

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Hereditární syndromy predisponující k nádorovým onemocněním  
v dětském věku  
Bakalářská práce

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

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

Jméno a příjmení: **Tereza Kotková**  
Osobní číslo: **C18173**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**  
Téma práce: **Hereditární syndromy predisponující k nádorovým onemocněním v dětském věku**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

- 1) Vypracujte literární rešerši o vzácných hereditárních syndromech predisponujících k nádorovým onemocněním v dětském věku.
- 2) Charakterizujte sporadická a hereditární nádorová onemocnění, uveďte typy dědičnosti, vysvětlete etiopatogenezi vybraných syndromů a popište jejich fenotypické projevy.
- 3) Rozvedte metodické postupy molekulárně genetické diagnostiky.
- 4) Zohledněte současné a výzkumné možnosti v laboratorní diagnostice případně strategii cílené léčby onemocnění.
- 5) Pro vytvoření kompilačního textu využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod. Jako zdroje využijte zejména odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

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 „**Hereditární syndromy predisponující k nádorovým onemocněním v dětském věku**“ 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. X/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

Tereza Kotková v.r.

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí práce Mgr. Lucii Stříbrné, Ph.D. a své konzultantce Mgr. Markétě Gančarčíkové za skvělý přístup, cenné rady a trpělivost. Ráda bych také poděkovala své rodině a přátelům za jejich podporu.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce se zabývá hereditárními syndromy predisponujícími k nádorovým onemocněním v dětském věku, obecně popisuje onkogenetiku a karcinogenezi, popisuje podrobně jednotlivé syndromy chromozomální nestability a hereditární dědičnosti. Dále se také zabývá molekulárně genetickou diagnostikou hereditárních syndromů a jejich léčbou.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

onkogenetika, karcinogeneze, gen, hereditární syndromy, diagnostika, léčba

## **TITLE**

Hereditary syndromes predisposing to childhood cancer.

## **ANNOTATION**

The bachelor thesis deals with hereditary syndromes predisposing to cancer in childhood, generally describes oncogenetics and carcinogenesis, describes in detail the individual syndromes of chromosomal instability and hereditary inheritance. It also deals with molecular genetic diagnostics of hereditary syndromes and their treatment.

## **KEYWORDS**

oncogenetics, carcinogenesis, gene, hereditary syndromes, diagnostics, treatment

# Obsah

<i>SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK</i> .....	8
<i>SEZNAM ZNAČEK</i> .....	9
<i>TERMINOLOGIE</i> .....	10
<i>ÚVOD</i> .....	12
<b>1 ONKOGENETIKA</b> .....	13
<b>2 KARCINOGENEZE</b> .....	14
<b>2.1 HEREDITÁRNÍ NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ</b> .....	15
2.1.1 AUTOZOMÁLNĚ DOMINANTNÍ DĚDIČNOST .....	16
2.1.2 AUTOZOMÁLNĚ RECESIVNÍ DĚDIČNOST .....	16
2.1.3 KNUDSOVA TEORIE DVOU ZÁSAHŮ .....	17
<b>3 HEREDITÁRNÍ SYNDROMY</b> .....	19
<b>3.1 HEREDITÁRNÍ NÁDOROVÉ SYNDROMY DOSPĚLÉHO VĚKU</b> .....	19
<b>3.2 HEREDITÁRNÍ NÁDOROVÉ SYNDROMY DĚTSKÉHO VĚKU</b> .....	19
3.2.1 RETINOBLASTOM .....	19
3.2.2 SYNDROM LI-FRAUMENI.....	21
3.2.3 NEUROFIBROMATÓZA.....	22
3.2.4 WIEDEMANN-BECKWITHŮV SYNDROM (BWS).....	25
<b>4 SYNDROMY CHROMOZOMÁLNÍ NESTABILITY</b> .....	26
<b>4.1 BLOOMŮV SYNDROM (BS)</b> .....	26
<b>4.2 FANCONIHO ANÉMIE (FA)</b> .....	27
<b>4.3 ATAXIA TELANGIECTASIA (AT)</b> .....	27
<b>4.4 XERODERMA PIGMENTOSUM (XP)</b> .....	28
<b>5 MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA HEREDITÁRNÍCH NÁDOROVÝCH SYNDROMŮ</b> .....	29
<b>5.1 METODY SEKVENOVÁNÍ NOVÉ GENERACE</b> .....	29
5.1.1 Next Generation Sequencing (NGS).....	29
<b>5.2 KAPILÁRNÍ SEKVENOVÁNÍ</b> .....	31
5.2.1 SANGEROVA METODA SEKVENOVÁNÍ.....	32

