

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Variabilita počtu kopií v prenatální a postnatální genetické diagnostice

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

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

Jméno a příjmení: **Kristýna Dohnalová**
Osobní číslo: **C18158**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Téma práce: **Variabilita počtu kopií v prenatalní a postnatální genetické diagnostice**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

- 1) Vypracujte literární rešerši o variabilitě počtu kopií v prenatalní a postnatální genetické diagnostice.
- 2) Charakterizujte mechanismus vzniku CNV (Copy Number Variation), uveďte typy dědičnosti a jejich klinické důsledky.
- 3) Vysvětlete etiopatogenezi vybraných syndromů a popište jejich fenotypické projevy.
- 4) Rozvedte metodické postupy genetické diagnostiky.
- 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:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

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: **18. prosince 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

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

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem „**Variabilita počtu kopií v prenatální a postnatální genetické diagnostice**“ 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

Kristýna Dohnalová v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Lucii Stříbrné Ph.D. a Mgr. Markétě Gančarčíkové za cenné rady, odborné vedení, trpělivost a za čas, který mi věnovaly. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině a příteli za podporu během mého studia.

ANOTACE

Bakalářská práce je zaměřena na variabilitu počtu kopií a variabilitu lidského genomu. Popisuje obecné informace o variabilitě počtu kopií, fyziologickém fungování v organismu a možných typech dědičnosti. Dále se zabývá vybranými klinickými syndromy spjatými s variabilitou počtu kopií. V poslední části je zaměřena na prenatální a postnatální molekulární genetickou diagnostiku a léčbu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Variabilita počtu kopií, gen, chromozom, dědičnost, klinické syndromy, vrozené vývojové vady, diagnostika, léčba

TITLE

Copy number variations in prenatal and postnatal genetic diagnosis

ANNOTATION

The bachelor thesis is focused on the copy number variation (CNV) and the variability of the human genome. Describes general information about copy number variations, physiological functioning in the body, and possible types of hereditary. It also deals with selected clinical syndromes associated with copy number variations. The last part focuses on prenatal and postnatal molecular genetic diagnosis and treatment.

KEYWORDS

Copy number variations, gene, chromosome, heredity, clinical syndromes, congenital malformations, diagnostics, therapy

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	10
TERMINOLOGIE	11
ÚVOD	12
1 VARIABILITA POČTU KOPIÍ.....	13
1.1 Delece a Duplikace.....	14
1.1.1 Duplikace	15
1.1.2 Delece	16
1.2 Nejčastější mechanismy vzniku CNV.....	16
1.2.1 Nealelická homologní rekombinace (NAHR)	16
1.2.2 Nehomologní spojování konců (NHEJ).....	17
1.2.3 Blokování replikační vidlice a změna templátového vlákna (FoSTeS).....	18
2 FYZIOLOGICKÉ CNV	19
2.1 Variabilita lidského genomu	21
2.1.1 Projekt lidského genomu.....	22
3 DĚDIČNOST.....	24
3.1 Autozomálně dominantní typ dědičnosti (AD).....	24
3.2 Gonozomálně recesivní typ dědičnosti (GR)	25
3.3 Gonozomálně dominantní typ dědičnosti (GD)	26
3.4 Varianty <i>de novo</i>	27
3.5 OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)	28
4 KLINICKÉ SYNDROMY	29
4.1 Potocki-Lupski syndrom	29
4.2 Syndrom Smithové-Magenisové.....	31
4.3 Syndrom DiGeorge	33
4.4 Mikroduplikační syndrom 22q11.21	36
4.5 Syndrom Cri du chat	38
5 PRENATÁLNÍ A POSTNATÁLNÍ DIAGNOSTIKA	40
5.1 Prenatální diagnostika	40
5.1.1 Neinvazivní metody	40
5.1.2 Invazivní metody	41
5.2 Postnatální diagnostika.....	42
6 MOLEKULÁRNÍ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA	43

6.1	Kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce (QF – PCR)	43
6.2	Komparativní genomová hybridizace (CGH)	44
6.3	Metoda Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA)	46
6.4	Metoda Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH)	48
7	LÉČBA	50
8	ZÁVĚR.....	51
9	POUŽITÁ LITERATURA	53

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 – Typy genomových variant	14
Obrázek 2 – Duplikace	15
Obrázek 3 – Terminální a intersticiální delece.....	16
Obrázek 4 – Delece.....	16
Obrázek 5 – Shrnutí mechanismů CNV	18
Obrázek 6 - Autozomálně dominantní typ dědičnosti.....	25
Obrázek 7 - Gonozomálně recesivní typ dědičnosti.....	26
Obrázek 8 - Gonozomálně dominantní typ dědičnosti.....	27
Obrázek 9 - Pacienti s diagnostikovaným Potocki-Lupski syndromem.....	31
Obrázek 10 - Věkový progres pacientky, u které byl diagnostikován Syndrom Smithové-Magenisové.....	33
Obrázek 11 - Syndrom DiGeorge.....	35
Obrázek 12 - Obličejové rysy pacientů s diagnostikovanou mikroduplikací 22q11.2.....	37
Obrázek 13 - Klinické rysy pacientů se syndromem Cri du chat.....	39
Obrázek 14 - Elektroforetogram z metody QF-PCR ze vzorku plodové vody pomocí soupravy Aneufast™.....	44
Obrázek 15 - Schéma znázorňující postup metody array-CGH od počátku do výsledného zobrazení pomocí skeneru.....	45
Obrázek 16 – Princip metody MLPA.....	47
Obrázek 17 – Diagnostika syndromu DiGeorge metodou FISH.....	49
Tabulka 1 - Počet záznamů v databázi OMIM.....	28
Tabulka 2 - Přibližná incidence morfologických vrozených vad a jejich důsledky.....	29

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ALU – transpozónální sekvence

aCGH – komparativní genomová hybridizace na mikročipu (z angl. *Array Comparative Genomic Hybridization*)

CNP – polymorfismy v počtu kopií (z angl. *Copy-Number Polymorphism*)

CNV – variabilita v počtu kopií (z angl. *Copy-Number Variation*)

DBS – DNA dvouřetězcové zlomy (z angl. *Double Strand Breaks*)

DGS – syndrom DiGeorge

DGV – databáze genomových variant (z angl. *Database of Genomic Variants*)

DNA – deoxyribonukleová kyselina

FISH – fluorescenční *in situ* hybridizace

FoSTeS – blokování replikační vidlice a změna templátového vlákna (z angl. *Fork Stalling and Template Switching*)

GO – genová ontologie

HGP – projekt lidského genomu (z angl. *Human Genome Project*)

LCR – sekvence s nízkým počtem opakováním (z angl. *Low Copy Repeat*)

LINE – dlouhé rozptýlené jaderné elementy (z angl. *Long Interspersed Nuclear Elements*)

MLPA – mnohonásobná amplifikace závislá na ligaci sond (z angl. *Multiplex Ligation dependent Probe Amplification*)

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

NAHR – nealelická homologní rekombinace (z angl. *NonAllelic Homologous Recombination*)

NHEJ – nehomologní spojování konců (z angl. *NonHomologous End Joining*)

OMIM – on-line databáze genů a genetických onemocnění u lidí (Online Mendelian Inheritance in Man)

QF-PCR – kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce (z angl. *Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction*)

SD – segmentální duplikace

SNP – jednonukleotidový polymorfismus (z angl. *Single Nucleotide Polymorphism*)

STR – krátké tandemové repetice (z angl. *Short Tandem Repeats*)

TERMINOLOGIE

Alela: konkrétní forma genu

Brachydaktylie: vrozené onemocnění projevující se krátkými a zavalitými prsty

Genom: veškerá genetická informace uložená v DNA

Haploinsuficience: dědičné onemocnění, u kterého je přítomna jen jedna funkční alela genu

Chromozom: buněčná struktura eukaryot v jádře

Imunodeficience: stav, kdy má imunitní systém sníženou schopnost odpovídat na antigenní a další podněty

Mikrognatie: zmenšená dolní čelist

Mutace: změna v molekule DNA

Polydaktylie: vrozená vývojová vada projevující se nadpočetnými prsty na ruce či noze

Recidiva: návrat onemocnění po jejím vyléčení

Screening: metoda, kdy se vyhledávají časná stádia onemocnění nebo patologické stavy a jedinec nemá ještě žádné příznaky vyhledávaného onemocnění

Velofaryngeální insuficience: stav, kdy měkké patro a svalovina hltanu netvoří optimální uzávěr mezi částí hltanu, která je spojená s dutinou ústní a nosohltanem

Zdroj: Velký lékařský slovník, 2000. *Velký lékařský slovník* [online]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/>

ÚVOD

Bakalářská práce je zaměřena na variabilitu počtu segmentů DNA (CNV, Copy-Number Variation). Do popředí se CNV dostaly až poté, kdy byl dokončen projekt lidského genomu a jeho mapování v roce 2003. Od té doby se variabilitou počtu kopií zabývalo mnoho vědců v několika studiích. Jejich hlavním záměrem se stalo pozorování dopadu CNV na lidské zdraví, mechanismy vzniku a celkový obsah těchto fragmentů.

První část bakalářské práce se zaměřuje na obecný popis CNV a nejčastější mechanismy vzniku, které mají podíl na variabilitě počtu kopií. V další části se práce zabývá benigními variantami CNV a jejich zapojením do fyziologických procesů v lidském organismu a důležitostí variability lidského genomu pro zachování lidské existence na Zemi.

Dále jsou vysvětleny možné typy dědičnosti, díky kterým CNV přestupují z generace na generaci. V této kapitole je popsána autozomálně dominantní dědičnost, gonozomálně dominantní a recesivní dědičnost a varianty vzniklé *de novo*, u kterých studie prokázaly, že mohou být přítomny v celém genomu.

Ve druhé části práce jsou popsány některé klinické syndromy, které jsou způsobené mikrodelecemi či mikroduplikacemi na chromozomech. U jednotlivých syndromů jsou popsány jejich mechanismy vzniku, etiopatogeneze a fenotypové projevy. Byl popsán mikroduplikační syndrom Potocki-Lupski a mikrodeleční syndrom Smithové-Magenisové na stejné oblasti chromozomu 17. Dále mikrodeleční syndrom DiGeorge, mikroduplikační syndrom 22q11.21 a posledním popsáným onemocněním je deleční syndrom Cri du chat.

Následně je rozebrána molekulárně genetická diagnostika v prenatalní a postnatální diagnostice, kdy se mezi nejdůležitější metody řadí QF-PCR, array CGH, MLPA a FISH metoda. Díky rychlému rozvoji diagnostických metod se přichází na prenatalní a postnatální CNV včas, a tak dochází k rychlé stratifikaci pacientů, jejich zařazení do preventivních programů či léčby.

Léčbou se zabývá poslední část bakalářské práce, ovšem léčba syndromů zůstává i v dnešní době pouze symptomatická. Symptomy anebo morfologické vady jsou řešeny farmakologicky nebo chirurgicky. Do nových trendů v medicíně se zařazuje genová terapie, která s sebou nese řadu etických aspektů a zůstává především v experimentální a vědecké rovině.

1 VARIABILITA POČTU KOPIÍ

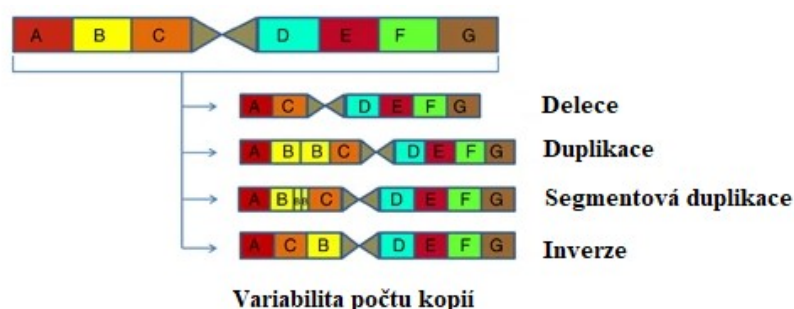
Jednonukleotidový polymorfismus (z angl. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) je hlavním zdrojem genetických a fenotypových variant v lidském genomu. Příchod technologií, jakými jsou komparativní genomové hybridizace, umožnily odhalit velký rozsah tzv. "strukturálních variabilit" v lidském genomu. Jedná se o mikroskopické a submikroskopické varianty zahrnující delece, duplikace, ale i genomové přestavby jakými jsou inserce, inverze a translokace se změnou dávky genů, přičemž tyto rozsáhlé změny v počtu kopií variant souhrnně nazýváme termínem převzatým z angl. *Copy-Number Variation* (CNV) - variabilita v počtu kopií (Feuk *et al.*, 2006). Typy genomových variant jsou zobrazeny na Obrázku 1.

Termín CNV je definován jako rozdíl v genomové dávce nebo fragmentů DNA v porovnání s referenčním genomem. Původně se používal k popisu změn genomových segmentů DNA o velikosti větší než 1 kb až po několik milionů bází (Feuk *et al.*, 2006; Freeman *et al.*, 2006; Scherer *et al.*, 2007). Vyšší rozlišení analýz CNV umožnilo detekovat stále více menších CNV napříč lidského genomu ve velikosti v rozsahu 100 bází až 1 kb (Boone *et al.*, 2010; The 1000 Genomes Project Consortium, 2010).

CNV jsou výsledkem strukturální variace genomu, které obsahují delece, duplikace, inserce nebo nevyvážené translokace a inverze. Tyto mechanismy mohou vést ke ztrátě nebo zisku genomových segmentů. Variabilita počtu kopií má výrazný dopad na lidské zdraví a je předpokladem pro různá onemocnění, mezi ně se řadí mentální retardace, syndromy vícečetných vrozených anomálií, komplexní neurodegenerativní a neuropsychiatrické poruchy, jako je autismus a schizofrenie. Dále také nádorová onemocnění a imunitní insuficience (Shaikh, 2017).

Variability počtu kopií segmentů DNA mohou vznikat *de novo*, ale také mohou být podmíněny dědičně. Dle mezinárodních doporučení jsou CNV klasifikovány do 5 tříd: 1 třída - benigní varianta, 2 třída - pravděpodobně benigní, 3 třída - varianta nejasného klinického významu, 4 třída - pravděpodobně patogenní, 5 třída - patogenní varianta. Zdánlivě zdraví jedinci mají v lidském genomu také významný počet CNV, ale předpokládá se, že nemají žádnou souvislost s nepříznivými fenotypovými nálezy, přičemž tyto CNV jsou označovány jako polymorfismy v počtu kopií z angl. *Copy-Number Polymorphism* (CNP) (Coughlin *et al.*, 2012). V populaci se polymorfismus vyskytuje u více než 1 % populace (Feuk *et al.*, 2006).

V roce 1936 bylo prokázáno jedno z prvních sdružení mezi CNV a fenotypem, kdy Calvin B. Bridges popsal u *Drosophila melanogaster* duplikaci *Bar* genu, která se fenotypově projevuje jako zúžení u složených očí (Bridges, 1936).



Obrázek 1 – Typy genomových variant

(Převzato od: Almal a Padh, 2012, Převzato z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21956041/>)

V roce 2006 byla sestrojena první mapa CNV. Do studie bylo zapojeno 270 osob ze čtyř populací s předky z Evropy, Afriky a Asie. Izolovaná DNA z lymfocytů periferní krve jedinců byla analyzována k detekci CNV pomocí dvou komplementárních technologií. Jednalo se o genotypová pole s jedním nukleotidovým polymorfismem (SNP) a komparativní genomovou hybridizací založenou na klonech (CGH). Bylo nalezeno 1 447 CNV, které obsahovaly zisky, ztráty a různé překryvy. CNVR (Copy Number Variable Region) pokrývají až 360 Mb, které odpovídají 12 % genomu. Variability obsahovaly stovky genů, lokusů, funkčních prvků a segmentálních duplikací. Je zvláštní, že CNV obsahovaly více nukleotidů na jeden genom než SNP. Tento objev potvrdil, že variabilita počtu kopií má velký význam v genetickém zkoumání, v lidské evoluci a pro studie genetických chorob (Redon, *et al.*, 2006), Mapa byla aktualizována v roce 2015 na základě 55 studií bylo zjištěno, že 4,8 – 9,5 % genomu přispívá k CNV, přičemž zhruba 100 genů, které by mohly být úplně odstraněny, by neměly zjevné následky na fenotyp člověka. CNV jsou důležitým a velkým zdrojem benigních, ale i patogenních variant. Klíčovou otázkou zkoumání je, zda je varianta benigní anebo jestli ovlivňuje životně důležité funkce, které by vedly k onemocnění (Zarrei *et al.*, 2015). Správné klasifikační zařazení nalezených variant může vycházet z údajů z Databáze Genomových Variant (DGV), jelikož tato databáze je veřejně přístupná a poskytuje ucelený přehled o variabilitě počtu kopií a strukturálních variacích, které byly nalezeny napříč genomu jedinců celosvětové populace. DGV byla vytvořena v roce 2004 (Iafate *et al.*, 2004).

1.1 Delece a Duplikace

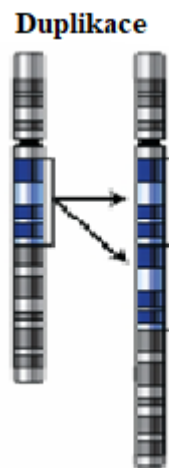
Delece a duplikace chromozomových segmentů jsou hlavním zdrojem variant mezi lidmi a jsou základním faktorem v evoluci člověka, ale i v mnoha onemocněních jakými jsou

například duševní a vývojové poruchy, tak i nádorová onemocnění (Hastings, *et al.*, 2009). Tyto aberace se řadí mezi nejčastější formy variability počtu kopií segmentů DNA, které mohou zahrnovat tisíce až stovky tisíc bází. Účinným mutagenem pro indukci chromozomových přesmyků všeho druhu je ionizující záření. Rentgenové paprsky a gama paprsky způsobující přerušení kontinuity chromozomů (Freeman, 2000).

Interchromozomové přesmyky zahrnují dva různé chromozomy a mohou se vyskytovat mezi nehomologními chromozomy. Na molekulární úrovni mohou zahrnovat delece a duplikace, které vznikají rekombinací mezi dvěma homologními chromozomy i přesto, že se na cytogenetické úrovni objevují pouze v jediném chromozomu nebo páru chromozomů. Intrachromozomální přesmyky jsou cytogenetické aberace, které zahrnují jeden chromozom. Mezi tyto aberace se řadí intersticiální a terminální delece, intersticiální duplikace, inverze a izochromozomy. Některá přeskupení zahrnují jeden homolog (výměna sesterských chromatid) a jiná mohou zahrnovat oba homologní chromozomy (Shaffer a Lupski, 2002).

1.1.1 Duplikace

Duplikace, která je zobrazena na Obrázku 2, je definována jako znásobení úseku chromozomu neboli zdvojení genetického materiálu. Mohou vznikat samostatně přiřazením volných fragmentů vzniklých deficiencí anebo jako důsledek crossing-overu v procesu meiózy mezi chromozomy.

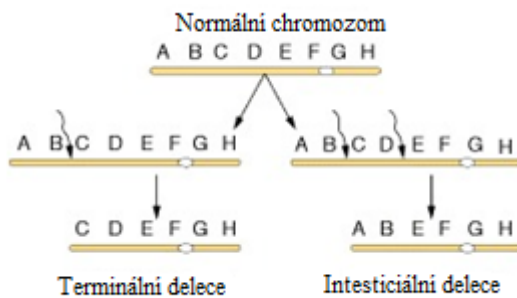


Obrázek 2 – Duplikace

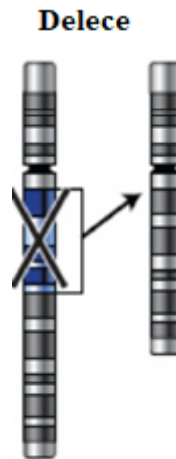
(Převzato z: <https://www.nicepng.com/>)

1.1.2 Delece

Delece, zobrazena na Obrázku 4, představuje ztrátu genetického materiálu jednoho chromozomu. Terminální delece nebo také deficiencie je termín pro ztrátu materiálu z konce chromozomu a intersticiální delece se projevuje ztrátou uvnitř chromozomu viz Obrázek 3.



Obrázek 3 – Terminální a intersticiální delece



Obrázek 4 – Delece

(Obrázek 3 - Převzato od: Freeman 2000, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21904/>)

(Obrázek 4 - Převzato z: <https://www.nicepng.com/>)

Mezi prvními popsanými chromozomovými delecemi byla identifikace distální delece krátkých ramen 5 chromozomu (5p) fenotypicky se projevující jako syndrom Cri-du-chat (Lejeune, *et al.*, 1964) a distální delece krátkých ramen 4 chromozomu (4p) způsobující Wolf-Hirschhornův syndrom (Wolf *et al.*, 1965).

1.2 Nejčastější mechanismy vzniku CNV

V současné době byly popsány především tři hlavní mechanismy, které nesou zodpovědnost za genomové přestavby v lidském genomu. Jedná se o nealelickou homologní rekombinaci (NAHR, NonAllelic Homologous Recombination), nehomologní spojování konců (NHEJ, NonHomologous End Joining), blokování replikační vidlice a změna templátového vlákna (FoSTeS, Fork STalling and Template Switching) (Gu *et al.*, 2008). Mechanismy jsou shrnuty na Obrázku 5.

1.2.1 Nealelická homologní rekombinace (NAHR)

Přibližně 50 % lidského genomu je složeno z opakujících se sekvencí včetně krátkých segmentových duplikací a sekvencemi s nízkým opakováním (LCR, z angl. *Low Copy Repeat*).

Segmentové duplikace jsou větší než 1 kb a sdílejí více než 90 % sekvenční identity (Bailey *et al.*, 2002).

