře lékařské genetiky s.r.o., GHC Genetics, s.r.o., 2020. *Vzácná vrozená onemocnění v komplexní cytogenetické a molekulárně genetické analýze* [poster]. In: 16. ročník konference RANK 2020 se uskutečnil 5. a 6. února 2020, Pardubice
- [14] KOČÁREK E., PÁNEK M., NOVOTNÁ D. *Klinická cytogenetika I úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1880-7.
- [15] BÁRTOVÁ E., LITERÁK I. *Sekvenování DNA*. *Molekulární biologie* [online]. VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie; Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, 2011 [cit. 2020-11-22]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-sekvenovani&lang=cz
- [16] METZKER ML. *Sequencing technologies — the next generation*. *Nature reviews: Genetics*. Macmillan Publishers, 2010, 11(1), 31-46. Dostupné z: doi:10.1038/nrg2626

10 ZDROJE TABULEK

- [1] KOČÁREK E. Autozomálně recesivní choroby. *Vybrané aspekty lékařské genetiky* [online]. Ústav biologické lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha: Praha: Ústav dědičných metabolických poruch Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, 2008 [cit. 2020-03-03]. Dostupné z: http://www.fnmotol.cz/_sys_/FileStorage/download/2/1318/vybrane_aspekty_lekarske_genetiky.pdf
- [2] ČEPOVÁ I., ŠANTAVÁ A. *Syndromy chromozomální instability* [online]. Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny FN a LF UP Olomouc, 2004 [cit. 2020-03-03]. Dostupné z: <http://ulgrs.upol.cz/portal/wp-content/uploads/2010/11/ulg00019.pdf>
- [3] DRISCOLL MO., CEROSALETTI KM., GIRARD PM., NEITZEL H., JEGGO PA. DNA Ligase IV Mutations Identified in Patients Exhibiting Developmental Delay and Immunodeficiency. *Molecular Cell*. 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00408-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00408-7). Dostupné z: [https://www.cell.com/molecular-cell/fulltext/S1097-2765\(01\)00408-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1097276501004087%3Fshowall%3Dtrue#](https://www.cell.com/molecular-cell/fulltext/S1097-2765(01)00408-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1097276501004087%3Fshowall%3Dtrue#)
- [4] CUNNIF C., BASSETTI JA., ELLIS NA. Bloom's Syndrome: Clinical Spectrum, Molecular Pathogenesis, and Cancer Predisposition. *Molecular Syndromology*. a. Division of Medical Genetics, Department of Pediatrics, Weill Cornell Medical College, New York, N.Y., and b. Department of Cellular and Molecular Medicine, University of Arizona Cancer Center, Tucson, Ariz., USA: © 2016 S. Karger AG, Basel, 2016. DOI: 10.1159/000452082.
- [5] Wu ZH. Phenotypes and genotypes of the chromosomal instability syndromes. *Transl Pediatr* 2016;5(2):79- 83. doi: 10.21037/tp.2016.03.04
- [6] MEHTA PA., TOLAR J. Fanconi Anemia Synonym: Fanconi Pancytopenia. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine: *J Med. Genet.*, 2018. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1401/#fa.Summary>