<b>5.3</b>	<b>METODA Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) ..</b>	<b>34</b>
<b>6</b>	<b><i>LÉČBA</i>.....</b>	<b>38</b>
<b>7</b>	<b><i>ZÁVĚR</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>8</b>	<b><i>POUŽITÁ LITERATURA</i>.....</b>	<b>41</b>



## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 - Mnohostupňový proces karcinogeneze .....	15
Obrázek 2 - Autozomálně dominantní typ dědičnosti.....	16
Obrázek 3 - Autozomálně recesivní typ dědičnosti.....	17
Obrázek 4 - Knudsova teorie dvou zásahů.....	18
Obrázek 5 – Gen <i>RBI</i> retinoblastomu na 13 chromozomu .....	20
Obrázek 6 –Leukokorie a stabismus .....	21
Obrázek 7 – Li-Fraumeni syndrom .....	22
Obrázek 8 – Sedm diagnostických kritérií NF1 .....	23
Obrázek 9 – <i>Café-au-lait</i> a drobné skvrnité hyperpigmentace („freckling“).....	24
Obrázek 10 – NF2 plaky .....	25
Obrázek 11 – Bloomův syndrom projevy .....	26
Obrázek 12 – Xeroderma pigmentosum.....	28
Obrázek 13 –Znázornění přípravy sekvenační knihovny pro systém Illumina.....	30
Obrázek 14 – Časová osa čtecí kapacity pro různé metody .....	31
Obrázek 15 - Časová osa sekvenování DNA .....	32
Obrázek 16 – Pracovní diagram jednotlivých kroků sekvenování genomu.....	33
Obrázek 17 – Kapilární elektroforéza .....	34
Obrázek 18 –Elektroferogram sekvence DNA.....	34
Obrázek 19 – Přehled jednotlivých kroků technologie MLPA .....	35
Obrázek 20 – Detekce bodových mutací metodou MLPA .....	36

## SEZNAM ZNAČEK

- AD – autozomálně dominantní
- AR – autozomálně recesivní
- AT – Ataxia telangiectasia
- BS – Bloomův syndrom
- BWS – Wiedemann-Beckwithův syndrom
- CRT – cyklická reverzibilní terminace
- ddNTP – dideoxynukleotid
- DMSO – dimethylsulfoxid
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- dNTP – deoxynukleotid
- FA – Fanconiho anémie
- FFPE – formalin-fixed, paraffin-embedded, vzorky tkání fixovaných formalínem a uchovaných v parafínu
- FISH – fluorescenční *in situ* hybridizace
- FN – Fakultní nemocnice
- IQ – inteligenční kvocient
- LFS – Li-Fraumeni syndrom
- MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, multiplexní amplifikace závislá na ligaci práb
- NGS – sekvenování nové generace
- PCR – polymerázová řetězová reakce
- Rb – retinoblastom
- SBL – sekvenování ligací
- SBS – sekvenování syntézou
- SMRT – single molecule real-time, jedna molekula v reálném čase
- SNA – přídavek jednoho nukleotidu
- ssDNA – single-stranded DNA, jednořetězová deoxyribonukleová kyselina
- TGF – transforming growth factor, transformační růstový faktor
- UV – ultraviolet, ultrafialové záření
- XP – Xeroderma pigmentosum