LCR se nazývají také segmentové duplikace a jsou to sekvence, které se vyskytují dvakrát či vícekrát v genomu (Hastings *et al.*, 2009). Jestliže jsou dvě kopie paralelních LCR od sebe vzdáleny méně než 10 Mb, tak to může vést k nerovnoměrnému uspořádání chromozomů nebo chromatid. Tato situace má za následek delecii nebo duplikaci mezi úseky LCR a jedná se o nealelickou homologní rekombinaci (NAHR). Pokud jsou úseky LCR přítomny v obrácené orientaci povede NAHR ke vzniku inverze (Stankiewicz a Lupski, 2002). Dále bylo popsáno, že mechanismus NAHR mezi opakujícími úseky na rozdílných chromozomech mohou vést k chromozomové translokaci (Lupski, 1998).

NAHR se vyskytuje v meiotických i mitotických dělicích se buňkách a vede ke vzniku patogenních CNV. Některé vzácné NAHR mohou být zprostředkovány vysoce homologními opakujícími se sekvencemi např. Alu transpozonálními sekvencemi přítomnými v genomu primátů a LINE (Long Interspersed Nuclear Elements), což jsou dlouhé rozptýlené jaderné elementy (Gu *et al.*, 2008).

V germinálních buňkách mechanismus NAHR vede ke konstituční genomové změně manifestující se jako genomová změna, která může být zděděna či je její výskyt sporadický tzv. *de novo* (Lupski et Stankiewicz, 2005; Lupski, 2007; Turner et al., 2008). Pokud se mechanismus NAHR vyskytuje v mitóze, výsledkem je mozaicistní populace somatických buněk nesoucí genomovou aberaci, příkladem může být somatická *NF1* delce způsobující segmentální neurofibromatózu (Steinmann *et al.*, 2007).

1.2.2 Nehomologní spojování konců (NHEJ)

Nehomologní spojování konců řetězců DNA je dalším mechanismem vzniku CNV. DNA dvouřetězcové zlomy (DBS, double strand breaks) se považují za nejnebezpečnější typ poškození DNA, jelikož mohou vést ke ztrátě velkých chromozomových úseků. DBS jsou ve všech savčích buňkách opravovány nehomologním spojováním konců (Chang *et al.*, 2017).

K DBS může docházet různými způsoby jako například reaktivními formami kyslíku generovanými buněčným metabolismem, chybami souvisejícími s replikací, chemickými látkami a ionizujícím zářením (Hoeijmakers, 2001).

Pokud by docházelo k chybným opravám zlomů, mohlo by to mít za následek indukovanou apoptózu, stárnutí, chromozomovou aberaci ve formě translokací či delecí. Tyto chromozomové aberace jsou spojeny s genomovou nestabilitou, která může mít za následek karcinogenezi (Burma *et al.*, 2006).

NHEJ je také velmi důležitá pro fyziologickou rekombinaci V (D) J během vývoje T a B – lymfocytů imunitního systému (Malu *et al.*, 2012).

Během této rychlé opravy jsou jednoduše dva konce DNA spojeny dohromady, ale může zde častěji docházet k chybám. Proto se udává, že homologní rekombinace je mnohem přesnější metoda a NHEJ se považuje za hlavní mechanismus opravy u buněk savců, hlavně ve fázi G1 buněčného cyklu (Burma *et al.*, 2006).

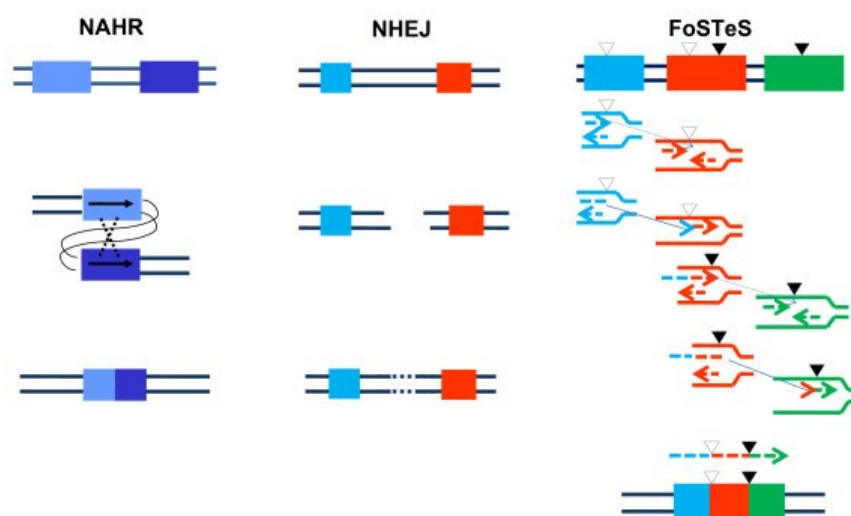
Vyžaduje ke své funkčnosti nukleázu, která slouží k vyjmutí poškozené DNA, polymerázu k doplnění nové DNA a ligázu, která obnoví integritu řetězců DNA (Lieber, 2010).

1.2.3 Blokování replikační vidlice a změna templátového vlákna (FoSTeS)

Komplexní chromozomy a genomové přesmyky není možné opravovat pomocí NAHR a NHEJ, a proto byl popsán mechanismus FoSTeS. Ten umožňuje lepší vysvětlení hraničních bodů zapojených do složitých přeskupení, mikrohomologii pozorovanou v hraničních bodech a velkou lineární vzdálenost (Lee *et al.*, 2007).

FoSTeS je mechanismem založeným na chybě při replikaci DNA při které dochází k zablokování replikační vidlice. Předpokládá se, že k němu dochází v procesu mitózy.

Během replikace DNA dojde k zablokování vidlice, uvolní se opoždující řetězec od původní šablony replikační vidlice a následně dochází k tomu, že řetězec se připojí na novou vidlici. Dojde k restartu syntézy DNA pomocí mikrohomologie mezi novým místem templátu a originální vidlicí (Zhang *et al.*, 2009).



Obrázek 5 – Shrnutí mechanismů CNV

(Převzato od: Gu *et al.*, 2008, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19014668/>)

2 FYZIOLOGICKÉ CNV

Do nedávné doby se předpokládalo, že zdraví jedinci jsou nositeli dvou kopií autozomálního genu, přičemž jedna kopie je děděna z matčina chromozomu a druhá od otce. Jakákoliv případná odchylka byla považována za fenotypicky škodlivou. Původní předpoklad byl, že dva zdraví jedinci si jsou geneticky přibližně z 99,9 % podobní a že hlavní zdroj genetické variability jsou hlavně jednonukleotidové polymorfismy (SNP) (Altshuler *et al.*, 2000). Tato obrovská genetická shoda byla v nedávné době vyvrácena právě díky objevu a zkoumání CNV.

V roce 1998 byla aplikována čipová komparativní genomová hybridizace (aCGH), která umožnila důkladnou detekci a analýzu CNV molekulárně biologickými technologiemi (Pinkel *et al.*, 1998). O technologii aCGH je více popsáno v kapitole o molekulární genetické diagnostice.

Problémem v minulosti byl fakt, že se spíše vědci zabývali výzkumy zaměřenými hlavně na analýzu onemocnění a nebrali zřetel na hloubkovou analýzu takzvané „normálních“ genomů, a proto benigní varianty CNV nebyly příliš studovány. S příchodem genetických technologií se zjistilo, že tyto varianty v počtu kopií jsou mnohem častější, než se předpokládalo a zjevně zdraví jedinci se od sebe liší ve velkém počtu genomických oblastí (De Smith *et al.*, 2009). Je známo, že CNV jsou všudypřítomné v genomu a mají vysokou populační frekvenci. Genomy jakýchkoliv dvou jedinců se mohou od sebe lišit o stovky až tisíce variabilit v počtu kopií.

Analýza genové ontologie (GO) odhalila různé kategorie genů s variabilním počtem kopií a jejich zapojení do imunitní odpovědi organismu a reakce na vnější biotické podněty (Feuk *et al.*, 2006). Geny s CNV jsou zapojené do interakcí s okolním prostředím ve formě smyslových vjemů (čich, chuť a zrak), dále jsou zapojeny do chemosenzorické percepce, spermatogeneze a gametogeneze. Zapojují se také do metabolismu sacharidů, lipidů, fosfátů a transportu vitamínů (Voight *et al.*, 2006). Byly zaznamenány geny, které jsou zapojené do neurofyziologických procesů a do vývoje mozku (De Smith *et al.*, 2007).

Mnoho variabilit v počtu kopií bylo lokalizováno na *PCDH* genu na chromozomu 5, přičemž se předpokládá, že právě tyto geny mají velkou roli v mozkových synaptických spojeních a prokázalo se, že CNV mají dopad na mozkové funkce a inteligenci (Cooper *et al.*, 2007).

Rozsáhlé variace počtu kopií významně přispívají ke genomové rozmanitosti, ale není známo, zda tyto varianty přispívají k rozdílům mezi lidskými fenotypy. Jestliže mají několik

funkčních důsledků, tak se očekává, že CNV budou distribuovány rovnoměrně v celém lidském genomu a budou kódovat geny, které jsou charakteristické pro genom jako celek. Bylo zjištěno, že lidské CNV jsou významně zastoupeny v blízkosti telomer a centromer a také v jednoduchých tandemových opakujících se sekvencích. V publikaci od Nguyen a kol. (2006) bylo popsáno, že CNV jsou neobvykle obohaceny o geny kódující proteiny, u kterých došlo ve zvýšené míře k substituci synonymních a nesynonymních nukleotidů, porovnáním mezi jednotlivými lidskými a myšimi homology.

Skupina vědců v roce 2004 identifikovala 255 lokusů se ziskem nebo ztrátou kopií několika desítek až stovek kilobází segmentů DNA napříč celým lidským genomem u fenotypicky normálních 55 nepříbuzných jedinců. Aplikováním metody komparativní genomové hybridizace na čipu (aCGH) objevili tzv. rozsáhlé CNV neboli LCVs (z angl. *large-scale copy-number variations*). Bylo zřejmé, že většina klonů byla náhodně distribuována po celém genomu. V průměru bylo vypočteno 12,4 LCVs na jednoho člověka. Identifikovali 102 rozsáhlých variabilit v počtu kopií, což odpovídá 41 %, které byly identifikovány u více než 1 jedince a dále pak 24 LCVs, které se nacházely u více než 10 % studovaných jedinců. Těch zbývajících 153 lokusů může představovat LCVs, které se budou vyskytovat v nižších frekvencích v populaci (Iafrate *et al.*, 2004).

Z této studie tedy vyplývá, že velké variability počtu kopií nejsou na genomech vzácné a vyskytují se u fenotypicky normálních jedinců. Nemusí být příčinou žádného genetického onemocnění, ale přítomnost na genomech by mohla vést ke chromozomovým přeskupením, která by následně mohly vyvolat genetická onemocnění.

V další studii roku 2009 se zkoumali etnické rozdíly CNV v lidském genomu mezi kavkazskou populací v USA a čínskou populací Han. Cílem této studie bylo rozšířit znalosti o strukturální variabilitě obsažené v lidském genomu a porozumění genomové diferenciaci komplexních rysů napříč etnickými skupinami. Bylo využito mapování pomocí Affymetrix GeneChipH 500K Array. Do tohoto výzkumu se zapojilo 985 bělochů z USA a 692 jedinců z Asie. Bylo identifikováno 3019 CNV a z toho bylo 2381 variabilit lokalizováno na autozomech a 638 CNV na X gonozomu, kdy průměrná délka CNV byla 296 kb. Z celkového počtu 3019 bylo detekováno 190 CNV u více jak 1 % alespoň v jedné etnické skupině a 109 CNV vykazovalo významné rozdíly ve frekvencích. Bylo nalezeno v průměru 9 CNV na osobu u bělošské americké populace v rozmezí 1-32 variabilit a u asijské populace 10 CNV v rozmezí 2-44 variabilit (Li *et al.*, 2009).

2.1 Variabilita lidského genomu

Důležitou podmínkou pro zachování naší existence na Zemi není jen předávání totožné genetické informace z generace na generaci, ale důležitou roli hraje i variabilita lidského genomu. Důsledkem procesů, které se odehrávají v každé eukaryotní buňce je právě variabilita lidského genomu a mnohobuněčných organismů. Díky mechanismu genové replikace s následnou možností vzniku mutací a syntéze modifikovaných bílkovin, přeskupování exonů, variabilnímu počtu tandemových repetič, přítomnosti retrovirů nebo transposonů v chromozomové DNA je zachována lidská variabilita (Reich *et al.* 2002; Beránek, 2016).

Proces rekombinace při meiotickém dělení zárodečných buněk, tvorba diploidních buněk se dvěma sadami chromozomů při pohlavním rozmnožování, genový imprinting a kondenzace jednoho ze dvou chromozomů X v somatických buňkách žen zajišťují genetické rozdíly mezi rodiči a jejich dětmi (Spinner *et al.*, 2014; Beránek, 2016).

Variace genomu zahrnují mutace a polymorfismy. Polymorfismem se označuje existence dvou nebo více alel v jednom lokusu přítomným u více jak 1 % lidí. Pokud je ovšem jedna z možných sekvencí přítomna u méně než 1 % lidí, nazývá se tato variace mutací. Asi 90 % variací lidského genomu vychází z jednonukleotidového polymorfismu (SNP, single-nucleotide polymorphism). Jedná se o variaci v jediném nukleotidu nebo bázi vyskytující se v určité pozici v genomu. Lidský genom obsahuje více než 2 miliony SNP (DeWeerd *et al.*, 2000). Je složen z molekul DNA rozdělených do 46 chromozomů (22 párů autozomů a jednoho páru gonozomů) má velikost 3,2 miliardy nukleotidů a to odpovídá 3200 megabázím. Celkově obsahuje asi 25 000 genů. Přibližně 1,5 % genomu zaujímají kódující oblasti, které jsou tvořené exony strukturních genů. Dále je genom tvořen introny, pseudogeny, mobilními elementy, repetitivními sekvencemi a částicemi, jejichž funkce doposud nejsou zcela objasněny (Pospíšilová *et al.*, 2009).

Nejdelší chromozom u člověka je označován číslem 1, zaujímá velikost 250 Mb a naopak nejkratší se udává chromozom Y s 50 Mb. Chromozomy u lidí se vzájemně liší také v hustotě genů, ze kterých jsou složeny. Například na chromozomu Y jsou lokalizovány pouze 4 geny a na chromozomu X jich můžeme nalézt až 200. Chromozomy 1, 11, 17, 19 a 22 se řadí mezi nejhustší buněčné struktury, které nesou genetickou informaci (National center for Biotechnology information 1998; Beránek, 2016).

Hlavní příčinou genetických změn jsou již zmiňované mutace, v novější literatuře označovány již termínem varianty, kterým lidský genom podléhá. Mutace či varianty zasahují jak zárodečné buňky, tak i somatické. Mohou se týkat jakékoliv buněčné struktury, která je

nositelkou genetické informace, tedy i mitochondriální DNA. Vznikají při replikacích DNA, působením různých mutagenů, či během oprav molekul DNA (Lodish *et al.*, 2000; Beránek, 2016).

Působením mutací dochází ke vzniku nové alely určitého genu, které ovlivňují, jak bude nový znak vypadat. Přispívají také k variabilitě potomstva tím, že by mohli mít důležitý význam pro jeho přežití a následný další vývoj. Mohou způsobovat těžké vývojové vady, nádorová onemocnění, různé poruchy metabolismu a také mohou zapříčinit úmrtí plodu nebo embrya ještě před narozením. Mutantní alely nemusí mít jen negativní vliv, ale mohou být i přínosem pro své hostitele tím, že mohou zvyšovat schopnost života jedinců, nebo zvyšovat odolnost před nepříznivými vlivy (Kočárek, 2004; Spinner *et al.*, 2014).

Zjistilo se, že genetická variabilita má určitý vliv i na rozvoj infekčního onemocnění. V roce 1929 ve městě Lübeck v Německu bylo nedopatřením naočkováno 251 novorozenců stejnou dávkou infekčního kmene *Mycobacterium tuberculosis*. Ukázalo se, že malé odchylky v DNA novorozenců jsou podstatou pro odlišnou vnímavost k tuberkulóze, jelikož 72 novorozenců po dávce zemřelo, 135 novorozenců vykazovalo příznaky této nemoci a 44 novorozenců bylo přechodně pozitivních na tuberkulózu. Tento omyl v medicíně prokázal, že přítomnost určitých alel predisponuje vznik a průběh infekčního onemocnění. Jedná se o varianty v genech imunitního systému, které by měly za normálních okolností rozpoznat či úplně zničit patogenní mikroorganismus (Musilová a Šmajš, 2010).

2.1.1 Projekt lidského genomu

Když v roce 1953 objevitelé Watson a Crick zveřejnili svou analýzu dvojité šroubovice DNA, dali do pohybu revoluci v genetice. Vyvrcholila jedním z nejodvážnějších počínů lidstva, a to projektem lidského genomu (z angl. *The Human Genome Project*, HGP). Jeho cílem bylo zjistit a rozkódovat celou jeho posloupnost (Sawicki *et al.*, 1993).

Projekt lidského genomu úspěšně určil, uložil a veřejně zpřístupnil sekvence téměř celého genetického obsahu chromozomů v lidském organismu neboli lidského genomu. Projekt HGP začal v roce 1990 a trval do roku 2003 a poskytl vědcům základní informace o sekvencích tří miliard párů chemických bází, tj. adeninu (A), thyminu (T), guaninu (G) a cytosinu (C). Tyto báze tvoří lidskou genomovou DNA. Hlavním cílem tohoto projektu bylo zlepšení technologií potřebných k interpretaci a analýze zjištěných výsledků genomových sekvencí, k určení genů, které jsou zakódované v lidské DNA a k řešení etických, právních a sociálních důsledků, které by se poté případně mohly vyskytnout při sekvenování celého lidského genomu (Fridovich a Judith, 2020).

První fáze projektu nazývaná *shotgun* rozdělila lidské chromozomy na segmenty DNA o vhodné velikosti, které se dále dělily na ještě menší překrývající se fragmenty DNA, které byly následně sekvenovány. Mezinárodní konsorcium pro sekvenování lidského genomu (IHGSC, z angl. *International Human Genome Sequencing Consortium*) pokračoval s druhou fází projektu označovanou jako fáze dokončovací, zahrnovala vyplňování mezer a řešení sekvencí DNA v nejasných oblastech (IHGSC, 2004). Tato finální fáze poskytla 99% konečnou podobu lidského genomu, který obsahoval 2,85 miliard nukleotidů s předpokládanou chybovostí 1 na 100 000 sekvenovaných bází. Snížily se počty mezer až 400 krát, kdy z 147 821 mezer zůstalo jen 341, které byly asociovány s náročnějšími chromozomovými lokalitami (Chial, 2008). Předpovídalo se, že lidský genom obsahuje až 40 000 genů kódující proteiny, ovšem dokončovací fáze projektu snížila tuto domněnku na 20 000 až 25 000 genů.

Nebyl sekvenován jen genom člověka, ale spolu s ním i genomy pěti organismů, a to *Escherichia coli*, kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, háďátko *Caenorhabditis elegans*, octomilka *Drosophila melanogaster* a myš domácí. Bylo prokázáno, že až 98,6 % genomu sdílí člověk se šimpanzem, 80 % genomu sdílíme s myší, 50 % s octomilkou, 40 % s háďátkem a 30 % genomu s kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae* (Vácha, 2016).

Dnes vědci předpokládají, že regulačních sekvencí je až pětkrát více než genů, které kódují proteiny. Organismy se od sebe neodlišují různými geny, ale spíše tím, které geny, ve kterých tkáních a jak silně se přepisují v různých vývojových stádiích organismu, jak probíhá sestřih pre-mRNA v epigenetických detailech, a také záleží na vlivu vnějšího prostředí ovlivňující expresi genu (Vácha, 2016).

3 DĚDIČNOST

Dědičnost dle mendelovských principů se definuje na autozomálně dominantní a recesivní a gonozomálně dominantní a recesivní, která je vázaná na X chromozom. U autozomálně dominantní dědičnosti stačí jen jedna zasažená mutantní alela, aby se fenotyp projevil, naopak u recesivního typu musí být obě alely postiženy. Gonozomální typ dědičnosti je specifický tím, že muži vždy onemocní bez ohledu na dominanci nebo recesivnost znaku a naopak ženy mohou být asymptomatickými přenašečkami onemocnění (Gandalovičová, 2001).

Mendelovské zákony zahrnují zákon o dominanci a uniformitě, zákon segregace a zákon nezávislého výběru. První zákon definuje, že některé alely, které jsou variantami konkrétního genu a nacházejí se na stejném chromozomovém lokusu nebo místě, jsou dominantní pro daný gen nad ostatními alelami. Ty, které nejsou dominantní nesou název recesivní. Pokud člověk zdědí alespoň jednu dominantní variantu, pak se zobrazí fenotyp právě té dominantní alely (Panoutsopoulou a Wheeler, 2018).

Zákon segregace uvádí, že dvě alely pro každý gen se od sebe uvolňují během gametogeneze, takže rodič bude předávat jen jednu alelu a jeho potomek tedy může zdědit od každého rodiče pouze tu jednu. Následně třetí zákon o nezávislém výběru uvádí, že alely různých genů se během gametogeneze segregují nezávisle na sobě a v dalších generacích jsou nezávisle na sobě předávány (Gayon, 2016).

Jelikož se moderní genetické technologie rychle vyvíjí zjistilo se, že i mutace vznikající *de novo* zásadně ovlivňují různá onemocnění a jejich vývoj.

V případě monogenních poruch za onemocnění zodpovídá pouze jedna kritická varianta konkrétního genu. Jsou to choroby, kterými jsou většinou postiženy děti. Méně než 10 % z případů onemocnění se projevuje po pubertě a jen 1 % se objevuje po skončení reprodukčního věku. Na 1 milion živě narozených dětí byla incidence monogenních chorob odhadnuta na 0,36 %. U 6-8 % dětí, které jsou hospitalizované, se uvažuje o monogenním onemocnění (Goldbergová *et al.*, 2007).

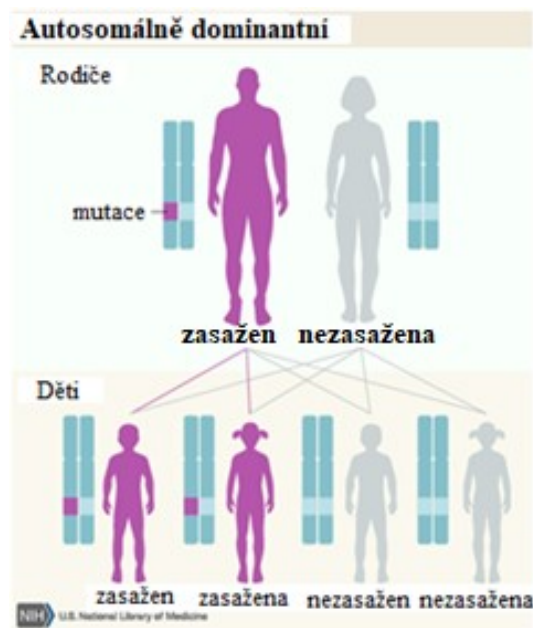
3.1 Autozomálně dominantní typ dědičnosti (AD)

Každý jedinec zdědí jednu normální kopii určitého genu a jednu zmutovanou kopii, která má větší vliv a následkem ní se u postiženého člověka projeví dané onemocnění.

Dědičné znaky se většinou objevují v každé generaci, tedy každý nemocný jedinec má postiženého rodiče. Riziko výskytu onemocnění pro každého potomka nemocného rodiče je 50 % a pouze jedna mutovaná alela stačí k projevu onemocnění. Pro obě pohlaví je riziko, že

onemocní stejně, tedy stejná pravděpodobnost, že muži a ženy předají fenotyp dětem obou pohlaví (Golbergová *et al.*, 2007). Onemocnění zděděná tímto typem se mohou projevit ihned po narození, ovšem některá se označují jako onemocnění s pozdním nástupem či s nástupem až v dospělém věku.

Mezi autozomálně dominantní typ dědičnosti se zařazují onemocnění jako například polydaktylie, brachydaktylie, Huntingtonova chorea, Marfanův syndrom, hypercholesterolemie a polycystická choroba ledvin, která se považuje za nejčastější AD onemocnění. Autozomálně dominantní typ je zobrazen na Obrázku 6.



Obrázek 6 - Autozomálně dominantní typ dědičnosti

(Převzato od: U.S. National Library of Medicine, <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/inheritance/inheritancepatterns/>)

3.2 Gonozomálně recesivní typ dědičnosti (GR)

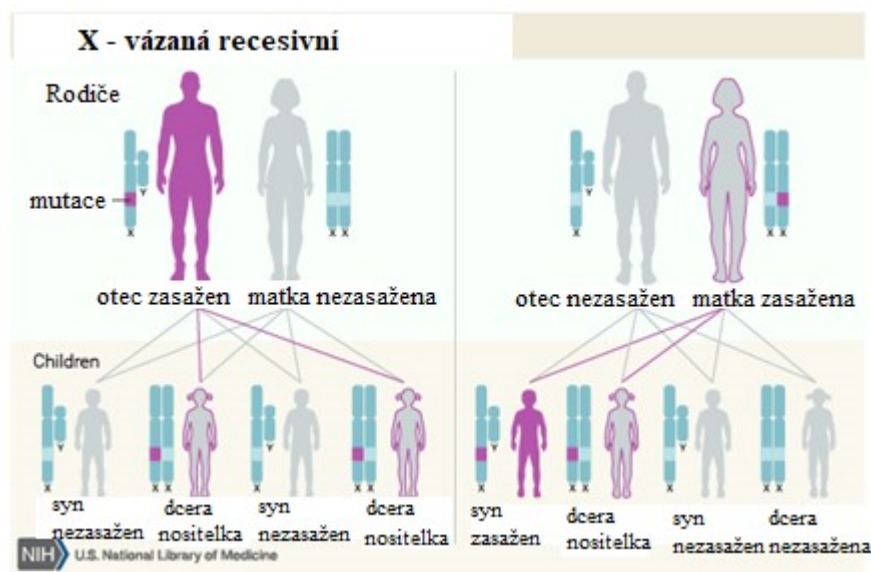
Gonozomálně recesivní typ dědičnosti je synonymem pro X-vázanou dědičnost. Týká se tedy genů, které lokalizujeme na pohlavním chromozomu X. Ten obsahuje mnoho genů, které jsou nezbytné pro růst a vývoj jedince. Gonozomálně recesivní dědičnost je shrnuta na obrázku 7.

Mezi postiženými tímto typem dědičnosti převažují muži, kdy gen zpravidla nebývá transmitován z otce na syna, ovšem může být přenášen muži na všechny jeho dcery. Přenos z otce na syna je možný při crossing-overu v pseudoautozomálních oblastech (PAR). Pokud je otec zdravý a patologická alela je přenášena zdravou matkou, tak možnost onemocnění pro jejich syny je 50 %. Jejich dcery budou zdravé, ale existuje 50% možnost, že budou nositelkami

onemocnění, které budou přenášet na další generace. Pokud patologickou alelu na své dcery přeneše nemocný otec, stávají se již zmíněnými nositelkami, ovšem pokud alela bude pocházet od jejich matky, budou zdravé. K onemocnění ženy může dojít tehdy, pokud obdrží mutované alely od každého rodiče (Böhmer a Repiská, 2009).

U žen nastává nenáhodná inaktivace aberovaného gonosomu, kdy je v každé buňce aktivní pouze jeden z dvojice X chromozomů. Většina genů je inaktivní na druhém chromozomu. K této inaktivaci dochází v brzkých fázích vývoje ženského zárodka a není schopna se měnit v průběhu života. Tento proces způsobí variabilní projev X vázaných onemocnění u žen. Muž má gonosomy XY, neexistuje u muže druhá alela, která by byla schopna vyrovnat mutaci první alely. U mužů se tedy vždy projeví mutovaná alela X-vázaného chromozomu (Gregor *et al.*, 2008).

Mezi nejčastější onemocnění, které spadají do kategorie této dědičnosti se zařazuje hemofilie A, syndrom fragilního X chromozomu, daltonismus, či Duchennova svalová dystrofie.



Obrázek 7 - Gonozomálně recesivní typ dědičnosti

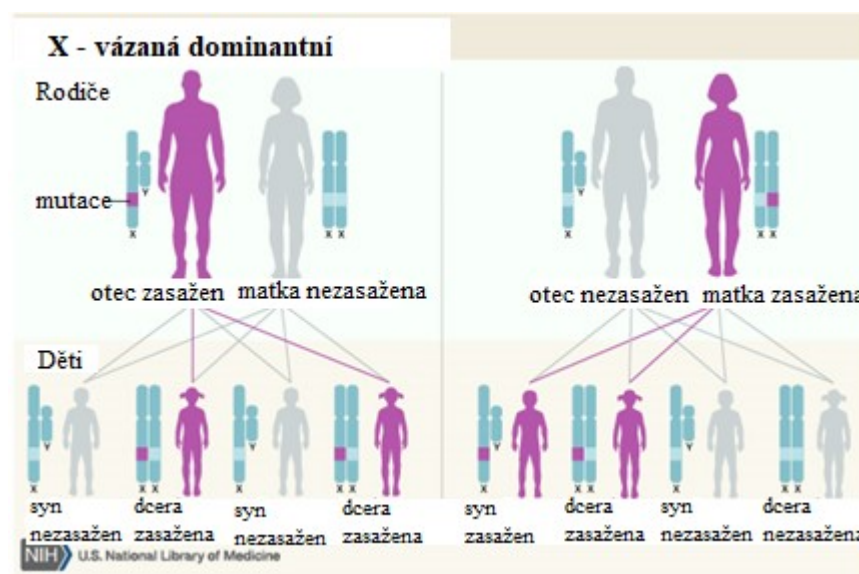
(Převzato od: U.S. National Library of Medicine, <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/inheritance/inheritancepatterns/>)

3.3 Gonozomálně dominantní typ dědičnosti (GD)

Gonozomálně dominantní typ dědičnosti, viz Obrázek 8, je vázán na X chromozomu, ale může být vázán i na chromozom Y. Ve druhém případě pak mluvíme o holandrické dědičnosti, ale jelikož na chromozomu Y je malý počet genů, tak se prakticky neprojevuje (Kočárek, 2004).

Nemocní muži se zdravými ženami budou mít zdravé syny, ale všechny jejich dcery budou onemocněním postiženy. Synové i dcery přenašeček mají 50% riziko, že zdědí postižený fenotyp. Nemocné ženy mají většinou mírnější, avšak variabilnější expresi fenotypu v důsledku X inaktivace. Pro mužské potomky může být onemocnění letální, zpravidla opakovanými spontánními aborty (Goldbergová *et al.*, 2007).

D-vitamín rezistentní rachitis neboli křivice a Charcot-Marie-Toothova choroba jsou typickým příkladem gonosomálně dominantních onemocnění (Basta a Pandya, 2020). Další příklady dominantních stavů, které jsou spojeny s X chromozomem je Aicardiho syndrom, Klinefelterův syndrom, který se někdy označuje jako 47,XXY a Alportův syndrom, ten zahrnuje progresivní ztrátu sluchu a problémy s ledvinami.



Obrázek 8 - Gonozomálně dominantní typ dědičnosti

(Převzato od: U.S. National Library of Medicine, <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/inheritance/inheritancepatterns/>)

3.4 Varianty *de novo*

De novo mutace či varianta představují nejextrémnější formu vzácné genetické varianty a jsou škodlivější nežli děděné formy. Celková míra *de novo* zárodečných mutací může být vyšší u jedinců s genetickým onemocněním a zjistilo se, že existuje zvýšená mutační zátěž spojená s vyšším věkem matky, popř. otce dítěte. Hlavní otázka je, zda se tyto mutace vyskytují v zárodečné linii během embryogeneze anebo se vyskytují somaticky.

Je známo, že dominantní *de novo* mutace jsou důležité a způsobují vzácná genetická onemocnění. Příkladem je Downův syndrom, který je zpravidla způsoben *de novo* trizomií chromozomu 21. Tento syndrom je nejčastější příčinou mentální retardace a postihuje 1:1500

narozených dětí, přičemž riziko roste exponenciálně s věkem matky (Winnepeninckx *et al.*, 2003). Pokud se u dítěte potvrdí varianta *de novo*, je zřejmé, že další potomek stejných rodičů tuto variantu nezíská, jelikož ani jeden z rodičů není nositelem této varianty mutace.

Většina sporadických onemocnění není způsobena mikroskopicky viditelnými chromozomálními abnormalitami a identifikace těchto genetických příčin je často velkou výzvou. V uplynulém desetiletí odkryly genomové mikročipy strukturní genomové varianty i u zdravých lidí. Následné studie odhalily, že *de novo* CNV se mohou vyskytovat v celém genomu, a že se vyskytují často u lidí, kteří mají poruchy spojené s fungováním neurologického systému a mozku (Veltman a Brunner, 2012), Mezi tyto poruchy se mimo jiné řadí poruchy pozornosti, hyperaktivita (ADHD), autismus, mentální retardace a dětská mozková obrna.

3.5 OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)

OMIM je online volně dostupný portál, kde se nachází komplexní a směrodatný souhrn lidských genů a genetických fenotypů. Dokumenty v této databázi obsahují informace o všech známých mendelovských poruchách a více než 15 000 genů. Tento portál se denně aktualizuje a jeho hlavní zaměření je na vztah mezi fenotypem a genotypem. Aktuální počet záznamů v databázi OMIM je zobrazen v Tabulce 1. Databázi pod názvem Mendelovy poruchy u člověka (z angl. *Mendelian Inheritance in Man*, MIM) zahájil na počátku 60. let lékař Victor A. McKusick jako katalog pro mendelovské rysy a poruchy. Tato přístupná online verze je od roku 1985 díky spolupráci mezi National Library of Medicine a William H. Welch Medical Library v Johns Hopkins. Ke dni 22. 3. 2021 je na stránkách OMIM (<https://www.omim.org/statistics/entry>) známo již 5 634 syndromů spojených s autozomální dědičností a 355 syndromů spojených s X-vázanou dědičností.

Tabulka 1 – Počet záznamů v databázi OMIM

(Převzato a upraveno z: <https://www.omim.org/statistics/entry>)

	Autozomální	X - vázané
Popsané geny	15 607	747
Gen a Fenotyp, kombinace	28	0
Popis fenotypu, známý molekulární základ	5 634	355
Popis fenotypu nebo lokusu, neznámý molekulární základ	1 412	112
Jiné, hlavně fenotypy s podezřením na mendelovský základ	1656	102
Celkem	24 337	1 316

4 KLINICKÉ SYNDROMY

Syndromy se řadí mezi vrozené vývojové vady (VVV) spolu s malformacemi, disrupcemi, deformacemi, dysplaziemi, sekvencemi a asociacemi. Obecně je vrozená vývojová vada definována jako odchylka struktury, či funkce přesahující meze normální variability jedince, která svého nositele znevýhodňuje vzhledem k ostatním. V České republice se udává frekvence VVV kolem 5 % při narození, další vývojové vady se mohou objevovat v průběhu života. Může se projevit morfologickými změnami různé intenzity, abnormalitami růstu, poruchou fertility až neplodností, snížením IQ a různými poruchami chování (Kohoutová, 2012). Přibližná incidence morfologických vad a jejich důsledky jsou shrnuty v Tabulce 2.

Tabulka 2 - Přibližná incidence morfologických vrozených vad a jejich důsledky

(Převzato od: Kohoutová, 2012)

Důsledky morfologických vad	Incidence
Spontánní potraty	
První trimestr	85 %
Druhý trimestr	25 %
Novorozenci	
Vrozené vady	2 %
Diagnostikované vady	2 %
Malé vady	10 %
Úmrtí	
Perinatální úmrtí	25 %
Úmrtí do 1. roku	25 %
Úmrtí do 10. roku	20 %

4.1 Potocki-Lupski syndrom

Jedná se o chromozomální mikroduplikační syndrom, který je způsoben genetickou intersticiální duplikací v oblasti chromozomu 17p11.2 zahrnující shluky genů s nízkým počtem opakování (LCR), známé také jako SMS-REPs. Proximální a distální oblasti s genetickou nestabilitou tohoto chromozomu jsou vysoce citlivé na mechanismus nealelické homologní rekombinace (NAHR). Proximální krátké rameno chromozomu 17 je velmi bohaté na LCR a je místem výskytu čtyř genetických poruch, a to Charcot-Marie-Toothova choroby typu 1A, hereditární neuropatii s citlivostí k tlakovým obrnám, syndrom Smith-Magenisové (SMS), o kterém se rozepisují níže, a poměrně nedávno popsany syndrom Potocki-Lupski (Potocki *et*

al., 2007). Název nese po objevitelích Lorraine Potocké a Jamesu Lupskym, kteří jako první tvrdili, že se jedná o reciprokou mikroduplikaci k syndromu Smithové – Magenisové.

Většina duplikací má velikost 3,7 Mb a lze je identifikovat např. komparativní genomovou hybridizací (aCGH). Přibližně u 60 % pacientů s tímto syndromem je nalezena duplikace celého úseku 3,7 Mb (Shchelochkov *et al.*, 2010).

Duplikovaná oblast chromozomu obsahuje více genů, ale vědci se domnívají, že gen nazývaný *RAI1* (kódující RAI1 protein, z angl. *reitonic acid induced protein*) je základem pro mnoho fenotypových projevů PTLs z důvodu vyšší exprese v srdci a mozku. Všechny duplikace, o kterých je známo že způsobují tento syndrom, obsahují gen *RAI1*. Tento gen je důležitý pro výrobu proteinů, které pomáhají regulovat expresi dalších genů. Většina genů, které jsou regulovány tímto proteinem *RAI1* není identifikována, ale předpokládá se, že řídí aktivitu několika genů, které jsou zapojené do cirkadiánních rytmů, tj. cyklus spánku a bdění. Duplikace zvyšují množství proteinu RAI1 narušující expresi genů, které tyto rytmy ovlivňují. To může mít za následek právě poruchy spánku, které syndrom doprovází. Role dalších genů spjatých s PTLs je předmětem studií (MedLine, 2020).

Syndrom postihuje přibližně jednoho jedince z 25 000 lidí na celém světě (Potocki *et al.*, 2007). Potocki-Lupski syndrom (PTLS) je děděn autozomálně dominantním způsobem. Většina jedinců získá duplikaci tohoto chromozomu *de novo*, ale jsou pozorovány i přenosy z rodičů na děti. Jestliže duplikace 17p11.2 identifikovaná u probanda není přítomna u jeho biologických rodičů, tak by následné těhotenství u páru mohlo být více rizikové než u běžné populace, z důvodů zárodečné nebo somatické mozaiky pro tuto aberaci. Jestliže má jeden z rodičů duplikaci 17p11.2, je riziko dědičnosti pro jejich děti 50 % (Potocki *et al.*, 2017).

Syndrom PTL je charakterizován hlavně svalovou hypotonií, vývojovým opožděním, mentální retardací a vrozenými anomáliemi (Potocki *et al.*, 2000, 2007). Může se projevit již v kojeneckém věku hypotonií, orofaryngeální dysfagií vedoucí k pomalejšímu prospívání, vrozenými srdečními vadami, hypoglykemií spojenou s nedostatkem růstového hormonu. Naopak mírně postižení jedinci se mohou manifestovat kognitivními a behaviorálními abnormalitami a jejich klinická diagnóza může být známá až v pozdějším věku, zpravidla v období dospívání (Potocki *et al.*, 2007; Treadwell-Deering *et al.*, 2010).

Poškození kognitivních funkcí je většinou mírné a je často spojováno s neuropsychologickými poruchami, které jsou vysoce heterogenní a mohou se s věkem rozvíjet a měnit. U pacientů se objevují poruchy řeči, specifické poruchy učení, poruchy pozornosti, hyperaktivita, rozvíjí se poruchy autistického spektra, jsou pozorovány poruchy

chování, problémy se spánkem a pocity úzkosti (Potocki *et al.*, 2007; Treadwell-Deering *et al.*, 2010; Magoulas *et al.*, 2013;).

Postižení jedinci se fenotypicky manifestují obličejovými dysmorfickými rysy viz Obrázek 9, a to většinou trojúhelníkovitým tvarem obličeje, zmenšenými očními štěrbinami, hypoplázií dolní čelisti, vysokým klenutým patrem v ústech, bifidní uvulou či submukózním rozštěpem patra (Potocki *et al.*, 2007; Soler-Alfonso *et al.*, 2011). Také byly pozorovány vrozené anomálie ledvin, přičemž strukturální renální anomálie byly zjištěny u méně než 10 % postižených osob. Dále se objevují multicystické dysplazie ledvin, vrozené hypoplastické ledviny a hydronefróza (Goh *et al.*, 2012). Také se může objevit snížená hladina cholesterolu v krvi a byla zaznamenána i snížená funkce štítné žlázy. Dalšími klinickými znaky jsou kostní malformace, strukturální vady srdce, zahrnující hypoplastické levé srdce, kdy levá komora není schopna zajistit dostatečný srdeční výdej. Dále také defekty septa síní, vada bikuspidální aortální chlopně a také rozšíření hrudní aorty. Kardiovaskulární anomálie jsou popisovány až u 40 % jedinců s Potocki-Lupski syndromem (Potocki *et al.*, 2007; Soler-Alfonso *et al.*, 2011).



Obrázek 9 - Pacienti s diagnostikovaným Potocki-Lupski syndromem

*pacient A – věk 40 let, pacient B – věk 7 let, pacient C – věk 3 roky, pacient D – věk 8 let; Rysy obličeje nejsou výrazně dysmorfické, přesto mají podobné znaky (široké čelo, mírně sklopené oční štěrbiny, hypoplastická křídla nosních dírek s dlouhým nosním hrotem a málo vyvinutá čelist neboli micrognathia. (Převzato a upraveno od: Zhang *et al.*, 2010, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20188345/>)*

4.2 Syndrom Smithové-Magenisové

Mikrodeleční syndrom Smithové-Magenisové (SMS) byl poprvé popsán jako geneticky podmíněné onemocnění na chromozomu 17p11.2 u dvou pacientů s rozštěpem patra a

vrozenou srdeční vadou v roce 1982, kdy ho popsaly lékařky Ann C.M. Smithová a Ruth Ellen Magenisová ve Spojených státech amerických (Smith *et al.*, 1986).

Ve většině případů je syndrom způsoben intersticiální delecí krátkého raménka chromozomu 17, a to až u 70-90 % případů. Dále je spojen v menším procentu s mutací genu *RAI1*, který je lokalizován v kritické oblasti úseku 17p11.2 (Greenberg *et al.*, 1991).

Většinu genů na chromozomu 17 se již podařilo vědcům zmapovat, ale jejich jednotlivé role v organismu nejsou dodnes prozkoumány. Domnívají se, že haploinsuficience některých genů lokalizovaných na chromozomu 17 zodpovídá za fenotypové znaky syndromu Smithové-Magenisové (Zvěřová, 2011).

Prevalence tohoto onemocnění je odhadována na 1 z 25 000 živě narozených dětí, ale odborníci se domnívají, že se nejedná o reálný odhad, jelikož se s dobou rychle rozvíjí technologie pro diagnostiku, počet pacientů s tímto syndromem se rychle zvyšuje (Shelley a Robertson, 2005).