(zdroj: online Velký lékařský slovník <http://lekarske.slovníky.cz>)

## TERMINOLOGIE

*Alela*: konkrétní forma genu

*Amplifikace*: znásobení

*Apoptóza*: programovaná buněčná smrt

*Benigní*: nezhoubný (nádor), normální (varianta)

*Diferenciace*: z nespecifikované buňky vzniká buňka specializovaná

*Fenotyp*: soubor všech definovatelných znaků jedince

*Gen*: základní jednotka dědičnosti

*Homeostáza*: udržování stálosti vnitřního prostředí

*Chromozom*: buněčná struktura v jádře eukaryotních buněk

*Imortalizace*: možnost nekonečného dělení

*Karcinogeneze*: vývoj nádorového onemocnění

*Maligní*: zhoubný nádor, vytváří metastázy

*Mutace*: změna v molekule DNA

*Proliferace*: chorobný růst tkáně, bujení

*Syndrom*: soubor příznaků

*Zygota*: buňka s kompletní sadou chromozomů

*Sekvenování*: proces, kterým se zjišťuje pořadí nukleových bází v sekvencích DNA

(zdroj: online Velký lékařský slovník <http://lekarske.slovníky.cz>)

## ÚVOD

Bakalářská práce pojednává o vzácných hereditárních syndromech predisponujících k nádorovému onemocnění v dětském věku. Nádorová onemocnění jsou v dětském a dospívajícím věku poměrně vzácná a jejich odhalení je velmi důležité pro následnou léčbu, která je v personalizované medicíně upravována a jedinečná pro každého pacienta.

V úvodní části bakalářské práce je obecně popsána onkogenetika, která se zabývá nádorovým onemocněním. Stanovuje nakolik je dané onemocnění ovlivněno genetickou predispozicí nebo či je způsobeno negativními okolními vlivy. A dále je zde popsána karcinogeneze, tedy vznik a rozvoj nádorového onemocnění. U hereditárních nádorových onemocnění rozlišujeme několik druhů dědičnosti, a to děděné autozomálně dominantním typem nebo autozomálně recesivním typem dědičnosti. V této práci je také zmíněna Knudsova teorie dvou zásahů, tedy hlavní teorie vzniku nádoru.

Největší část bakalářské práce je zaměřena především na popis jednotlivých syndromů predisponujících k nádorovým onemocněním v dětském věku, které se liší od nádorových syndromů dospělého věku. U vybraných syndromů je popsán projev, průběh, zastoupení a výskyt daného syndromu u jedinců v populaci. Syndromy, které jsou v bakalářské práci popsány, patří mezi nejčastěji zastoupené syndromy hereditárních nádorových syndromů dětského věku. Jedná se o Retinoblastom, syndrom Li-Fraumeni, Neurofibromatózu typu 1 a 2, a dále Wiedemann-Beckwithův syndrom. Dále také rozlišujeme syndromy chromozomální nestability, mezi které patří Bloomův syndrom, Fanconiho anémie, Ataxia telangiectasia a Xeroderma pigmentosum.

V konečné části bakalářské práce je popsána molekulárně genetická diagnostika hereditárních nádorových syndromů. Mezi nejpoužívanější metody jsem zařadila metody sekvenování nové generace (NGS, z ang. *Next Generation Sequencing*), dále kapilární sekvenování neboli Sangerova metoda sekvenování a v neposlední řadě i metoda MLPA (z angl. *Multiplex ligation-dependent probe amplification*)

Úplným závěrem bakalářské práce je léčba hereditárních syndromů predisponujících k nádorovým onemocněním v dětském věku. Nejčastější léčbou je chemoterapie, chirurgický zákrok nebo radioterapie. Cílená léčba umožní remisi až u 85 % dětských pacientů.