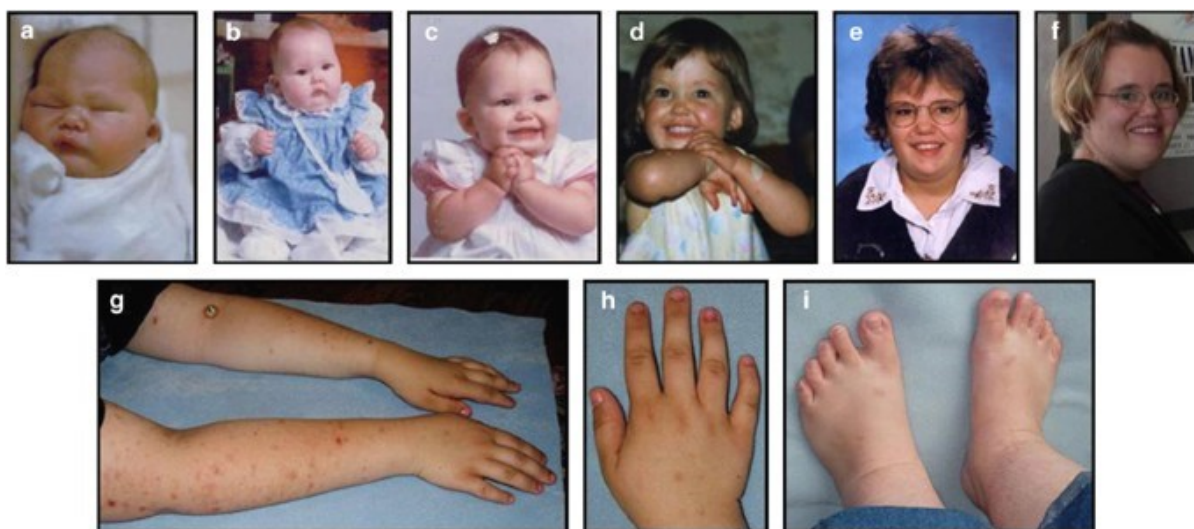
Všechny případy syndromu SMS vznikly *de novo* nealelickou homologní rekombinací během meiózy, a proto je rodinná anamnéza většinou negativní, a tedy se nejedná o zděděnou aberaci.

Klinickou manifestací tohoto syndromu je porucha cirkadiánního rytmu vyvolána extrémním fázovým posunem v sekreci melatoninu, což je příčinou poruch spánku (De Leersynder, 2013). Pozorováno je zkrácení nočního spánku, předčasné ranní probuzení a zvýšená spavost během dne.

Brachycefalie neboli široký čtvercový obličej se objevuje jako fenotypový znak až u 75 % pacientů. Mají níže posazené oči a uši, plné růžové tváře, zploštělý kořen nosu, kupidovská ústa, mírně vyplazený jazyk doprovázený sliněním a srostlé obočí. Jako společné znaky se uvádí brachydaktylie, malý vzrůst, svalová hypotonie s hyporeflexií, chraplavý hluboký hlas a trunkální obezita. Z laboratorních testů vyplývá, že mají zvýšený cholesterol v krvi a hypertriglycidémii. U některých jedinců se objevuje enuréza (Zvěřová, 2011).

Všichni pacienti mají určitý stupeň mentální retardace, kdy se IQ pohybuje mezi 35 až 78 body a většina pacientů spadá do středního rozmezí 45-55 bodů. Objevují se problémy s chováním, je zaznamenána agresivita, sebepoškozování, nízká citlivost na bolest, záchvaty vzteku, impulzivita, hyperaktivita s neudržením pozornosti. Dále se vyskytují vrozené srdeční vady postihující až 30 % jedinců, abnormality ledvin, rozštěpy patra, skolióza a je zaznamenána i nedostatečná tvorba hormonu thyroxinu. Nejčastějším problémem je již zmiňovaná porucha spánku, která se projevuje až u 65-100 % pacientů (Smith *et al.*, 1998).

Jedinci nejsou schopni regulovat své emoce, jsou často velmi impulsivní, těžce se soustředí. Dost se objevuje agresivní a destruktivní chování, kdy se pacienti koušou do rukou, kousají a trhají si nehty, bouchají hlavou do předmětů, trhají si vlasy a strkají si předměty do tělních otvorů (Zvěřová, 2011). Pacientka se syndromem Smithové-Magenisové je zobrazena na Obrázku 10.



Obrázek 10 - Věkový progres pacientky, u které byl diagnostikován Syndrom Smithové-Magenisové (a) zobrazuje typické fenotypové znaky u kojence (větší horní ret a zploštělý kořen nosu), (b) věk 4 měsíce, (c) sevření ručiček ve věku 1 roku, (d) sevření rukou u batolete ve věku 2 let, bílá skvrna na hřbetu levého předloktí, (e) stejná pacientka ve věku 13 let, (f) pacientka ve věku 20 let, (g) věk 21 let a otevřené rány a jizvy na předloktích v důsledku „skin picking“ (chorobné oštipování kůže), (h) brachydaktylie a okusování nehtů na ruce, (i) brachydaktylie na nohou a nehty poškozené trháním (Převzato a upraveno od: Elsea a Girirajan, 2008, <https://www.nature.com/articles/5202009>)

4.3 Syndrom DiGeorge

Syndrom delece 22q11, známý také jako Syndrom DiGeorge (DGS) anebo jako název CATCH 22 je považován za jeden z nejčastějších mikrodelečních syndromů u lidí.

Pojmenování CATCH 22 vychází z počátečních písmen jednotlivých fenotypových znaků a číslo 22 udává lokalizaci na chromozomu. Jedná se tedy o fenotypy jako jsou srdeční anomálie, abnormální tvář, hypoplázie thymu, rozštěp patra a hypokalcémie (Lackey a Muzio, 2020).

Vlastnosti DGS byly poprvé popsány v roce 1828, ale později v roce 1965 Dr. Angelo DiGeorge, na skupině kojenců s vrozenou absencí brzlíku a příštítných tělísek, syndrom definitivně pojmenoval (DiGeorge, 1965).

Jeho prevalence se udává na přibližně 1 živě narozené dítě z 3000 – 6000.

Klinická manifestace syndromu DiGeorge je vysoce variabilní, nejčastěji jsou přítomné srdeční vady, hypoplazie příštítných tělísek a hypoplazie či aplazie brzlíku (Botto *et al.*, 2003). Klinický obraz DGS se může pohybovat od jemných izolovaných fenotypových nálezů až po těžké multisystémové postižení (Ryan *et al.*, 1997; Devriendt *et al.*, 1998; Boudjemline *et al.*, 2001).

Na webových stránkách orpha.net se udává, že ve většině případů je syndrom způsoben delecí 3 milionů párů bází v chromozomové oblasti 22q11.2. Tato oblast je bohatá na místa s LCR a delece je způsobena nealelickou meiotickou rekombinací během spermatogeneze nebo oogeneze. V 15 % případů je vložena delece v průběhu 3 Mb DiGeorge kritické oblasti a liší se velikostí. Fenotypové znaky jsou odlišné na základě velikosti a záleží na množství zasažených genů. Ve většině delecí je zahrnut gen *TBX1*, který se podílí na vývoji srdce, příštítných tělísek, brzlíku a na vývoji struktur obličeje.

Nejčastěji jsou zaznamenány mikrodelece vznikající *de novo* v časném stádiu embryonálního vývoje, ale je známý i familiární přenos a to u 6-28 % případů (McDonald-McGinn *et al.*, 1999). Nemocný rodič má tedy 50% pravděpodobnost, že tuto delecí zdědí potomek, jelikož se jedná o autozomálně dominantní dědičnost. Pacienti s mikrodelecí 22q11 mají většinou heterozygotní konstituci chromozomů.

Genetické testy byly k dispozici až v polovině 90. let v sousedním Rakousku, a proto se předpokládá, že většina pacientů nad 18 let nemusí být správně diagnostikována. Podle rakouské statistiky by to mohlo být až 1 800 pacientů s delecí 22q11, jejichž správná diagnóza by byla důležitým krokem k cílené léčbě syndromu (Kraus *et al.*, 2018).

Mnoho kojenců má nízký počet cirkulujících T-lymfocytů se zlepšením během prvního roku života. Počty T-lymfocytů v periferní krvi byly značně sníženy, ovšem funkce lymfocytů byla z velké části zachována (Sullivan *et al.*, 1999).

Syndrom má široké spektrum projevů, kdy nejvýznamnějším rysem je hypokalcémie s hypoparathyreoidismem, tedy případy s asymptomatickou nebo později nastupující hypokalcémií (Aljabri a Bebb, 2005). Dále byly hlášeny případy, kdy vše nasvědčovalo tomu, že jedinci mají běžnou variabilní imunodeficienci, nedostatek imunoglobulinu A (IgA), nedostatek imunoglobulinu M (IgM) a zhoršenou vakcinační odpověď organismu (Gennery, 2015).

U kojenců se projevuje syndrom typickou imunodeficiencí až u 75 % pacientů, vrozenými srdečními anomáliemi (75 %), hypokalcémií v důsledku hypoparathyreózy (50 %). Mezi další příznaky patří palatální abnormality (75 %), gastrointestinální problémy jako například refluxní choroba jícnu nebo dysmotilita (30 %). Objevují se urogenitální anomálie jako

ageneze ledvin (30 %), kýla (1 %), poruchy neurální trubice, polydaktylie, anomálie páteře, obličeje, nosu, uší, očních víček, dále jsou zaznamenány různé záchvaty, Parkinsonova choroba s brzkým nástupem (30 %) a psychiatrické poruchy (60 %) (McDonald-McGinn *et al.*, 2015). Mezi psychiatrické poruchy u DGS je řazena mentální retardace, schizofrenie, porucha pozornosti spojená s hyperaktivitou, úzkostné poruchy, časté změny nálad a dětský autismus (Kraus *et al.*, 2018). Typické morfologické změny u DGS jsou zobrazeny na Obrázku 11.



Obrázek 11 - Syndrom DiGeorge

(Převzato a upraveno od: MCDONALD-MCGINN *et al.*, 2015, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27189754/>)

Pacienti s tímto syndromem jsou zde zobrazeni od dětství až po dospělost, prokazují variabilitu kraniofaciálních rysů s málo rozpoznatelnou dysmorfii (část a). Osoby s DGS mají 50% riziko recidivy v každém těhotenství, ale někteří dospělý jedinci se diagnostikují až po určení syndromu u jejich dítěte (část b) zobrazuje dceru a otce (část c) matku a syna. Kraniofaciální rysy jsou důležitými body pro diagnostiku. Asymetrický vzhled obličeje, mikrostomie (část d), mikrognatie a váčky pod očima (část e), abnormality vnějších struktur očí (část f), které mohou zahrnovat hypertelorismus (1), přivřená víčka (2) a epikantus (3). Nosní rysy zobrazuje (část g) a dále pak ušní malformace (část h).

4.4 Mikroduplikační syndrom 22q11.21

Velikost duplikací, stejně jako u delecí se pohybuje v rozmezí od 1,5 až do 6 Mb. S největší pravděpodobností přeskupení v oblasti 22q11.2 vzniká crossing-overem segmentální duplikací (SD) DNA během meiózy. Tento mechanismus může mít za následek duplikaci této oblasti anebo delecí, o které je rozepsáno výše (Stankiewicz a Lupski, 2002). Duplikace chromozomu 22q11.2 vznikají nealelickou homologní rekombinací (NAHR) mezi specifickými oblastmi LCR, a to mezi LCR22A a LCR22D (Wentzel *et al.*, 2008).

Nedávné studie poukazují na výraznější tvorbu delecí, kdy se udává, že frekvence duplikací je přibližně poloviční oproti delecím (Turner *et al.*, 2008). Tento rozdíl může zapříčinit fakt, že pacienti s tímto syndromem mají mírné fenotypové znaky viz Obrázek 12, a tak lékaři nemusí indikovat genetické vyšetření a zjistit příčinu onemocnění, mikroduplikaci na chromozomu 22.

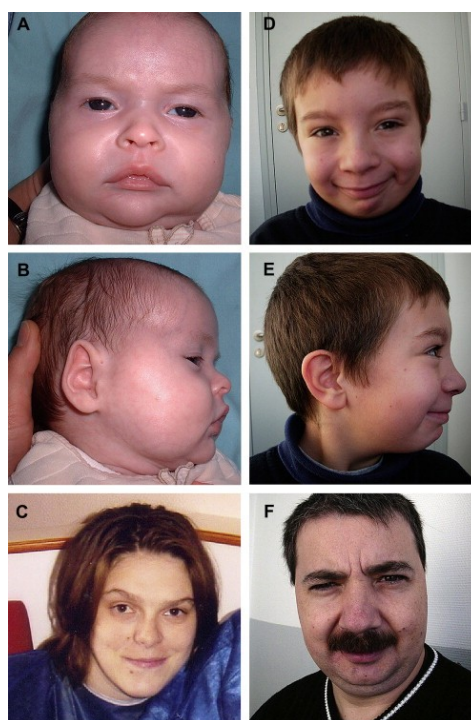
Duplikovaná oblast obvykle obsahuje 30 až 40 genů včetně genu *TBX1*, u kterého je předpokládáno, že je zodpovědný za řadu klinických projevů podobných DGS. Od prvního popisu syndromu před 18 lety je hlášeno méně než 100 případů, ale předpokládá se případů více zejména u jedinců s vývojovými abnormalitami (Firth, 2009). Studie v roce 2013 odhaduje prevalenci na 1 z 1140 živě narozených dětí (Tucker *et al.*, 2013).

Duplikace 22q11.2 může být zděděna autozomálně dominantním způsobem anebo k ní může docházet mechanismem *de novo*. Většina postižených jedinců zdělila duplikaci v této oblasti od rodiče a je prokázáno, že duplikace může být děděna až po několik generací. Potomci postižených jedinců mají 50% pravděpodobnost zdědit duplikaci na chromozomu 22 a není možné předpovědět fenotyp. Existuje i malá šance expanze do mikrotriplikace (Firth, 2009). Courtens a kolektiv (2008) popsal 63 jedinců z 35 rodin, kteří byli nositeli této duplikace. U řady pacientů v různých studiích nebyli testováni rodiče, ale v případech, kdy proběhlo testování rodičů pacientů s detekovanou duplikací 22q11.2, se zdálo, že většina těchto duplikací byla zděděna bez nebo s malými abnormalitami. Rodinný přenos byl popsán u 18 z 26 rodin, což odpovídá 70 % a je udáváno, že aberace zděděné od fenotypicky normálního rodiče jsou považovány za benigní (Wentzel *et al.*, 2008).

Výzkumy poukazují na výrazný kontrast s reciprokou mikrodelecí (mikrodeleční syndrom 22q11.2), k jejímu vzniku *de novo* dochází až u 90 % případů. Jsou známy také patogenní varianty *de novo*, kdy je duplikace přítomna u dítěte, ale není diagnostikována ani u jednoho rodiče. Jelikož není penetrance duplikace 22q11.2 úplná, tak je nutné testovat oba rodiče, aby se rozlišily případy zděděné nebo *de novo* mutace (Firth, 2009).

Klinické nálezy jsou mnohokrát nevýrazné a fenotyp je obvykle mírný, ale jsou hlášeny i případy s velmi závažnými poruchami. Nejčastěji hlášenými příznaky je mentální retardace spojená s poruchami učení, deficity výkonu paměti, ADHD a porucha řeči (97 %), opožděný psychomotorický vývoj (67 %), růstová retardace (63 %) a svalová hypotonie (43 %). Mezi časté dysmorfické rysy patří hypertelorismus (70 %), široký plochý nos (53 %), mikrognatie (52 %), velofaryngeální insuficience (48 %), dysplastické ušní boltce (45 %), epikantální záhyby (42 %), šikmé oční štěrbiny (41 %). Některé nálezy mají klinickou podobnost s mikrodelečním syndromem 22q11.2, kdy se u pacienta objevují vrozené srdeční vady, urogenitální abnormality, velofaryngeální insuficience s rozštěpem patra a poruchy zraku a sluchu (Wentzel *et al.*, 2008). U mnoha jedinců s mikroduplikací je popisován normální fenotyp a nejčastěji je detekována při testování pacientů, u kterých je podezření na syndrom DiGeorge.

Duplikace 22q11.2 bývá často spojována s agresivitou, ačkoliv korelace genotypu a fenotypu nikdy nebyl plně objasněn, jelikož existuje značná míra fenotypové variability a podrobné informace a studie o agresivitě. Mikroduplikace je spojena s významnou řadou neuropsychiatrických poruch, tj. autismus, obsedantně-kompulsivní poruchy (OCD) a schizofrenií (Olsen *et al.*, 2018).



Obrázek 12 - Obličejové rysy pacientů s diagnostikovanou mikroduplikací 22q11.2

C – matka pacienta A, F – otec pacienta D

(Převzato od: Portnoi, 2009, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19254783/>)

4.5 Syndrom Cri du chat

Syndrom Cri du chat byl poprvé popsán skupinou vědců v čele s J. Lejeune v roce 1963 (Lejeune *et al.*, 1963). Syndrom je výsledkem delece krátkého raménka chromozomu 5 (5p), kdy se velikost pohybuje od celého krátkého raménka po oblast 5p15 (Overhauser *et al.*, 1995). Velikost delece je uváděna od 5 do 40 Mb (Simmons *et al.*, 1994). V tomto úseku se vyskytuje velký počet repetitivních sekvencí, především v oblasti 5p15.2, a to způsobí nestabilitu této oblasti (Simmons *et al.*, 1997).

Přestože je syndrom Cri du chat považován za vzácnou genetickou autozomální poruchu, je jedním z nejčastějších chromozomálních syndromů u lidí. Úplně první epidemiologické studie odhadovaly prevalenci na 1 z 50 000 živě narozených dětí. Ovšem následné studie předpokládají mnohem vyšší prevalenci, a to asi 1 z 37 000 živě narozených dětí. Syndrom se ve větší míře vyskytuje u žen, ale nebyla prokázána žádná souvislost s prenatálními událostmi, věkem rodičů nebo umístěním podle pořadí narození v rodině (Niebuhr, 1978).

Většina případů delecí je způsobena *de novo*, a to až v 80 %, dále okolo 10 % případů je způsobeno rodičovskou translokací a méně než 10 % je spojeno s cytogenetickými vzácnými aberacemi (Niebuhr, 1978).

Název syndromu je spjat s nejcharakterističtějším klinickým rysem, kterým je vysoký křik a pláč, jenž je velmi podobný kočičímu mňoukání. Obvykle vymizí během prvních let života jedince. Abnormální křik či pláč je pravděpodobně způsoben anomáliemi hrtanu (malý, úzký, ve tvaru kosočtverce) a příklopky hrtanové neboli epiglottis, která může být ochablá, malá nebo hypotonická. Dále také neurologickými, strukturálními a funkčními změnami (Niebuhr, 1978).

Klinické příznaky, viz Obrázek 13, při narození jsou nízká porodní hmotnost (v průměru 2614 g), mikrocefalie (obvod hlavy v průměru 31,8 cm), kulatý obličej (83,5 %), velký nosní můstek (87,2 %), hypertelorismus (81,4 %), epikantální záhyby (90,2 %), šikmé oční štěrby (56,9 %), nízce položené uši (69,8 %), mikrognatie (96,7 %), abnormální dermatoglyfy (92 %) a již zmiňované typické výkřiky (95,9 %) (Mainardi *et al.*, 2006).

Mezi novorozenecké problémy patří asfyxie, cyanotické vady, zhoršený sací reflex a hypotonie. Během prvního roku života se projevuje těžká psychomotorická retardace. Mohou se objevit malformace ve formě srdečních, neurologických a renálních abnormalit, syndaktylie, kryptorchismus, ale u syndromu Cri du chat nejsou příliš časté. V prvních letech života jsou častěji hlášeny respirační a střevní infekce (Cerruti, 2006).

V souvislosti se syndromem Cri du chat se zmiňují problémy s chováním, jako je hyperaktivita, ztráta pozornosti, neklid, agresivita a sebepoškozování. Velmi běžným sebepoškozovacím chováním bývají údery hlavou do různých předmětů a kousání do částí svého těla. Je hlášena přecitlivělost na zvuky, opakující se pohyby, tvrdohlavost, neohrabanost, nadměrné pocity štěstí a echolálie (Cornish a Pigram, 1996). Ovšem s těmito popsány problémy se v dnešní době dá pracovat prostřednictvím různých vzdělávacích programů či vyhledáním odborné lékařské pomoci v odvětví psychologie.

Většina hlášených případů naznačuje, že jedinci s Cri du chat syndromem jsou hodní a mají obecně velmi laskavou povahu, pouze několik málo registrovaných případů vykazuje rysy autismu nebo vyhýbání se kontaktu s lidmi (Cornish a Pigram, 1996).



Obrázek 13 - Klinické rysy pacientů se syndromem Cri du chat

pacient A – 8 měsíců, pacient B – 2 roky, C – 4 roky a D – 9 let

(Převzato od: Cerruti, 2006, <https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1172-1-33>)

5 PRENATÁLNÍ A POSTNATÁLNÍ DIAGNOSTIKA

5.1 Prenatální diagnostika

Prenatální péče v současnosti zahrnuje ultrazvukovou, biochemickou a genetickou diagnostiku. Za účelem diagnostiky vrozených vad a chorob plodu jsou prováděna cytogenetická vyšetření (konvenční karyotyp), molekulárně genetická vyšetření jako je kvantitativní fluorescenční PCR (QF-PCR) pro rychlé potvrzení nebo vyloučení nejčastějších aneuploidií a přímá i nepřímá diagnostika předem známých chorob a molekulárně cytogenetická vyšetření pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Metody celogenomového screeningu SNP array a array CGH se volí jako alternativy pro zjištění genetických příčin a pro stanovení diagnózy (Bečvářová *et al.*, 2011). Často se volí kombinace různých metod, jelikož každá má své výhody, ale i limitace.

Klinická cytogenetika slouží pro identifikaci abnormalit chromozomů, aneuploidií, nevyvážených strukturálních přeskupení u plodů žen v pokročilém věku a u těch, kterým byl zjištěn abnormální nálezní ultrazvukem či screeningovými testy (Shaffer a Bui, 2007).