# 1 ONKOGENETIKA

Onkogenetika je lékařský obor zabývající se karcinogenezí. Cílem tohoto oboru je porozumět genetické predispozici k nádorovému onemocnění. Karcinogeneze (kancerogeneze) je složitý proces vzniku a vývoje nádorů, který je podmíněný genetickými faktory. Rozvoj nádorů ovlivňuje životní styl s faktory vnějšího prostředí, přičemž u některých nádorových onemocnění hraje klíčovou roli hereditární složka, kterou je dědičná mutace specifických genů (Hofmanová, 2013).

V procesu neoplastické evoluce se uplatňují dvě odlišné třídy genů, a to protoonkogeny a tumor supresorové geny. Genetické změny, jakými mohou být bodové mutace, chromozomální translokace, delece či amplifikace genů a numerické změny chromozomů, mohou aktivovat nádorové bujení a zvýšit funkci protoonkogenu, nebo vést k mutaci tumor supresorových genů a tím ke ztrátě jejich funkce (Barrett, 1993).

Protoonkogeny podporují růst nádorů, jsou tedy karcinogenní onkogeny vedoucí k nadměrné proliferaci. Hlavní funkcí protoonkogenů je kódování proteinů, které jsou důležité pro regulaci růstu, diferenciaci a apoptózu normálních buněk. Pokud tedy dojde k mutaci v onkogenu, je porušen buněčný růst, imortalizace a transformace, přičemž dochází k rozvoji nádorů. K mutaci v onkogenu, a tedy její aktivaci, dochází většinou bodovou mutací, chromozomální přestavbou nebo amplifikací (Hofmanová, 2013).

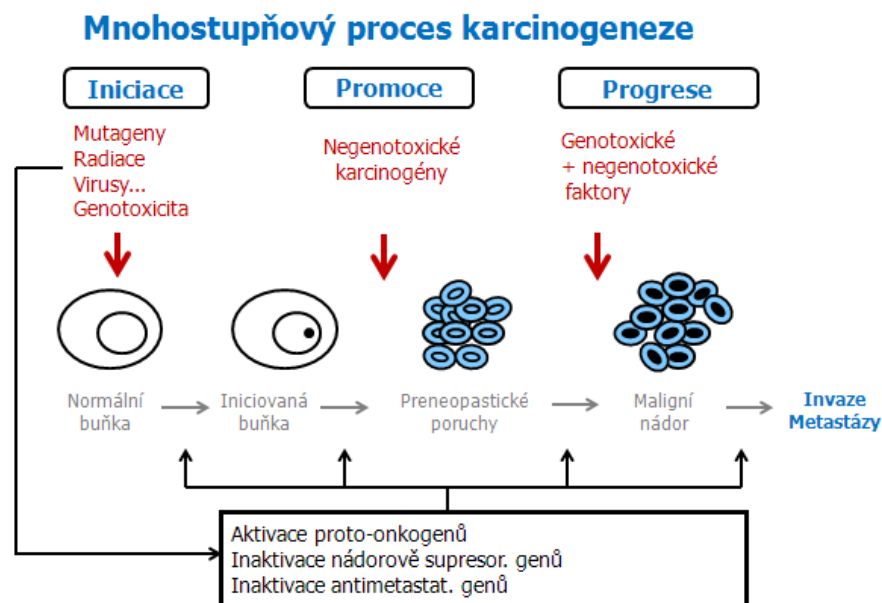
Tumor supresorové geny hrají důležitou roli v zástavě abnormální buněčné proliferace, tedy působí proti funkci onkogenů. Pokud dojde ke ztrátě funkce tumor supresorového genu, tak se předpokládá, že dojde k rozvoji nádorového bujení, nejčastěji retinoblastomu. Tyto geny mají vliv jak na buněčný růst, tak na jeho útlum. Této vlastnosti se využívá především v protinádorovém výzkumu (Kontomanolis, 2020). Cílem výzkumu těchto genů je nahradit jejich poškozenou funkci nebo udržet expresi těchto genů. Jednou z nejznámějších antiproliferačně působících molekul, které se podílí na růstu buněk, je *TGF* (z angl. *transforming growth factor*) beta protein. Tento protein stimuluje, ale i inhibuje růstovou funkci. *TGF* beta podporuje proliferaci buněk mesenchymálního původu a inhibuje proliferaci, např. u buněk epiteliálního původu a u B lymfocytů. Protein *TGF* beta také vyvolává diferenciaci u buněčných typů (Hofmanová, 2013).

## 2 KARCINOGENEZE

Karcinogenezí rozumíme vznik a vývoj nádorového onemocnění (Hofmanová, 2013). Původ teorie karcinogeneze somatické mutace je obecně připisována Theodorovi Boverimu, který ji poprvé popsal v roce 1914 ve své knize “ZurFrage der Entstehung Maligner Tumoren [On the Problem of the Origin of Malignant Tumors]“, přičemž anglický předklad knihy byl publikován v roce 1929 jeho manželkou Marcellou Boveri. Boveriho hypotéza vzniku maligního nádorového onemocnění byla mimořádně komplexní a zahrnovala řadu predikcí, které se následně ukázaly jako pravdivé. Z tohoto důvodu je Boveri obecně uznáván za zakladatele teorie karcinogeneze (Boveri, 1914).

Nádorové onemocnění vzniká tehdy, pokud dojde k narušení rovnováhy mezi inhibičními signály a signály stimulačními neboli k porušení homeostázy. Jeden ze základních předpokladů většiny vícestupňových modelů karcinogeneze je genetická a/nebo epigenetická alterace zahrnující více nezávislých genů. Ačkoliv je karcinogeneze často popisována třemi stádii, tedy fází iniciace, promoce a progrese, počet genetických změn prozatím nebyl stanoven (Barrett, 1993).

Karcinogeneze se skládá z několika kroků, které na sebe vzájemně navazují. Těmito kroky jsou iniciace, tedy zahájení, propagace a progrese, viz Obr. 1 (Pitot, 1981; Choudhuri, 2018). Ve fázi iniciace dochází ke změně v DNA buňky. Tato změna je nevratná a je způsobena mutací nebo narušením struktury DNA. Struktura DNA je narušena aberací nebo chybnou reparací DNA při replikaci. Fáze promoce je experimentálně definována procesem, ve kterém je iniciována buněčná klonální expanze do viditelných struktur nádorového onemocnění, často benigních lézí, jakými jsou papilomy. Ve fázi progrese dochází k transformaci benigního nádoru na nádor maligní a následné metastázy maligního neoplazmatu, tedy novotvaru. Charakteristickými znaky progrese jsou chromozomální abnormality jako delece, duplikace a translokace (Barrett 1987; Hennings, 1993; Choudhuri, 2018).



**Obrázek 1** - Mnohostupňový proces karcinogeneze

(převzato z Hofmanové, 2013 [https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/01\\_nador.html](https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/01_nador.html))

## 2.1 HEREDITÁRNÍ NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ

Dědičná nádorová onemocnění mohou tvořit přibližně 5–10 % nově vzniklých nádorových onemocnění (Narod, 1991; Garber, 2005; Strahm, 2006). Novější publikace však poukazují na vyšší zastoupení hereditárních nádorových syndromů u dětí (Knapke, 2012; Schiffman, 2013).