I přes veškerou snahu odborníků zůstává určitá část gravidit s patologickým nálezem na ultrazvuku nedagnostikována ve všech uvedených genetických vyšetřeních. Vyšetření může být velmi přínosné pro plánování budoucího těhotenství a může mít dopad na ostatní členy rodiny, kteří jsou vystaveni riziku přenosu chromozomálních aberací. Prenatální diagnostika se dělí na neinvazivní a invazivní.

5.1.1 Neinvazivní metody

Mezi neinvazivní vyšetření se řadí kombinovaný screening v I. trimestru gravidity, kdy se měří šíjové projasnění plodu (NT, nuchální translucence) a v mateřském séru se zjišťuje koncentrace lidského choriového gonadotropinu (β -hCG) a těhotenského plazmatického proteinu PAPP-A (Neagos *et al.*, 2011). Díky tomuto vyšetření se může identifikovat až 97 % plodů s trizomií 21 a další chromozomální abnormality. Jelikož se během prvního trimestru zvyšuje u trizomie 21 koncentrace β -hCG a snižuje se PAPP-A (Cicero *et al.*, 2003).

Dále se do neinvazivních metod řadí screening mateřského séra ve II. trimestru neboli triple test, kdy se stanovují tři hlavní markery v krvi matky (AFP – α -fetoprotein, uE3 – nekonjugovaný estriol a hCG – human chorionic gonadotropin). Tato kombinace dokáže detekovat přibližně 60 % případů fetálního Downova syndromu s falešnou pozitivitou okolo 4 %, kdy u většiny případů je hladina AFP a uE3 nižší a hladina hCG naopak vyšší od fyziologické hladiny (Dick, 1996).

Poté se provádí ultrazvukové vyšetření ve II. trimestru. Ultrasonografií se můžou odhalit anatomické vady plodu zahrnující vrozené srdeční vady, markery naznačující aneuploidii, jakou může být chybějící nosní kůstka, pyelektázie ledvin či echogenita střevní stěny (Neagos *et al.*, 2011).

Metody neinvazivní se provádí, aby se snížil počet žen, které podstupují invazivní prenatalní diagnostiku, a také se uvádí zvýšená možnost včasné detekce Downova syndromu (Neagos *et al.*, 2011).

Udává se, že bez prenatalní diagnostiky a selektivního ukončení gravidity by trizomie 21 představovala přibližně čtvrtinu všech případů mentálního postižení u dětí (Nielsen *et al.*, 1988).

5.1.2 Invazivní metody

Nejčastěji se analyzují vzorky choriových klků (CVS), plodové vody (amniocentéza) a krev. Tradičně se provádí analýza fetálního chromozomu pomocí klasické konvenční cytogenetické analýzy s využitím barvení kultivovaných buněk v metafázi dle Giemsa (tzv. barvení G-band). Cytogenetická analýza je považována za zlatou střední detekční metodu (Nicolini *et al.*, 2004). Zjistilo se, že přesnost v diagnostice kultivovaných buněk plodové vody karyotypizací je 99,4 – 99,8 % (NICHD, 1776) a přesnost choriových klků je 97,5 – 99,6 % (Rhoads *et al.*, 1989). Nevýhodou konvenční cytogenetiky je, že se musí prenatalní tkáň před analýzou kultivovat několik dní, tudíž získání výsledků trvá až 10 dní a chybovost kultury je okolo 1 % (Thein *et al.*, 2000).

Odběr choriových klků se provádí v prvním trimestru od 10. do 13. týdne těhotenství, zatímco amniocentéza může být prováděna od 15. týdne těhotenství (Neagos *et al.*, 2011). V některých případech je nutné diagnostiku upřesnit, např. při nerozhodném výsledku z amniocentézy nebo i v případech, kdy se žena dostavila velmi pozdě ke genetické analýze, v těchto případech se volí tzv. kordocentéza. Jedná se o postup odběru pupečnickové krve pod ultrazvukovou kontrolou pomocí tenké dlouhé jehly. Provádí se mezi 19. – 21. týdnem gravidity a kultivace buněk z fetální krve trvá 48-72 hodin.

Cytogenetická analýza sice dokáže odhalit aneuploidie a spoustu chromozomálních abnormalit (translokace, delece, duplikace, inserce), ale konvenční cytogenetická analýza plodové vody nebo CVS nedokáže spolehlivě detekovat přeskupení genomových segmentů menších než 5 Mb. Mikroskopické vyšetření chromozomů nemusí odhalit chromozomální

původ malých nadpočetných markerových chromozomů a nemusí identifikovat jemné přeskupení subtelomerových oblastí (Flint and Knight, 2003).

5.2 Postnatální diagnostika

Postnatální diagnostika je jednodušší v tom, že fenotypové znaky postiženého jedince již mohou napovídat o daném syndromu, a proto může být diagnostika a léčba cílená. K vyšetření se využívá periferní krev novorozence anebo méně často kožní fibroblasty.

Mezi indikace k vyšetření klasickou cytogenetickou postnatální diagnostikou pomocí karyotypu patří vyšetření novorozenců při podezření na syndrom podmíněný chromozomovou aberací, vyšetření karyotypu rodičů, jestliže prenatální nebo postnatální diagnostika nevyločila vrozenou chromozomální aberaci nebo se opakovaly spontánní aborty anebo pokud je přítomna nepříznivá rodinná anamnéza. Dále se přistupuje k vyšetření karyotypu u pacientů s poruchami sexuálního vývoje, u osob s nejasným nebo obojetným klinickým pohlavím. Nedílnou součástí je vyšetření u partnerů trpících neplodností a u dárců gamet. Také se ke karyotypizaci přistupuje u onkologicky nemocných pacientů, a také u získaných chromozomových aberací (Gregor *et al.*, 2008). Stanovení karyotypu bývá indikováno u předčasně narozených dětí s vykazujícími somatickými odchylkami, u pacientů s mentální nebo psychomotorickou retardací nebo u novorozenců s dysmorfii obličeje. Možná indikace je i malý vzrůst hlavně u dívek k vyloučení Turnerova syndromu (FN Brno, 2020).

Pokud klasická cytogenetika neprokáže žádnou změnu v genomu, tak se přistupuje k molekulární genetické diagnostice. V postnatální diagnostice se využívá jako první metodou volby technika array CGH. Vyšetření je možné doplnit o metodu FISH a MLPA.

6 MOLEKULÁRNÍ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA

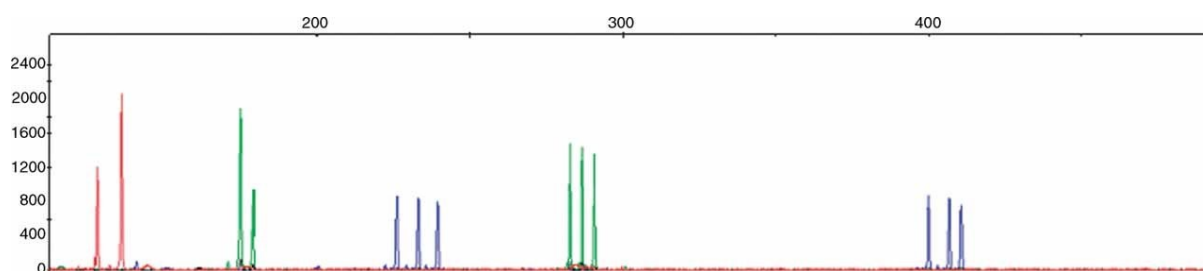
6.1 Kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce (QF – PCR)

Kvantitativní fluorescenční PCR metoda je označována jako rychlá detekce a diagnóza rychlé aneuploidie. Je založena hlavně na rychlé detekci, přibližně do 24-48 hodin, běžných aneuploidií jako je trizomie 13, 18 a 21, triploidie a aneuploidie pohlavních chromozomů, které tvoří až 80 % klinicky významných chromozomálních abnormalit, které jsou diagnostikovány v prenatálním období (Neagos *et al.*, 2011). Technika vychází z toho, že se namnoží ve velkém množství specifický úsek DNA. QF-PCR se volí jako první volba u pacientek, kterým vyšel pozitivní biochemický screening, následně se v prenatální diagnostice pokračuje metodou array CGH, o které je rozepsáno v další kapitole. Díky této rychlé diagnostice je možné detekovat aberace (mikrodelece a mikroduplikace) již v brzké době. Při negativním výsledku chromozomových aneuploidií je zbytkové riziko výskytu chromozomových poruch velmi nízké.

Na chromozomech 13, 18, 21, X a Y jsou úseky, které obsahují vysoce polymorfní sekvence mikrosatelitní DNA, a to krátké tandemové repetice STR (Short Tandem Repeats). Tyto sekvence jsou amplifikovány pomocí fluorescenčních primerů a PCR v multiplexním testu, následně probíhá automatizovaná analýza intenzity fluorescence alel v genetickém analyzátoru (Cirigliano *et al.*, 2004). Většinou se k testování využívají 3-4 STR pro každý chromozom, aby se zabránilo falešným výsledkům (Shaffer a Bui, 2007).

Očekává se, že normální heterozygotní jedinci budou vykazovat dvě oblasti píků v poměru 1:1 pro každý analyzovaný chromozom, zatímco trizomie se objevuje jako extra pík nebo jako vrchol poměru píků 2:1 mezi dvěma oblastmi (Adinolfi *et al.*, 1997). Relativní množství každé STR alely je vyhodnocováno pomocí výpočtu poměrů ploch píků nebo výšek vrcholů, lze také využít obě možnosti. Elektroforetogram z metody QF-PCR je na Obrázku číslo 14.

Výhodou této metody je, že je schopna generovat spolehlivé výsledky i z velmi malých objemů vzorků, nejčastěji se využívá 0,5 – 1 ml plodové vody. K analýze se zpracovávají plodová voda, choriové klky, fetální krev, postnatální krev i fetální tkáň. Další výhodou je, že je mnohem levnější a dokáže zpracovat větší počet vzorků než metoda FISH. To je také hlavním důvodem, proč QF-PCR pomalu nahrazuje metodu FISH hlavně v evropských genetických laboratořích (Shaffer a Bui, 2007).



Obrázek 14 - Elektroforetogram z metody QF-PCR ze vzorku plodové vody pomocí soupravy Aneufast™

Zobrazuje Dialelickou trizomii s poměry píků 1:2 a 2:1 (levá strana) a trizomii s poměry píků 1:1:1 (pravá strana) v tomto případě v souladu s trizomií 21 (Převzato od: Shaffer a Bui, 2007, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ajmg.c.30114>).

6.2 Komparativní genomová hybridizace (CGH)

Komparativní genomová hybridizace na biočipu (aCGH) se řadí mezi molekulárně cytogenetické vyšetření celého genomu. Indikací pro toto vyšetření je podezření na vrozenou vývojovou vadu s genetickou aberací u pacientů, u kterých se nepodařilo jinou klasickou cytogenetickou nebo molekulárně genetickou metodou prokázat žádnou změnu v genomu. Metoda se využívá jak v prenatalní diagnostice, tak i v postnatální diagnostice hraje důležitou roli. Může se využít i u preimplantační diagnostiky v rámci asistované reprodukce.

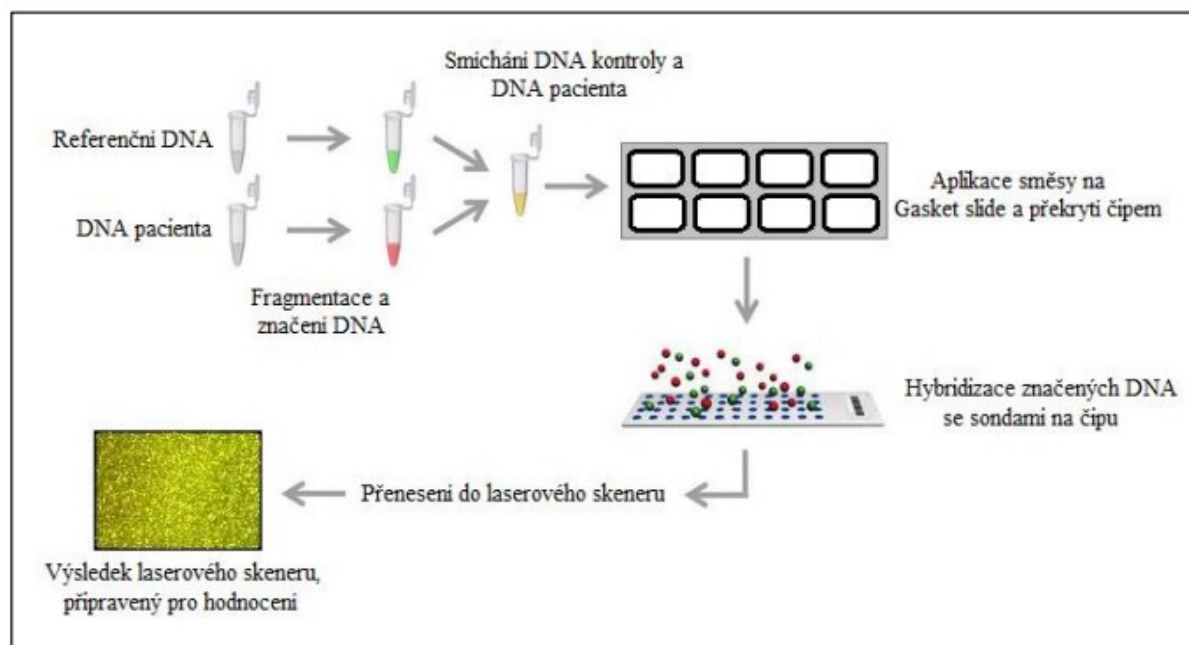
Komparativní genomová hybridizace využívá pro analýzu podložní sklíčko s nahybridizovanými malými segmenty DNA (Lucito *et al.*, 2003). Tyto mikročipy jsou vytvořeny usazením a imobilizací malého množství DNA, také se jim nazývá sondy, které jsou ukotveny na pevném nosiči. Jednotlivé sondy se liší velikostí od oligonukleotidů vyrobených tak, aby představovaly oblasti 25-85 párů bází, až po genomické klony neboli BAC sondy, které jsou velké 80 000 – 200 000 párů bází (Shaffer a Bui, 2007). Jelikož jsou sondy využívané v této metodě o několik řádů menší než metafázové chromozomy využívané v původní CGH, tak je teoretické rozlišení array CGH mnohem vyšší. Úroveň rozlišení se určuje na základě velikosti sondy a genomické vzdálenosti mezi DNA sondami. Když je mikročip se sondami vybranými z oblastí napříč genomem, které jsou od sebe vzdáleny 1 Mb, tak nebude schopen detekovat změny v počtu kopií intervenující sekvence (Theisen, 2008)

Princip metody spočívá v tom, že se nejprve DNA extrahuje ze vzorku (krev, buňky plodu). Testovaná DNA od pacienta je označena fluorescenčním barvivem určité barvy a DNA z referenčního vzorku je označena odlišnou barvou. Dvě genomové DNA jsou následně smíchány dohromady v poměru 1:1 a naneseny na microarray destičku označovanou jako *Gasket slide*, následuje překrytí destičky čipem. DNA, která je nanášena na čip je

denaturována. Po aplikaci na sklíčko hybridizují značené DNA se sondami na čipu kompeticí. Poté se využívají digitální zobrazovací systémy k zachycení a kvantifikaci relativních intenzit fluorescence značených sond DNA, které hybridizovaly. Poměr fluorescence vyšetřovaného vzorku a hybridizačních signálů reference se stanovuje v různých pozicích napříč genomu. Poskytne informace o relativním počtu kopií sekvencí ve vyšetřovaném genomu ve srovnání s referenčním genomem (Sчена *et al.*, 1995; DeRisi *et al.*, 1996; Shaffer a Bui, 2007). Celý postup je zobrazen na Obrázku 15.

Důležitá je následná správná interpretace dat, zda CNV je benigní nebo patogenní. K zařazení CNV do skupin pomáhají databáze, které obsahují velké množství variant, se kterými lze výsledek porovnat (Weise *et al.*, 2012).

Mezi výhody aCGH patří, že dokáže současně detekovat aneuploidie, delece, duplikace anebo amplifikace jakéhokoliv lokusu. Metoda je schopna detekovat submikroskopické chromozomální abnormality u jedinců s idiopatickou mentální retardací a dalšími vrozenými vadami. Studie prokazují, že aCGH má až 10-20% míru detekce chromozomálních abnormalit u dětí s mentální retardací či se zpožděným vývojem s vrozenými anomáliemi nebo bez nich. Dále se udává, že pouze 3–5 % z těchto abnormalit by bylo detekováno jinými metodami (Sfaffer a Bui 2007).



Obrázek 15 - Schéma znázorňující postup metody array-CGH od počátku do výsledného zobrazení pomocí skeneru (Převzato od: Šlégrová, 2014, <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/67769>)

6.3 Metoda Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA)

Technologie MLPA (z angl. *Multiplex Ligation dependent Probe Amplification*) neboli mnohonásobná amplifikace závislá na ligaci sond se využívá k detekci abnormálního počtu kopií až 60 různých sekvencí genomové DNA a je schopna určit změny počtu kopií (Schouten *et al.*, 2002). Byla vyvinuta firmou MRC-Holland, která na svých webových stránkách (<https://www.mrcholland.com/>) udává, že mezi aplikace této metody patří detekce duplikací a delecí exonu, detekce různých lidských genů, detekce trizomií, jako je například Downův syndrom a zabývá se charakteristikou chromozomálních aberací v buněčných liniích a nádorů. Dále detekuje SNP, mutace a detekuje změny methylace DNA.

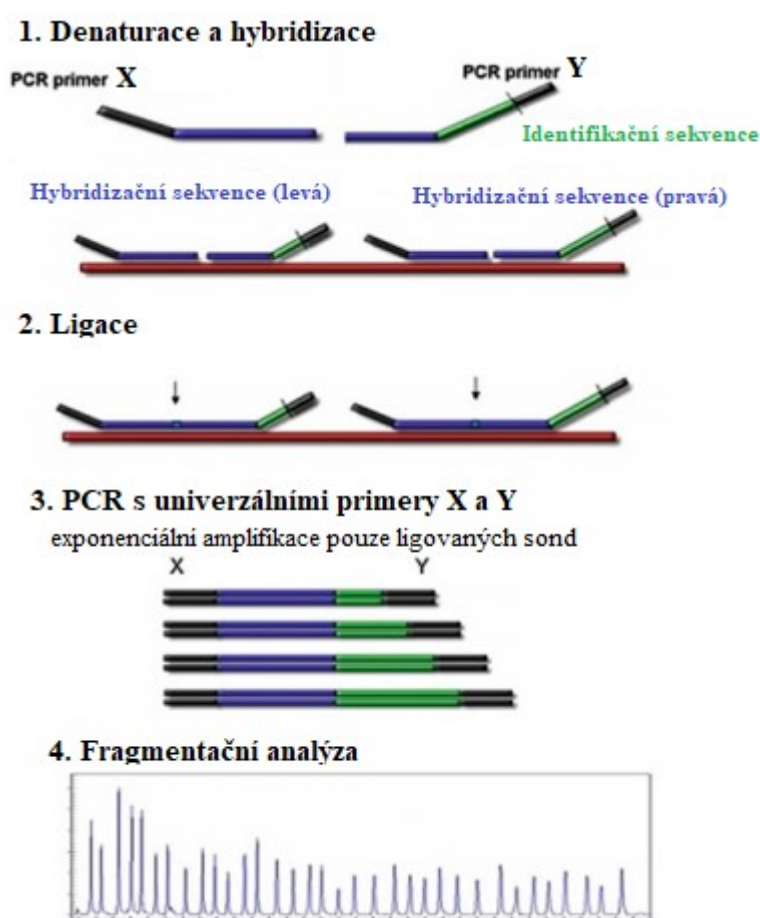
Výhodou metody je její rychlost a výsledky lze získat do 24 hodin. Dále vyžaduje jen standardní vybavení, které je přítomno ve většině laboratoří pro diagnostiku DNA.

Metoda MLPA se liší od normální multiplexní PCR tím, že se neamplifikují cílové sekvence DNA vzorku, ale MLPA sondy hybridizují na sekvence vyšetřované DNA. Každá sonda se ze začátku skládá ze dvou oligonukleotidů. Ty jsou sestrojeny tak, aby hybridizovaly bezprostředně vedle sebe na cílové sekvence DNA. Následně po hybridizaci mohou být dva oligonukleotidy ligovány specifickým ligázovým enzymem. Tím se vytvoří jen jediná molekula. Podmínkou ale je, aby obě sondy byly dokonale hybridizovány s přílehlými místy vzorku DNA. Konce molekuly obsahují dvě sekvence, které jsou rozpoznány párem primerů PCR. Dále jsou po ligaci všechny sondy amplifikovány jedním párem primerů PCR, z nichž je jeden fluorescenčně značen. Jelikož mají sondy jedinečnou délku, tak mají výsledné produkty amplifikované MLPA velikost v rozmezí od 90 do 500 nukleotidů a lze je vizualizovat kapilární elektroforézou. Sondy MLPA, které nenajdou cílovou sekvenci, nelze amplifikovat pomocí PCR a není nutné je z reakce odstraňovat (Schouten *et al.*, 2019).

Celý proces MLPA reakce (viz Obrázek 16) se může shrnout do 4 hlavních kroků:

1. 20-500 ng DNA je denaturováno zahřátím na 98 °C po dobu 5 minut. Následně se přidají MLPA sondy a ty se nechají hybridizovat po dobu 16 hodin při 60 °C v termocykleru, který má vyhřívané víko.
2. Přidá se ředící pufr spolu s ligázovým enzymem a reakce se nechá probíhat 15 minut při 54 °C
3. Ligáza se inaktivuje zahřátím na 98 °C a přidají se PCR primery, dNTP a polymeráza. V tomto kroku je zahájena PCR amplifikace ligačních produktů.
4. Produkty amplifikace jsou analyzovány kapilární nebo gelovou elektroforézou (Schouten *et al.*, 2002).

Hlavním bodem při využití tohoto genetického testu pro molekulární diagnostiku delecí a duplikací genů je interpretace výsledků. Homozygotní nebo hemizygotní delece jsou jasně doloženy absencí specifických vrcholů pro cílový gen v přítomnosti normální amplifikace kontrolních sond. Naopak heterozygotní delece, duplikace a CNV se zobrazují v odlišné výšce anebo jako oblasti relativních vrcholů. Interpretace těchto výsledků se dá zpochybnit přítomností rozdílných výkonností PCR reakce mezi různými sondami a odlišnostmi mezi biologickými vzorky. Díky tomu se vyvinuli různé možnosti pro analýzu surových dat MLPA, které umožní jejich správné vyhodnocení. Mezi nejpoužívanější softwary se řadí Coffalyser a program založený na Excelu (Jankowski *et al.*, 2008; Cáceres *et al.*, 2011).



Obrázek 16 – Princip metody MLPA

(Převzato a upraveno podle: Schouten *et al.*, 2019, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30506197/>)

6.4 Metoda Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) se využívá, pokud cytogenetické metody neodhalí žádnou poruchu v karyotypu nebo vždy v případě verifikace výsledku cytogenetického vyšetření nebo na základě indikace klinického genetika.

Zavedením *in situ* hybridizace vstoupila cytogenetika do molekulární éry. Jedná se o postup, který umožňuje vědcům lokalizovat polohy specifických sekvencí DNA na chromozomech. První experimenty *in situ* se uskutečnily v roce 1969, kdy od té doby bylo vyvinuto mnoho variant postupů metody a citlivost detekce se mnohonásobně zvýšila (Gall a Pardue, 1969). Dnes se nejčastěji využívá detekce sekvencí DNA fluorescenčními sondami, tedy metoda FISH. Metody založené na hybridizaci *in situ* jsou závislé na stabilitě dvojité šroubovice DNA (O'Connor, 2008).

Technologie FISH má hlavní tři výhody, mezi které se řadí vysoká citlivost a specifita při rozpoznávání cílových sekvencí DNA nebo RNA, přímá aplikace na metafázové chromozomy a interfázní jádra a vizualizace hybridizačních signálů na úrovni jednotlivých buněk. Tato metoda zvýšila analytické rozlišení konvenčního karyotypu (G-bandu) na genovou úroveň a umožnila rychlou detekci numerických a strukturálních chromozomových abnormalit (Klinger *et al.*, 1992; Ried *et al.*, 1992).

U metody FISH lze rozlišit 4 typy, nejčastěji DNA, sond. Využívají se centromerické sondy, které se váží na centromeru, diagnostikují se jimi hlavně chromozomální změny nebo chromozomy neznámého původu. Lokus specifické sondy jsou zaměřené na konkrétní oblasti genu a hlavní využití mají v detekci mikrodelecí. Subtelomerické sondy mají vazbu na konce chromozomů (telomery) a celomalovací sondy, které obarví celý chromozom a analyzují se translokace a malé nadpočetné chromozomy neznámého původu. Celomalovací sondy se využívají v metafázních chromozomech (Cui *et al.*, 2016).

Mezi základní kroky patří denaturace a fixace DNA. Při denaturaci dojde k rozvolnění vláken DNA sondy i vzorku a vznikne DNA s jedním vláknem. Dalším krokem je ochlazení, kdy se sondy specificky váží na vyšetřované místo. Tímto dochází k hybridizaci fluorescenčně značené sondy na vlákno vyšetřované DNA. Pomocí fluorescenčního mikroskopu dochází k vizualizaci fluorescenčních signálů sondy na vyšetřované DNA.

FISH lze provádět přímo na interfázních jádrech a tím se eliminuje časová náročnost s využíváním buněčných kultur, které se musí nejprve kultivovat (Cui *et al.*, 2016).

Metoda FISH je velmi důležitou metodou v prenatální diagnostice, kdy se panelem Multiplex FISH s odlišně značenými sondami detekují běžné aneuploidie, které zahrnují delece

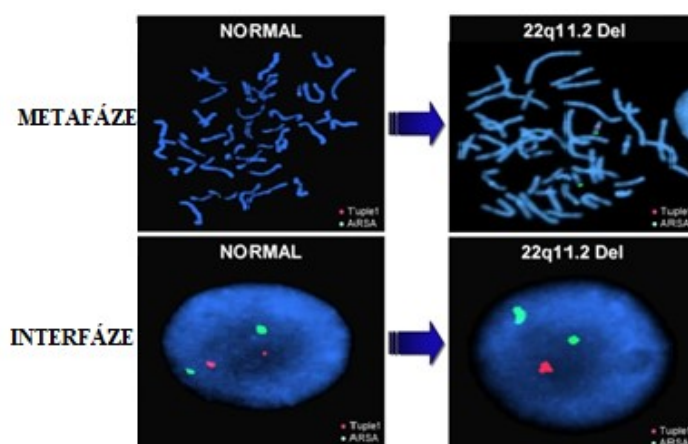
nebo duplikace chromozomů X, Y, 13, 18 a 21 (Ried *et al.*, 1992; Ward *et al.*, 1993). Lze ji využít i v postnatální laboratorní diagnostice. Indikací pro vyšetření u těhotných žen je pokročilý věk ženy, abnormální nález na ultrazvuku nebo abnormální screening mateřského séra. Gravidní ženy mají zvýšené riziko přenosu numerických a strukturálních chromozomálních abnormalit až o 4-30 %, kdy až 84 % numerických abnormalit bylo detekováno panelem Multiplex FISH. Dalších 16 % byly strukturální abnormality, které vyžadují další cytogenetickou analýzu s využitím mikročipů (Li *et al.*, 2011).

Nevýhodou metody je, že v prenatalní analýze byly zaznamenány falešně pozitivní nebo negativní výsledky a také kontaminace mateřských buněk. Z tohoto důvodu by se neměl brát zřetel pouze na výsledky z FISH diagnostiky. Ta se spíše v dnešní době využívá jako doplňkový test pro rychlou detekci běžných aneuploidií (Cui *et al.*, 2016).

Zjistilo se, že rozšířený panel FISH, pro detekci chromozomů X, Y, 18, 13, 21, 15, 16, 22, je schopen detekovat všechny polyploidie, až 84 % aneuploidií a 69 % vícečetných aneuploidií způsobující těhotenské ztráty (Zhou *et al.*, 2016).

Mezi onemocnění, které lze diagnostikovat pomocí metody FISH se řadí Prader-Williho syndrom, Angelmanův syndrom, deleční syndrom 22q13, Cri-du-Chat syndrom, Downův syndrom, chronické myeloidní leukémie a akutní lymfoblastické leukémie. Dále se mohou analyzovat chromozomy 21, X a Y, čímž se mohou diagnostikovat oligozoospermie jedinci (Shakoori, 2017). V případě srdečních anomálií v prenatalní diagnostice byl pomocí metody FISH detekován DiGeorgeův syndrom viz obrázek 17 (Cui *et al.*, 2016).

Metoda FISH se řadí mezi nejrychleji rozšiřující se techniku v diagnostice nádorových onemocnění. Také se využívá k detekci infekčních mikrobů a parazitů v lidských krevních buňkách, příkladem je malárie (Cui *et al.*, 2016).



Obrázek 17 – Diagnostika syndromu DiGeorge metodou FISH

(Převzato od: Tonelli *et al.*, 2007, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18053182/>)

7 LÉČBA

Doposud neexistuje žádná kauzální léčba, která by dokázala onemocnění zastavit, či úplně vyléčit osoby postižené postnatálními CNV. Mezi jediné řešení patří léčba jednotlivých symptomů onemocnění, tj. symptomatická léčba a klade se důraz na včasnou prevenci. Mezi symptomatickou léčbu se zařazují různé chirurgické korekce srdečních či obličejových vad. Naopak mentální retardace a různé poruchy chování se musí řešit individuálně s ohledem na jedinečnost a schopnost spolupráce pacienta. V tomto případě se využívá odborná pedagogická péče. U pacientů s omezeným pohybem se doporučuje včasná rehabilitace. Logopedická péče se provádí u pacientů se špatnými komunikačními schopnostmi. Transplantace kostní dřeně s periferními lymfocyty je možná jako terapie u pacientů se syndromem DiGeorge.

Například u syndromu Smithové Magenisové se využívá kombinace dávky melatoninu, která se užívá večer a ranní dávka beta-1 adrenergního blokátoru acebutololu, který tlumí denní produkci melatoninu. Tímto se upravuje spánkový rytmus, který je u tohoto syndromu specifický. Pacienti udávají zlepšení spánku a zmírnění výkyv nálad. Dále se využívá medikace valproátu a lithia, která se využívá pro stabilitu nálady pacientů, antipsychotika a lék fluoxetin jako inhibitor zpětného vychytávání serotoninu (Příhodová *et al.*, 2008).

Do popředí se v dnešní době zařazuje genová terapie, kdy největší část zkoumání je u nádorových onemocnění, u monogenních chorob, infekčních onemocnění a kardiovaskulárních chorob. Jedná se o to, že se vpraví genetický materiál do buněk pacienta. Jde o nahrazení či opravu mutovaného, nefunkčního či chybějícího genu. Využívá se celá řada metod pro vpravení cizího genu do buněk, ale nejčastěji pro přenos DNA se využívají modifikované viry (Kohoutová, 2012). Nevýhodou genové terapie je, že doposud nejsou zcela objasněny důsledky genových terapií, a to i případné následky v budoucích generacích. Tento fakt i dokládá, že je povoleno manipulovat pouze s buňkami somatického genomu nikoliv však s germinálními buňkami. Genová terapie je využívána především na úrovni experimentální léčby, jelikož s sebou nese spoustu etických problémů a otázek ohledně změny genetické informace u lidí.

Velké posunutí v léčbě je v posledních letech u onemocnění svalové muskulární atrofie (SMA), které bylo dříve kauzálně neléčitelné. K léčbě se využívá léčivá látka Nusinersen (obchodním názvem Spinraza), který je schválen Evropskou unií od roku 2017. Nusinersen upravuje přepis genetické informace a tím zvyšuje tvorbu chybějícího proteinu. Prvním pracovištěm v České republice, které zavedlo léčbu, byla Klinika dětské neurologie 2. LF UK a FN Motol (Haberlová, 2020). Dalším pokrokem v léčbě byla registrace léku Risdiplam v USA v srpnu v roce 2020 a jeho výhodou je perorální podání (Dhillon, 2020).

8 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se věnuje variabilitě počtu kopií segmentů DNA a jejich následné diagnostice v prenatálním a postnatálním období. Studiemi se prokázalo, že CNV mají velký podíl na variabilitě lidského genomu. Díky rychlému vývoji diagnostických metod založených na molekulární úrovni jsou již dnes vědci schopni říct, kde se CNV nachází v genomu a jakými mechanismy tyto segmenty DNA vznikají.

Hlavní problematikou je posouzení, zda zjištěné CNV je benigní, či patogenní varianta, jelikož se může v lidském genomu objevovat i fyziologicky. Některé mohou způsobovat závažná genetická onemocnění. Variabilita v počtu kopií může způsobovat i mentální retardaci, schizofrenii či autoimunitní onemocnění.

V práci je popsán mechanismus delece a duplikace chromozomových segmentů, které jsou hlavním zdrojem variant mezi lidmi a mají vliv na odlišnou genovou expresi. Popsány jsou také tři hlavní mechanismy vzniku CNV, které zodpovídají za přestavby v lidském genomu. Následně je probrána dědičnost a *de novo* mutace, která způsobuje závažná genetická onemocnění. Otázkou zůstává, zda se mutace vyskytují ve fázi embryogeneze či somaticky. Je popsáno pět klinických syndromů, jejich etiopatogeneze a fenotypické projevy.

V závěru práce je rozebrána prenatální a postnatální diagnostika, která je velmi důležitá pro včasnou indikaci onemocnění. Velký důraz je kladen na molekulárně genetickou diagnostiku CNV variant, jelikož je pro odhalení syndromologické jednotky rozhodující. Jedná se o klíčový nástroj v oblasti prenatální péče, z důvodu časného odhalení poškozeného plodu. Pokud se objeví aberace i u rodičů, klinický genetik většinou nabídne vhodné řešení pro prevenci daného onemocnění v následných generacích. Využívají se metody preimplantační genetické diagnostiky, kterými se zabraňuje přenosu choroby do další generace bez nutnosti prenatální diagnostiky a rizika následného ukončení nefyziologického těhotenství. I přes veškerou snahu odborníků zůstává část gravidit s patologickým ultrazvukovým nálezem nedagnostikována v molekulárně genetických analýzách. Proto i v tomto odvětví se vědci i dostupná technologie neustále posouvají.

Poslední část je věnována léčbě, která je bohužel jen v podobě zmírňování symptomů a dopadu daného onemocnění. Velký důraz se klade na včasně zahájenou prevenci. Do popředí se dostává genová terapie, která může být v budoucnosti klíčovou léčbou. Dnes se jedná o experimentální léčbu, která přináší hlavně naději pro rodiče těžce postižených dětí. Dokládá to lék Nusinersen, který je určen k léčbě spinální muskulární atrofie.

Předmětem studií a výzkumů zůstává stále i samotná variabilita počtu kopií segmentů DNA. S novými technologiemi se stále vyvíjí metody pro detekci a přibývají detekované CNV varianty humánního genomu v národních a světových databázích.

9 POUŽITÁ LITERATURA

ADINOLFI, Matteo, Barbara PERTL a John SHERLOCK. *Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. Prenat Diagn.* 1997 Dec;17(13):1299-311. PMID: 9509547. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9509547/>

ALJABRI, K. S. a R. M. BEBB, 2005. *DiGeorge's syndrome presenting as hypocalcemia in an adult. Annals of Saudi Medicine* [online]. **25**(2), 173-174 [cit. 2021-04-11]. ISSN 0256-4947. Dostupné z: 10.5144/0256-4947.2005.173

ALMAL, Suhani H. a Harish PADH, 2012. *Implications of gene copy-number variation in health and diseases. Journal of Human Genetics* [online]. **57**(1), 6-13 [cit. 2021-7-1]. ISSN 1434-5161. Dostupné z: 10.1038/jhg.2011.108

ALTSHULER, David, Victor J. POLLARA, Chris R. COWLES, William J. VAN ETTEN, Jennifer BALDWIN, Lauren LINTON a Eric S. LANDER. *An SNP map of the human genome generated by reduced representation shotgun sequencing. Nature* [online]. 2000, **407**(6803), 513-516 [cit. 2021-03-24]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: 10.1038/35035083

BAILEY, Jeffrey A. *Recent Segmental Duplications in the Human Genome. Science* [online]. **297**(5583), 1003-1007 [cit. 2021-03-09]. ISSN 00368075. Dostupné z: 10.1126/science.1072047

BASTA, Marina a Ashish M. PANDYA, 2021. *Genetics, X-Linked Inheritance. StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32491315/>

BEČVÁŘOVÁ, Věra , Martin HYNEK, Martina PUTZOVÁ a Inna Soldatová 2011. *Aplikace metody SNP array v prenatální diagnostice. Česká gynekologie. Česká lékařská společnost, J. EV. Purkyně, 76*(4), 261-267. Dostupné z: <file:///C:/Users/42072/Downloads/2011-CesGyn-SNParrayBecvetal.pdf>

BERÁNEK, Martin: *Molekulární genetika pro bioanalytiku*, Charles University in Prague, Karolinum Press, 2016, str. 28-40, ISBN 8024632241, 9788024632247

BÖHMER, Daniel a Vanda REPISKÁ. *Genetic aspects of the normal and pathological traits in humans*. Bratislava: Asklepios, 2009. ISBN 978-80-7167-139-8, Dostupné z:

https://www.fmed.uniba.sk/fileadmin/lf/sluzby/akademicka_kniznica/PDF/Elektronicke_knihy_LF_UK/Genetic_Aspects_of_Normal_and_Pathologic_Traits_in_Humans.pdf

BOONE, Philip M., Carlos A. BACINO, Chad A. SHAW, Patricia A. ENG, Patricia M. Hixson, Amber N. PURSLEY, Sung-Hae L. KANG, Yaping YANG, Joanna WISZNIEWSKA, Beata A. NOWAKOWSKA, Daniela del GAUDIO, Zhilian XIA, Gayle SIMPSON-PATEL, LaDonna L. IMMKEN, James B. GIBSON, Anne C.-H. TSAI, Jennifer A. BOWERS, Tyler E. REIMSCHISEL, Christian P. SCHAAF, Lorraine POTOCKI, Fernandro SCAGLIA, Tomasz GAMBIN, Maciej SYKULSKI, Magdalena BARTNIK, Katarzyna DERWINSKA, Barbara WISNIOWIECKA-KOWALNIK, Seema R. LALANI, Frank J. PROBST, Weimin BI, Arthur L. BEAUDET, Ankita PATEL, James R. LUPSKI, Sau Wai CHEUNG a Pawel STANKIEWICZ, 2010 . *Detection of clinically relevant exonic copy-number changes by array CGH. Human Mutation* [online]. **31**(12), 1326-1342 [cit. 2021-7-7]. ISSN 10597794. Dostupné z: 10.1002/humu.21360

BOTTO, Lorenzo D., Kristin MAY, Paul M. FERNHOFF, Adolfo CORREA, Karlene COLEMAN, Sonja A. RASSMUSEN, Robert K. MERRITT, Leslie A O'LEARY, Lee-Yang WONG, E. Marsha ELIXSON, Willia, T. MAHLE a Robert M. CAMPBELL, 2003. *A Population-Based Study of the 22q11.2 Deletion: Phenotype, Incidence, and Contribution to Major Birth Defects in the Population. PEDIATRICS* [online]. **112**(1), 101-107 [cit. 2021-04-12]. ISSN 0031-4005. Dostupné z: 10.1542/peds.112.1.101

BOUDJEMLINE, Younes, Laurent FERMONT, Jérôme LE BIDOIS, Stanislas LYONNET, Daniel SIDI a Damien BONNET, 2001. *Prevalence of 22q11 deletion in fetuses with conotruncal cardiac defects: A 6-year prospective study. The Journal of Pediatrics* [online]. **138**(4), 520-524 [cit. 2021-7-5]. ISSN 00223476. Dostupné z: 10.1067/mpd.2001.112174

BRIDGES, Calvin B. *The BAR "GENE" a duplication. Science* [online]. 1936, **83**(2148), 210-211 [cit. 2021-03-09]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: 10.1126/science.83.2148.210

BURMA, Sandeep, Benjamin P.C. CHEN a David J. CHEN. *Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. DNA Repair* [online]. 2006, **5**(9-10), 1042-1048 [cit. 2021-03-10]. ISSN 15687864. Dostupné z: 10.1016/j.dnarep.2006.05.026

CÁCERES, Alejandro, Lluís ARMENGOL, Sergi VILLATORO a Juan R GONZÁLEZ, 2011. *MLPstats: An R GUI package for the integrated analysis of copy number alterations*

using MLPA data. *BMC Bioinformatics* [online]. **12**(1) [cit. 2021-5-24]. ISSN 1471-2105. Dostupné z: 10.1186/1471-2105-12-147

CERRUTI MAINARDI, Paola., 2006. *Cri du Chat syndrome*. *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. **1**, 33 [cit. 2021-04-15]. ISSN 17501172. Dostupné z: 10.1186/1750-1172-1-33

CICERO, Simona, Renu BINDRA, Georgios REMBOUSKOS, Kevin SPENCER a Kypros H. NICOLAIDES, 2003. *Integrated ultrasound and biochemical screening for trisomy 21 using fetal nuchal translucency, absent fetal nasal bone, free β -hCG and PAPP-A at 11 to 14 weeks*. *Prenatal Diagnosis* [online]. **23**(4), 306-310 [cit. 2021-04-20]. ISSN 0197-3851. Dostupné z: 10.1002/pd.588

COOPER, Gregory M., Deborah A. NICKERSON a Evan E. EICHLER. *Mutational and selective effects on copy-number variants in the human genome*. *Nature Genetics* [online]. 2007, **39**(S7), S22-S29 [cit. 2021-03-28]. ISSN 1061-4036. Dostupné z: 10.1038/ng2054

CORNISH, K. M. a J. PIGRAM, 1996. *Developmental and behavioural characteristics of cri du chat syndrome*. *Archives of Disease in Childhood* [online]. **75**(5), 448-450 [cit. 2021-04-15]. ISSN 0003-9888. Dostupné z: 10.1136/adc.75.5.448

COUGHLIN, Curtis R., Gunter H. SCHARER a Tamim H. SHAIKH. *Clinical impact of copy number variation analysis using high-resolution microarray technologies: advantages, limitations and concerns*. *Genome Medicine* [online]. 2012, **4**(10) [cit. 2021-03-07]. ISSN 1756-994X. Dostupné z: 10.1186/gm381

COURTENS, Winnie, Inge SCHRAMME a Annick LARIDON, 2008. *Microduplication 22q11.2: A benign polymorphism or a syndrome with a very large clinical variability and reduced penetrance? Report of two families*. *American Journal of Medical Genetics Part A* [online]. **146A**(6), 758-763 [cit. 2021-04-14]. ISSN 15524825. Dostupné z: 10.1002/ajmg.a.31910

CUI, Chenghua, Wei SHU a Peining LI, 2016. *Fluorescence In situ Hybridization: Cell-Based Genetic Diagnostic and Research Applications*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. **4** [cit. 2021-5-25]. ISSN 2296-634X. Dostupné z: 10.3389/fcell.2016.00089

DE LEERSNYDER, H. *Smith–Magenis syndrome*. *Pediatric Neurology Part I* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 295-296 [cit. 2021-04-07]. Handbook of Clinical Neurology. ISBN 9780444528919. Dostupné z: 10.1016/B978-0-444-52891-9.00034-8

DE SMITH, Adam J., R.G. WALTERS, P. FROGUEL a A.I. BLAKEMORE. *Human genes involved in copy number variation: mechanisms of origin, functional effects and implications for disease. Cytogenetic and Genome Research* [online]. 2009, **123**(1-4), 17-26 [cit. 2021-03-24]. ISSN 1424-8581. Dostupné z: 10.1159/000184688

DE SMITH, Adam J., Anya TSALENKO, Nick SAMPAS, Alicia SCHEFFER, N. Alice YAMADA, Peter TSANG, Amir BEN-DOR, Zohar YAKHINI, Richard J. Ellis, Laurakay BRUHN, Stephen LADERMAN, Philippe FROGUEL, Alexandra I.F. BLAKEMORE. *Array CGH analysis of copy number variation identifies 1284 new genes variant in healthy white males: implications for association studies of complex diseases. Human Molecular Genetics* [online]. 2007, **16**(23), 2783-2794 [cit. 2021-03-28]. ISSN 1460-2083. Dostupné z: 10.1093/hmg/ddm208

DERISI, Joseph, Lolita PENLAND, Patrick O. BROWN, Michael L. BITTNER, Paul S. MELTZER, Michael RAY, Yidong CHEN, Yan A. SU a Jeffrey M. TRENT. *Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer, 1996. Nature Genetics* [online]. **14**(4), 457-460 [cit. 2021-5-20]. ISSN 1061-4036. Dostupné z: 10.1038/ng1296-457

DEVRIENDT, K., J. P. FRYNS, G. MORTIER, M. N. VAN THIENEN a K. KEYMOLEN, 1998. *The annual incidence of DiGeorge/velocardiofacial syndrome. Journal of Medical Genetics* [online]. **35**(9), 789-790 [cit. 2021-7-5]. ISSN 1468-6244. Dostupné z: 10.1136/jmg.35.9.789-a

DEWEERDT, Sarah E., Barbara J. CULLITON a Mary S. GIBBS, 2003. *What's a genome? Genome News Network* [online]. Rockville, Maryland: J. Craig Venter Institute [cit. 2021-5-19]. Dostupné z: http://www.genomenewsnetwork.org/resources/whats_a_genome/Chp1_1_1.shtml

DHILLON, Sohita, 2020. *Risdiplam: First Approval. Drugs* [online]. **80**(17), 1853-1858 [cit. 2021-7-5]. ISSN 0012-6667. Dostupné z: 10.1007/s40265-020-01410-z

DICK P.T. *Periodic health examination, 1996 update: 1. Prenatal screening for and diagnosis of Down syndrome. Canadian Task Force on the Periodic Health Examination. CMAJ.* **154**(4), 465-479 [cit. 2021-04-20]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8630836/>

DIGEROGE A. *Discussion on a new concept of the cellular immunology. J. Pediatr.* 1965; 67:907-908.

ELSEA, Sarah H. a Santhosh GIRIRAJAN. *Smith–Magenis syndrome*. *European Journal of Human Genetics* [online]. 2008, **16**(4), 412-421 [cit. 2021-04-06]. ISSN 1018-4813. Dostupné z: [10.1038/sj.ejhg.5202009](https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5202009)

FEUK, Lars, Andrew R. CARSON a Stephen W. SCHERER. *Structural variation in the human genome*. *Nature Reviews Genetics* [online]. 2006, **7**(2), 85-97 [cit. 2021-03-07]. ISSN 1471-0056. Dostupné z: [10.1038/nrg1767](https://doi.org/10.1038/nrg1767)

FIRTH Helen V. *22q11.2 Duplication – RETIRED CHAPTER, FOR HISTORICAL REFERENCE ONLY*. 2009 In: Adam M.P., Ardinger H.H., Pagon R.A., editors. GeneReviews [online]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3823/>

FLINT, Jonathan a Samantha KNIGHT, 2003. *The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation*. *Current Opinion in Genetics & Development* [online]. **13**(3), 310-316 [cit. 2021-5-27]. ISSN 0959437X. Dostupné z: [10.1016/S0959-437X\(03\)00049-2](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(03)00049-2)

FREEMAN J.L., Perry G.H., Feuk L., Redon R., McCarroll S.A., Altshuler D.M., Aburatani H., Jones K.W., Tyler-Smith C., Hurles M.E., Carter N.P., Scherer S.W., Lee C.: *Copy number variation: new insights in genome diversity*. *Genome Res* 2006, **16**:949-961.

FRIDOVICH-KEIL, Judith L.; "*Human Genome Project*". *Encyclopedia Britannica*, 2020, Dostupné z: <https://www.britannica.com/event/Human-Genome-Project>

GALL, Joseph G. a Mary Lou PARDUE, 1969. *Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **63**(2), 378-383 [cit. 2021-5-25]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: [10.1073/pnas.63.2.378](https://doi.org/10.1073/pnas.63.2.378)

GANDALOVIČOVÁ Jana: *Genetika a kardiologie na prahu nového tisíciletí*, *Interní medicína pro praxi*, 2001, **3**(12): 579-582, Dostupné z: https://www.internimedica.cz/artkey/int-200112-0011_Genetika_a_kardiologie_na_prahu_noveho_tisicileti.php

GAYON, Jean. *From Mendel to epigenetics: History of genetics*. *Comptes Rendus Biologies* [online]. 2016, **339**(7-8), 225-230 [cit. 2021-03-23]. ISSN 16310691. Dostupné z: [10.1016/j.crv.2016.05.009](https://doi.org/10.1016/j.crv.2016.05.009)

GENNERY, A. R., 2015. *Antibody deficiency and autoimmunity in 22q11.2 deletion syndrome*. *Archives of Disease in Childhood* [online]. **86**(6), 422-425 [cit. 2021-04-10]. ISSN 00039888. Dostupné z: 10.1136/adc.86.6.422

GOH, Elaine Suk-Ying, Irene C. PEREZ, Cesar P. CANALES, Phillip RUIZ, Ron AGATEP, Grace YOON, David CHITAYAT, Yigal DROR, Mary SHAGO, Sharan GOOBIE, Michael SGRO, Kaatherina WALZ a Roberto MENDOZA-LONDONO. *Definition of a critical genetic interval related to kidney abnormalities in the Potocki-Lupski syndrome*. *American Journal of Medical Genetics Part A* [online]. 2012, **158A**(7), 1579-1588 [cit. 2021-04-06]. ISSN 15524825. Dostupné z: 10.1002/ajmg.a.35399

GOLDBERGOVÁ Pávková M., Anna VAŠKŮ, Lýdie Izakovičová HOLLÁ, Renata GAILLYOVÁ. *Genetika v zubním lékařství*. Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů: Portál Lékařské fakulty Masarykovy univerzity, 2007, [online], [cit. 19. 03. 2021]. Dostupný z: <https://portal.med.muni.cz/clanek-632-genetika-v-zubnim-lekarstvi.html>. ISSN 1801-6103.

GREENBERG, Frank, Vito GUZZETTA, Roberto Montes de OCA-LUNA, R. Ellen MAGENIS, A.C. M. SMITH, Sarah F. RICHTER, Ikuko KONDO, William B. DOBYNS, Pragna I. PATEL a James R. LUPSKI. *Molecular analysis of the Smith-Magenis syndrome: a possible contiguous-gene syndrome associated with del(17)(p11.2)*. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 1207–1218; Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1686451/>

GREGOR, Vladimír, Jiří HORÁČEK a Antonín ŠÍPEK, 2008. *Základní typy dědičnosti. Vrozené vývojové vady* [online]. Praha: MUDr. Antonín Šípek, CSc. et al. [cit. 2021-5-24]. Dostupné z: <http://www.vrozene-vady.cz/genetika/index.php?co=dedicnost>

GRIFFITHS, A. J. F., J. H. MILLER a D. T. SUZUKI, 2000. *An Introduction to Genetic Analysis.: Deletions*. 7. New York: W. H. Freeman. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21904/>

GU, Wenli, Feng ZHANG a James R. LUPSKI. *Mechanisms for human genomic rearrangements*. *PathoGenetics* [online]. 2008, **1**(1) [cit. 2021-03-08]. ISSN 1755-8417. Dostupné z: 10.1186/1755-8417-1-4

HABERLOVÁ, Jana, 2020. *Léčba spinální svalové atrofie*. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 2. LF UK a FN Motol, Praha, **83**(116), 21-23. Dostupné z: 10.48095/cccsnn20202S21

HASTINGS, P. J., James R. LUPSKI, Susan M. ROSENBERG a Grzegorz IRA. *Mechanisms of change in gene copy number. Nature Reviews Genetics* [online]. 2009, **10**(8), 551-564 [cit. 2021-03-09]. ISSN 1471-0056. Dostupné z: 10.1038/nrg2593

HOEIJMAKERS, Jan H. J. *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature* [online]. 2001, **411**(6835), 366-374 [cit. 2021-03-10]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: 10.1038/35077232

CHANG, Howard H. Y., Nicholas R. PANNUNZIO, Noritaka ADACHI a Michael R. LIEBER. *Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2017, **18**(8), 495-506 [cit. 2021-03-09]. ISSN 1471-0072. Dostupné z: 10.1038/nrm.2017.48

CHIAL, Heidi, *DNA sequencing technologies key to the Human Genome Project, 2008, Nature Education* 1(1):219, Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-sequencing-technologies-key-to-the-human-828/>

IAFRATE, A. John, Lars FEUK, Miguel N. RIVERA, Marc L. LISTEWNIK, Patricia K DONAHOE, Ying QI, Stephen W SCHERER a Charles LEE. *Detection of large-scale variation in the human genome. Nature Genetics* [online]. 2004, **36**(9), 949-951 [cit. 2021-03-09]. ISSN 1061-4036. Dostupné z: 10.1038/ng1416

International Human Genome Sequencing Consortium, *Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature* **431**, 931-945, 2004, Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/content/Finishing-the-euchromatic-sequence-of-the-human-13698/>

JANKOWSKI, Stephane, Erica CURRIE-FRASER, Licen XU a Jordy COFFA, 2008. *Multiplex ligation-dependent probe amplification analysis on capillary electrophoresis instruments for a rapid gene copy number study. Journal of biomolecular techniques: JBT*, 19(4), 238–243. Dostupné Z. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2567135/>

KLINGER, Katherine, Greg LANDES, Donna SHOOK, Robert HARVEY, Linda LOPEZ, Pat LOCKE, Terry LERNER, Rapin OSATHANONDH, Benjamin LEVERONE, Timothy HOUSEAL, Karen PAVELKA a William DACKOWSKI, 1992. *Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization (FISH). American journal of human genetics* [online]. 51(1), 55–65 [cit. 2021-5-25]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1682861/>

KOČÁREK, Eduard. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 1. vyd. Praha: Scientia, 2004. Biologie pro gymnázia. ISBN 8071833266

KOHOUTOVÁ, Milada, 2012. *Lékařská biologie a genetika*. Praha: Univerzita Karlova. Str. 182-183, ISBN 978-80-246-1873-9.

KRAUS, Christoph, Thomas VANICEK, Ana WEIDENAUER, Tav KHANAQA, Mara STAMENKOVIC, Rupert LANZENBERGER, Matthäus WILLEIT a Siegfried KASPER, 2018. *DiGeorge syndrome*. *Wiener klinische Wochenschrift* [online]. **130**(7-8), 283-287 [cit. 2021-04-11]. ISSN 0043-5325. Dostupné z: 10.1007/s00508-018-1335-y

Laboratoř postnatální cytogenetiky, 2020. *Fakultní nemocnice Brno* [online]. Brno [cit. 2021-5-27]. Dostupné z: <https://www.fnbrno.cz/detska-nemocnice/oddeleni-lekarske-genetiky/laborator-postnatalni-cytogenetiky/t3132>

LACKEY, Alexandra E. a Maria Rozaria MUZIO, 2021. *DiGeorge Syndrome*. *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls [cit. 2021-7-7]. PMID: 31747205. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31747205/>

LEE, Jennifer A., Claudia M.B. CARVALHO a James R. LUPSKI. *A DNA Replication Mechanism for Generating Nonrecurrent Rearrangements Associated with Genomic Disorders*. *Cell* [online]. 2007, **131**(7), 1235-1247 [cit. 2021-03-10]. ISSN 00928674. Dostupné z: 10.1016/j.cell.2007.11.037

LEJEUNE J., Lafourcade J., DE GROUCHY J., BERGER R., GAUTIER M., SALMON C., 1964. *D'el'etion partielle du bras court du chromosome 5. Individualisation d'un nouvel 'etat morbide*. *Sem. Hop. Paris* ^ 18:1069–79

LEJEUNE J., LAFOURCADE J., BERGER R., VIALATTE J., BOESWILLWALD M., SERINGE P., TURPIN R., 1963. *Trois cas de d'el'etion partielle du bras court d'un chromosome 5 (3 cases of partial deletion of the short arm of a 5 chromosome)*. *C R Hebd Seances Acad Sci. Nov 18;257:3098-102*. French. PMID: 14095841; Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14095841/>

LI, Jian, Tielin YANG, Liang WANG, Han YAN, Yinping ZHANG, Yan GUO, Feng PAN, Zhixin ZHANG, Yumei PENG, Qi ZHOU, Lina HE, Xuezhen ZHU, Hongyi DENG, Shawn LEVY, Christopher J. PAPASIAN, Betty M. DREES, James J. HAMILTON, Robert R. RECKER, Jing CHENG a Hong-Wen DENG. *Whole Genome Distribution and Ethnic*

Differentiation of Copy Number Variation in Caucasian and Asian Populations. PLoS ONE [online]. 2009, **4**(11) [cit. 2021-03-24]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: 10.1371/journal.pone.0007958

LI, Peining, Pawel POMIANOWSKI, Miriam S. DIMAIO, Joanne R. FLORIO, Michael R. ROSSI, Bixia XIANG, Fang XU, Hui YANG, Qian GENG, Jiansheng XIE a Maurice J. MAHONEY, 2011. *Genomic characterization of prenatally detected chromosomal structural abnormalities using oligonucleotide array comparative genomic hybridization. American Journal of Medical Genetics Part A* [online]. **155**(7), 1605-1615 [cit. 2021-5-25]. ISSN 15524825. Dostupné z: 10.1002/ajmg.a.34043

LIEBER, Michael R. *The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. Annual Review of Biochemistry* [online]. 2010, **79**(1), 181-211 [cit. 2021-03-10]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: 10.1146/annurev.biochem.052308.093131

LODISH, H., A. BERK a S. L. ZIPURSKY, 2000. *Molecular Cell Biology: Mutations: Types and Causes* [online]. 4. New York: W. H. Freeman [cit. 2021-7-6]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21578/>

LUPSKI James R.: *Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. Trends Genet.* 1998, **14**: 417-422. Dostupné z: 10.1016/S0168-9525(98)01555-8.

LUPSKI, James R. a Pawel STANKIEWICZ, 2005. *Genomic Disorders: Molecular Mechanisms for Rearrangements and Conveyed Phenotypes. PLoS Genetics* [online]. **1**(6) [cit. 2021-5-18]. ISSN 1553-7404. Dostupné z: 10.1371/journal.pgen.0010049

LUPSKI, James R., 2007. *Genomic rearrangements and sporadic disease. Nature Genetics* [online]. **39**(S7), S43-S47 [cit. 2021-5-18]. ISSN 1061-4036. Dostupné z: 10.1038/ng2084

MAGOULAS, Pilar L., Pengfei LIU, Violet GELOWANI, Claudia SOLER-ALFONSO, Emma C. KIVUVA, James R. LUPSKI a Lorraine POTOCKI. *Inherited dup(17)(p11.2p11.2): Expanding the phenotype of the Potocki-Lupski syndrome. American Journal of Medical Genetics Part A* [online]. 2013, **164**(2), 500-504 [cit. 2021-04-06]. ISSN 15524825. Dostupné z: 10.1002/ajmg.a.36287

MAINARDI, Paola Cerruti, Guido PASTORE, Chiara CASTRONOVO, Michela GODI, Andrea GUALA, Stefania TAMIAZZO, Sandro PROVERA, Mauro PIERLUIGI a Franca Dagna BRICARELLI, 2006. *The natural history of Cri du Chat Syndrome. A report from the Italian Register. European Journal of Medical Genetics* [online]. **49**(5), 363-383 [cit. 2021-04-15]. ISSN 17697212. Dostupné z: [10.1016/j.ejmg.2005.12.004](https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2005.12.004)

MALU, Shruti, Vidyasagar MALSHETTY, Dailia FRANCIS a Patricia CORTES. *Role of non-homologous end joining in V(D)J recombination. Immunologic Research* [online]. 2012, **54**(1-3), 233-246 [cit. 2021-03-10]. ISSN 0257-277X. Dostupné z: [10.1007/s12026-012-8329-z](https://doi.org/10.1007/s12026-012-8329-z)

McDONALD-McGinn Donna M., KIRSCHNER R., GOLDMUNTZ E., SULLIVAN K., EICHER P., GERDES M., MOSS E., SOLOT C., WANG P., JACOBS I., HANDLER S., KNIGHTLY C., HEHER K., WILSON M., MING J.E., GRACE K., DRISCOLL D., PASQUARIELLO P., RANDALL P., LAROSSA D., EMANUEL B.S. a ZACKAI E.H. *The Philadelphia story: the 22q11.2 deletion: report on 250 patients. Genet Couns.* 1999;10(1):11-24. PMID: 10191425. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10191425/>

MCDONALD-MCGINN, Donna M., Kathleen E. SULLIVAN, Bruno MARINO, Nicole PHILIP, Ann SWILLEN, Jacob A.S. VORSTMAN, Elaine H. ZACKAI, Beverly S. EMANUEL, Joris R. VERMEESCH, Bernice E. MORROW, Peter J. Scambler a Anne S. BASSET, 2015. *22q11.2 deletion syndrome. Nature Reviews Disease Primers* [online]. **1**(1) [cit. 2021-04-12]. ISSN 2056-676X. Dostupné z: [10.1038/nrdp.2015.71](https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.71)

MEDLINEPLUS [Online]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), *Potocki-Lupski Syndrome*, 2020, [cit. 2021-04-5]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/condition/potocki-lupski-syndrome/>

MUSILOVÁ, Jana a David ŠMAJS: *Jak naše geny podmiňují citlivost k infekcím a jak infekční choroby mění náš genom*, Universitas, 2010, str. 16, ISSN 12128139, Dostupné z: <https://journals.muni.cz/universitas/article/view/1519/1147>

National Center for Biotechnology Information, 1998. *Genes and Disease: Chromosome Map* [online], 1998. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US) [cit. 2021-7-6]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22266/>

NEAGOS, Daniela, Ruxandra CRETU, Roxana Corina SFETEA a Laurentiu Camil BOHILTEA. *The importance of screening and prenatal diagnosis in the identification of the*

numerical chromosomal abnormalities. *Maedica (Bucur)*. 2011, **6**(3):179-184. PMID: 22368694. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3282538/>

NGUYEN, Duc-Quang, Caleb WEBBER, Chris P. PONTING a Barbara TRASK, 2006. *Bias of Selection on Human Copy-Number Variants*. *PLoS Genetics* [online]. **2**(2) [cit. 2021-5-31]. ISSN 1553-7404. Dostupné z: 10.1371/journal.pgen.0020020

NICOLINI, Umberto, Faustina LALATTA, Federica NATACCI, Cristina CURCIO a The-Hung BUI, 2004. *The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: time for reconsideration*. *Human Reproduction Update* [online]. **10**(6), 541-548 [cit. 2021-04-21]. ISSN 1460-2369. Dostupné z: 10.1093/humupd/dmh046

NIEBUHR, E., 1978. *The cri du chat syndrome*. *Human Genetics* [online]. **44**(3), 227-275 [cit. 2021-04-15]. ISSN 0340-6717. Dostupné z: 10.1007/BF00394291

NIELSEN, Kim Gjerum, Hanne POULSEN, Margareta MIKKELSEN a Elke STEUBER, 1988. *Multiple recurrence of trisomy 21 Down syndrome*. *Human Genetics* [online]. **78**(1), 103-105 [cit. 2021-5-27]. ISSN 0340-6717. Dostupné z: 10.1007/BF00291249

NICHD, *Midtrimester Amniocentesis for Prenatal Diagnosis*, 1976. *JAMA* [online]. **236**(13) [cit. 2021-04-20]. ISSN 0098-7484. Dostupné z: 10.1001/jama.1976.03270140023016

O'CONNOR, Clare, 2008. *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)*. *Nature* [online]. Boston College: Nature Education 1(1):171 [cit. 2021-5-25]. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/fluorescence-in-situ-hybridization-fish-327/>

OLSEN, Line, Thomas SPARSØ, Shantel M. WEINSHEIMER, Marcelo B. Q. DOS SANTOS, Wiktor MAZIN, Anders ROSENGREN, Xabier C. SANCHEZ, Louise K. HOEFFDING, Henriette SCHMOCK, Marie BAEKVAD-HANSEN, Jonas BYBJERG-GRAUHOLM, Mark J. DALY, Benjamin M. NEALE, Marianne G. PEDERSEN, Esben AGERBO, Ole MORS, Anders BORGLUM, Merete N. DRMEDSC a Thomas WERGE , 2018. *Prevalence of rearrangements in the 22q11.2 region and population-based risk of neuropsychiatric and developmental disorders in a Danish population: a case-cohort study*. *The Lancet Psychiatry* [online]. **5**(7), 573-580 [cit. 2021-04-13]. ISSN 22150366. Dostupné z: 10.1016/S2215-0366(18)30168-8

OVERHAUSER, Joan, Xlaogu HUANG, Meryl GERSH, Wesley WILSON, Jeanette MCMAHON, Ulla BENGTTSSON, Katherine ROJAS, Marvin MEYER a John J. WASMUTH,

1994. *Molecular and phenotypic mapping of the short arm of chromosome 5: sublocalization of the critical region for the cri-du-chat syndrome*. *Human Molecular Genetics* [online]. **3**(2), 247-252 [cit. 2021-04-15]. ISSN 0964-6906. Dostupné z: 10.1093/hmg/3.2.247

PANOUTSOPOULOU, Kalliope a Eleanor WHEELER. *Key Concepts in Genetic Epidemiology*. EVANGELOU, Evangelos, ed. *Genetic Epidemiology* [online]. New York, NY: Springer New York, 2018, 2018-06-07, s. 7-24 [cit. 2021-03-23]. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-4939-7867-0. Dostupné z: 10.1007/978-1-4939-7868-7_2

PINKEL, Daniel, Richard SEGRAVES, Damir SUDAR, Steven CLARK, Ian POOLE, David KOWBEL, Colin COLLINS, Wen-Lin KUO, Chira CHEN, Ye ZHAI, Shanaz H. DAIRKEE, Britt-marie LJUNG, Joe W. GRAY a Donna G. ALBERTSON. *High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays*. *Nature Genetics* [online]. 1998, **20**(2), 207-211 [cit. 2021-03-24]. ISSN 1061-4036. Dostupné z: 10.1038/2524

PORTNOÏ, Marie-France, 2009. *Microduplication 22q11.2: A new chromosomal syndrome*. *European Journal of Medical Genetics* [online]. **52**(2-3), 88-93 [cit. 2021-04-13]. ISSN 17697212. Dostupné z: 10.1016/j.ejmg.2009.02.008

POSPÍŠILOVÁ Šárka, Boris TICHÝ, Jiří MAYER.: *Sekvenování lidského genomu – technologie nové generace aneb budeme rutinně sekvenovat lidské genomy?*, *Časopis lékařů českých*, 2009, str. 296-301. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/casopis-lekaru-ceskych/2009-7/download?hl=cs>

POTOCKI, L, J NEIRA-FRESNEDA a B YUAN, 2017. Potocki-Lupski Syndrome. *GeneReviews®*. Seattle (WA): University of Washington. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK447920/>

POTOCKI, Lorraine, Ken-Shiung CHEN, Sung-Sup PARK, Doreen E. OSTERHOLM, Marjorie A. WITHERS, Virginia KIMONIS, Anne M. SUMMERS, Wendy S. MESCHINO, Kwame ANYANE-YEBOA, Catherine D. KASHORK, Lisa G. SHAFFER a James R. LUPSKI. *Molecular mechanism for duplication 17p11.2— the homologous recombination reciprocal of the Smith-Magenis microdeletion*. *Nature Genetics* [online]. 2000, **24**(1), 84-87 [cit. 2021-04-06]. ISSN 1061-4036. Dostupné z: 10.1038/71743

POTOCKI, Lorraine, Weimin B.I., Diane TREADWELL-DEERING, Claudia M.B. CARVALHO, Anna EIFERT, Ellen M. FRIEDMAN, Daniel GLAZE, Kevin KRULL, Jeniffer A. LEE, Richard A. LEWIS, Roberto MENDOZA-LONDONO, Patricia ROBBINS-

FURMAN, Chad SHAW, Xin SHI, George WEISSENBURGER, Marjore WITHERS, Svetlana A. YATSENKO, Elaine H. ZACKAI, Paweł STANKIEWICZ a James R. LUPSKI. *Characterization of Potocki-Lupski Syndrome (dup(17)(p11.2p11.2)) and Delineation of a Dosage-Sensitive Critical Interval That Can Convey an Autism Phenotype. The American Journal of Human Genetics* [online]. 2007, **80**(4), 633-649 [cit. 2021-04-01]. ISSN 00029297. Dostupné z: 10.1086/512864

PŘÍHODOVÁ, Iva, D. KEMLINK, K. VESELÁ, R. MIHALOVÁ a S. NEVŠÍMALOVÁ. *Syndrom Smithové-Magenisové: kazuistika. Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. 2008, **71/104**(2), 223-227 [cit. 2021-5-25]. ISSN 1802-4041. Dostupné z: <https://www.csnn.eu/casopisy/ceska-slovenska-neurologie/2008-2/syndrom-smithove-magenisove-kazuistika-37846>

REDON, Richard, Shumpei ISHIKAWA a Karen R. FITCH. *Global variation in copy number in the human genome. Nature* [online]. 2006, **444**(7118), 444-454 [cit. 2021-03-09]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: 10.1038/nature05329

REICH, David E., Stephen F. SCHAFFNER, Mark J. DALY, Gil MCVEAN, James C. MULLIKIM, John M. HIGGINS, Daniesl J. RICHTER, Eric S. LANDER a David ALTSHULER, 2002. *Human genome sequence variation and the influence of gene history, mutation and recombination. Nature Genetics* [online]. **32**(1), 135-142 [cit. 2021-7-5]. ISSN 1061-4036. Dostupné z: 10.1038/ng947

RHOADS, George G., Laird G. JACKSON, Sarah E. SCHLESSELMAN, Felix F. de la CRUZ, Robert J. Desnick, Mitchell S. GOLBUS, David H. LEDBETTER, Herbert A. LUBS, Mauricie J. MAHONEY, Eugene PERGAMENT, Joe L. SIMPSON, Robert J. CARPENTER, Sherman ELIAS, Norman A. GINSBERG, James D. GOLDBERG, John C. HOBBS, Lauren LYNCH, Patricia H. SHIONO, Ronald J. WAPNER a Julia M. ZACHARY, 1989. *The Safety and Efficacy of Chorionic Villus Sampling for Early Prenatal Diagnosis of Cytogenetic Abnormalities. New England Journal of Medicine* [online]. **320**(10), 609-617 [cit. 2021-04-20]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: 10.1056/NEJM198903093201001

RIED, Thomas, Greg LANDES, William DACKOWSKI, Katherine KLINGER a David C. WARD, 1992. *Multicolor fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of probe sets for chromosomes 13, 18, 21, X and Y in uncultured amniotic fluid cells. Human Molecular Genetics* [online]. **1**(5), 307-313 [cit. 2021-5-25]. ISSN 0964-6906. Dostupné z: 10.1093/hmg/1.5.307

RYAN, A. K., J. A. GOODSHIP, D. I. WILSON, N. PHILIP, A. LEVY, H. SEIDEL, S. SCHUFFENHAUER, H. OECHSLER, B. BELOHRADSKY, M. PRIEUR, A. AURIAS, F.L. RAYMOND, J. CLAYTON-SMITH, E. HATCHWELL, C. McKEOWN, F.A BEEMER, B. DALLAPICCOLA, G. NOVELLI, J.A. HURST, J. IGNATIUS, A.J. GREEN, R.M. WINTER, L. BRUTEON a P.J. SCAMBLER , 1997. *Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. Journal of Medical Genetics* [online]. **34**(10), 798-804 [cit. 2021-7-5]. ISSN 1468-6244. Dostupné z: 10.1136/jmg.34.10.798

SAWICKI, Mark P., Ghassan SAMARA, Michael HURWITZ a Edward PASSARO. *Human Genome Project. The American Journal of Surgery* [online]. 1993, **165**(2), 258-264 [cit. 2021-03-30]. ISSN 00029610. Dostupné z: 10.1016/S0002-9610(05)80522-7

SHAFFER, Lisa G. a James R. LUPSKI. *Molecular Mechanisms for Constitutional Chromosomal Rearrangements in Humans. Annual Review of Genetics* [online]. 2000, **34**(1), 297-329 [cit. 2021-03-09]. ISSN 0066-4197. Dostupné z: 10.1146/annurev.genet.34.1.297

SHAFFER, Lisa G. a The-Hung BUI, 2007. *Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* [online]. **145C**(1), 87-98 [cit. 2021-04-20]. ISSN 15524868. Dostupné z: 10.1002/ajmg.c.30114

SHAFFER, Lisa G., Bassem A. BEJJANI, Beth TORCHIA, Susan KIRKPATRICK, Justine COPPINGER a Blake C. BALLIF, 2007. *The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: Cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* [online]. **145C**(4), 335-345 [cit. 2021-5-20]. ISSN 15524868. Dostupné z: 10.1002/ajmg.c.30152

SHAIKH, Tamim H. *Copy Number Variation Disorders. Current Genetic Medicine Reports* [online]. 2017, **5**(4), 183-190 [cit. 2021-03-06]. ISSN 2167-4876. Dostupné z: 10.1007/s40142-017-0129-2

SHAKOORI, Abdul Rauf, 2017. *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Its Applications*. BHAT, Tariq Ahmad a Aijaz Ahmad WANI, ed. *Chromosome Structure and Aberrations* [online]. New Delhi: Springer India, 2017-02-10, s. 343-367 [cit. 2021-5-24]. ISBN 978-81-322-3671-9. Dostupné z: 10.1007/978-81-322-3673-3_16

SHELLEY, Bhaskara P. a Mary M. ROBERTSON. *The Neuropsychiatry and Multisystem Features of the Smith-Magenis Syndrome: A Review. The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* [online]. 2005, **17**(1), 91-97 [cit. 2021-04-07]. ISSN 0895-0172. Dostupné z: 10.1176/jnp.17.1.91

SHCHELOCHKOV, Oleg A., S.W. CHEUNG a Jamer R. LUPSKI. *Genomic and clinical characteristics of microduplications in chromosome 17. American Journal of Medical Genetics Part A* [online]. 2010, **152A**(5), 1101-1110 [cit. 2021-04-06]. ISSN 15524825. Dostupné z: 10.1002/ajmg.a.33248

SCHENA, Mark, Dari SHALON, Ronald W. DAVIS a Patrick O. BROWN, 1995. *Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. Science* [online]. **270**(5235), 467-470 [cit. 2021-5-20]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: 10.1126/science.270.5235.467

SCHERER, Stephen W., Charles LEE, Ewan BIRNEY, David M. ALTSHULER, Evan E. EICHLER, Nigel P. CARTER, Matthew E. HURLES a Lars FEUK. *Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. Nature Genetics* [online]. 2007, **39**(S7), S7-S15 [cit. 2021-03-06]. ISSN 1061-4036. Dostupné z: 10.1038/ng2093

SCHOUTEN, Jan P., Cathal J. MCELGUNN, Raymond WAAIJER, Danny ZWIJNENBURG, Filip DIEPVENS a Gerard PALS, 2002. *Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Research* [online]. **30**(12), 57e-57 [cit. 2021-5-23]. ISSN 13624962. Dostupné z: 10.1093/nar/gnf056

SCHOUTEN, Jan, Paul VAN VUGHT a Robert-Jan GALJAARD, 2019. *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) for Prenatal Diagnosis of Common Aneuploidies*. LEVY, Brynn, ed. *Prenatal Diagnosis* [online]. New York, NY: Springer New York, 2019-12-01, s. 161-170 [cit. 2021-5-20]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-8887-7. Dostupné z: 10.1007/978-1-4939-8889-1_11

SIMMONS, Anrew D., Joan OVERHAUSER a Michael LOVETT, 1997. *Isolation of cDNAs from the Cri-du-chat critical region by direct screening of a chromosome 5-specific cDNA library. Genome Research* [online]. **7**(2), 118-127 [cit. 2021-04-16]. ISSN 1088-9051. Dostupné z: 10.1101/gr.7.2.118

SIMMONS, Andrew D., Sheryl A. GOODART, Teresa D. GALLARDO, Joan OVERHAUSER a Michael LOVETT, 1995. *Five novel genes from the cri-du-chat critical region isolated by direct selection. Human Molecular Genetics* [online]. **4**(2), 295-302 [cit. 2021-04-15]. ISSN 0964-6906. Dostupné z: 10.1093/hmg/4.2.295

SMITH, Ann C., E. DYKENS a F. GREENBERG, 1998. *Sleep disturbance in Smith-Magenis syndrome (del 17 p11.2). Am J Med Genet.* **81**(2), 186-191. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9613860/>

SMITH, Ann C. M., Loris MCGAVRAN, Jeannie ROBINSON, Gail WALDSTEIN, Jean MACFARLANE, Jon ZONONA, Jacob REISS, Martin LAHR, Lelad ALLEN, Ellen MAGENIS, John M. OPITZ a James F. REYNOLDS. *Interstitial deletion of (17)(p11.2p11.2) in nine patients. American Journal of Medical Genetics* [online]. 1986, **24**(3), 393-414 [cit. 2021-04-07]. ISSN 0148-7299. Dostupné z: 10.1002/ajmg.1320240303

SOLER-ALFONSO, Claudia, Kathleen J. MOTIL, Catherine L. TURK, Patricia ROBBINS-FURMAN, Ellen M. FRIEDMAN, Feng ZHANG, James R. LUPSKI, J. Kennard FRALEY a Lorraine POTOCKI. *Potocki-Lupski Syndrome: A Microduplication Syndrome Associated with Oropharyngeal Dysphagia and Failure to Thrive. The Journal of Pediatrics* [online]. 2011, **158**(4), 655-659.e2 [cit. 2021-04-06]. ISSN 00223476. Dostupné z: 10.1016/j.jpeds.2010.09.062

SPINNER, Nancy B. a Laura K. CONLIN, 2014. *Mosaicism and clinical genetics. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* [online]. 166(4), 397-405 [cit. 2021-7-5]. ISSN 15524868. Dostupné z: 10.1002/ajmg.c.31421

STANKIEWICZ, Pawel a James R. LUPSKI, 2002. *Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. Trends in Genetics* [online]. **18**(2), 74-82 [cit. 2021-04-13]. ISSN 01689525. Dostupné z: 10.1016/S0168-9525(02)02592-1

STEINMANN, Katharina, David N. COOPER, Lan KLUWE, Nadia A. CHUZHANOVA, Cornelia SENGER, Eduard SERRA, Conxi LAZARO, Montserrat GILABERTE, Katharina WIMMER, Viktor-Felix MAUTNER a Hildegard KEHRER-SAWATZKI, 2007. *Type 2 NF1 Deletions Are Highly Unusual by Virtue of the Absence of Nonallelic Homologous Recombination Hotspots and an Apparent Preference for Female Mitotic Recombination. The American Journal of Human Genetics* [online]. **81**(6), 1201-1220 [cit. 2021-5-18]. ISSN 00029297. Dostupné z: 10.1086/522089

SULLIVAN, Kathleen E., Donna MCDONALD-MCGINN , Deborah A. DRISCOLL, Beverly S. EMANUEL, Elaine H. ZACKAI a Abbas F. JAWARD. *Longitudinal analysis of lymphocyte function and numbers in the first year of life in chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome)*. Clin Diagn Lab Immunol. 1999 Nov;6(6):906-11. [cit. 2021-04-10] PMID: 10548584; PMCID: PMC95796. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10548584/>

ŠLÉGROVÁ, Bc. Sandra, 2014. *Patologické nálezy u dětských pacientů detekované metodou array-CGH*. Praha. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze.

The 1000 Genomes Project Consortium: *A map of human genome variation from population-scale sequencing*. Nature 2010, 467:1061-1073. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/nature09534>

THEIN, Angela T.A., Sherif A. ABDEL-FATTAH, Philipa M. KYLE a Peter W. SOOTHILL, 2000. *An assessment of the use of interphase FISH with chromosome specific probes as an alternative to cytogenetics in prenatal diagnosis*. Prenat Diagn. **20**(4), 275-280. Dostupné z: 10.1002/(sici)1097-0223(200004)20:4<275::aid-pd799>3.0.co;2-z

THEISEN, Aaron, 2008, *Microarray-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH)*. Nature Education 1(1):45, Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/microarray-based-comparative-genomic-hybridization-acgh-45432/>

TONELLI, Adriano R., Kalyan KOSURI, Sainan WEI a Davoren CHICK, 2007. *Seizures as the first manifestation of chromosome 22q11.2 deletion syndrome in a 40-year old man: a case report*. Journal of Medical Case Reports [online]. **1**(1) [cit. 2021-5-26]. ISSN 1752-1947. Dostupné z: 10.1186/1752-1947-1-167

TREADWELL-DEERING, Diane E., M. Paige POWELL a Lorraine POTOCKI. *Cognitive and Behavioral Characterization of the Potocki-Lupski Syndrome (Duplication 17p11.2)*. Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics [online]. 2010, **31**(2), 137-143 [cit. 2021-04-06]. ISSN 0196-206X. Dostupné z: 10.1097/DBP.0b013e3181cda67e

TUCKER, Tracy, Sylvie GIROUX, Valérie CLÉMENT, Sylvie LANGLOIS, Jan M. FRIEDMAN a François ROUSSEAU, 2013. *Prevalence of selected genomic deletions and duplications in a French-Canadian population-based sample of newborns*. Molecular Genetics & Genomic Medicine [online]. **1**(2), 87-97 [cit. 2021-04-13]. ISSN 2324-9269. Dostupné z: 10.1002/mgg3.12

TURNER, Daniel J, Marcos MIRETTI, Diana RAJAN, Heike FIEGLER, Nigel P CARTER, Martyn L BLAYNEY, Stephan BECK a Matthew E HURLES, 2008. Germline rates of de novo meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders. *Nature Genetics* [online]. **40**(1), 90-95 [cit. 2021-5-18]. ISSN 1061-4036. Dostupné z: 10.1038/ng.2007.40

VÁCHA, Marek ORKO, *Příběh lidského genomu*. Živa: časopis přírodnický. 2016, 64(5), 203-206. ISSN 0044-4821, Dostupné z: <https://ziva.avcr.cz/2016-5/pribeh-lidskeho-genomu.html>

VELTMAN, Joris A. a Han G. BRUNNER. *De novo mutations in human genetic disease*. *Nature Reviews Genetics* [online]. 2012, **13**(8), 565-575 [cit. 2021-03-22]. ISSN 1471-0056. Dostupné z: 10.1038/nrg3241

VOIGHT, Benjamin F., Sridhar KUDARAVALLI, Xiaoquan WEN, Jonathan K. PRITCHARD a Laurence HURST. *A Map of Recent Positive Selection in the Human Genome*. *PLoS Biology* [online]. 2006, **4**(3) [cit. 2021-03-28]. ISSN 1545-7885. Dostupné z: 10.1371/journal.pbio.0040072

WARD, B. E., S. L. GERSEN, M. P. CARELLI, N. M. MCGUIRE, W. R. DACKOWSKI, M. WEINSTEIN, C. SANDLIN, R. WARREN a K. W. KLINGER, 1993. *Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: clinical experience with 4,500 specimens*. *Am J Hum Genet*. **52**(5), 854-865. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8488836/>

WEISE, Anja, Kristin MRASEK, Elisabeth KLEIN, Milene MULATINHO, Juan C. LLERENA, David HARDEKOPF, Sona PEKOVA, Samarth BHATT, Nadezda KOSYAKOVA a Thomas LIEHR, 2012. *Microdeletion and Microduplication Syndromes*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* [online]. **60**(5), 346-358 [cit. 2021-5-20]. ISSN 0022-1554. Dostupné z: 10.1369/0022155412440001

WENTZEL, Christian, Maria FERNSTRÖM, Ylva ÖHRNER, Göran ANNERÉN a Ann-Charlotte THURESSON, 2008. *Clinical variability of the 22q11.2 duplication syndrome*. *European Journal of Medical Genetics* [online]. **51**(6), 501-510 [cit. 2021-04-14]. ISSN 17697212. Dostupné z: 10.1016/j.ejmg.2008.07.005

WINNEPENNINCKX, Birgitta, Liesbeth ROOMS a R. Frank KOOY. *Mental Retardation: A Review of the Genetic Causes*. *The British Journal of Development*

Disabilities [online]. 2003, **49**(96), 29-44 [cit. 2021-03-22]. ISSN 0969-7950. Dostupné z: 10.1179/096979503799104138

WOLF, U., H. REINWEIN, R. PORSCH, R. SCHRÖTER a H. BAITSCH, 1965. *[Deficiency on the short arms of a chromosome No. 4]. Humangenetik.* **1**(5), 397-413. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5868696/>

ZARREI, Mehdi, Jeffrey R. MACDONALD, Daniele MERICO a Stephen W. SCHERER. *A copy number variation map of the human genome. Nature Reviews Genetics* [online]. 2015, **16**(3), 172-183 [cit. 2021-03-09]. ISSN 1471-0056. Dostupné z: 10.1038/nrg3871

ZHANG, Feng, Claudia M.B. CARVALHO a James R. LUPSKI. *Complex human chromosomal and genomic rearrangements. Trends in Genetics* [online]. 2009, **25**(7), 298-307 [cit. 2021-03-10]. ISSN 01689525. Dostupné z: 10.1016/j.tig.2009.05.005

ZHANG, Feng, Lorraine POTOCKI, Jacinda B. SAMPSON, Pengfei LIU, Amarilis SANCHEZ-VALLE, Patricia ROBBINS-FURMAN, Alicia D. NAVARRO, Patricia G. WHEELER, J. Edward SPENCE, Campbell K. BRASINGTON, Marjorie A. WITHERS a James R. LUPSKI. *Identification of Uncommon Recurrent Potocki-Lupski Syndrome-Associated Duplications and the Distribution of Rearrangement Types and Mechanisms in PTLs. The American Journal of Human Genetics* [online]. 2010, **86**(3), 462-470 [cit. 2021-04-01]. ISSN 00029297. Dostupné z: 10.1016/j.ajhg.2010.02.001

ZHOU, Qinghua, Shen-Yin WU, Katherine AMATO, Autumn DIADAMO a Peining LI, 2016. *Spectrum of Cytogenomic Abnormalities Revealed by Array Comparative Genomic Hybridization on Products of Conception Culture Failure and Normal Karyotype Samples. Journal of Genetics and Genomics* [online]. **43**(3), 121-131 [cit. 2021-5-25]. ISSN 16738527. Dostupné z: 10.1016/j.jgg.2016.02.002

ZVĚŘOVÁ, Martina, 2011. *SYNDROM SMITHOVÉ-MAGENISOVÉ. Česká a slovenská psychiatrie.* **107**(1), 33-36. ISSN 1212-0383. [cit. 2021-04-07] Dostupné z: http://www.cspsychiatr.cz/dwnld/CSP_2011_1_33_36.pdf