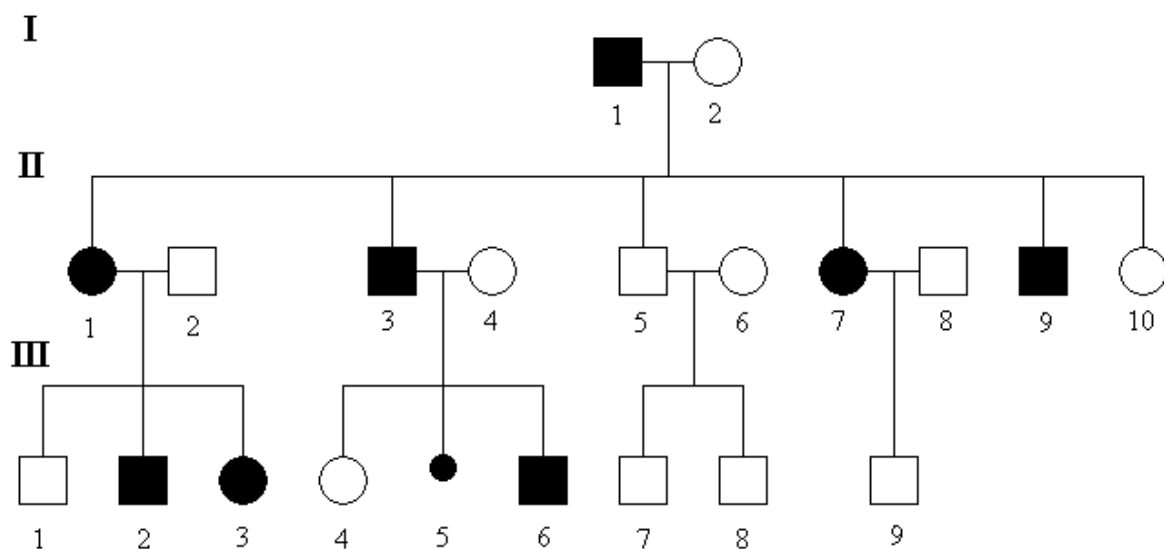
Hereditární nádorová onemocnění vznikají z důvodu zděděné mutace od rodičů (Bignold, 2020). Nádorové onemocnění může vzniknout již v raném věku, a to díky tomu, že většina druhů nádorů je zapříčiněna zárodečnou mutací, tedy mutací, která vstoupila do zygoty (Knudson, 2001).

Rozlišujeme několik vlastností dědičného typu nádoru (Berliner, 2007):

- autozomálně dominantní nebo recesivní typ přenosu nádoru;
- časný věk vzniku nádorového onemocnění;
- vyšší výskyt vzácných nádorů v rodině;
- bilaterální nebo multifokální nádory;
- příbuzní prvního stupně mají 50% pravděpodobnost, že budou mít totožnou mutaci;
- neúplná penetrance a variabilní expresivita je příčinou rozdílného věku diagnózy nádorového onemocnění.

### 2.1.1 AUTOZOMÁLNĚ DOMINANTNÍ DĚDIČNOST

Johann Gregor Mendel v roce 1865 poprvé zformuloval základní pravidla, přičemž podle zákona dominance a uniformity se autosomálně dominantní způsob dědičnosti projeví, když jedinec zdědí alespoň jednu dominantní alelu (A) porušeného genu nemoci (Mendel, 1866). Autozomálně dominantní (AD) typ dědičnosti postihuje ženy i muže se stejnou pravděpodobností, protože zahrnuje nepohlavní chromozomy, dále je AD dědičnost charakterizována vertikálním přenosem aberace/onemocnění, tedy fenotyp se objevuje v každé generaci a každý postižený jedinec má postiženého rodiče, k projevu onemocnění stačí jedna zděděná dominantní alela, viz Obr. 2 (Thompson, 2004; Rueben, 2020). Autozomálně dominantní dědičnost se může vyskytovat v rodině i ojediněle, poté hovoříme o vzniku *de novo* mutace. K mutacím *de novo* dochází nejčastěji v důsledku chyby v replikaci DNA, při chybném začlenění nukleotidy pomocí DNA polymerázy (Ségurel, 2014).



**Obrázek 2** - Autozomálně dominantní typ dědičnosti

(převzato z genetika-biologie <http://www.genetika-biologie.cz/typy-dedicnosti-v-rodokmenu>)

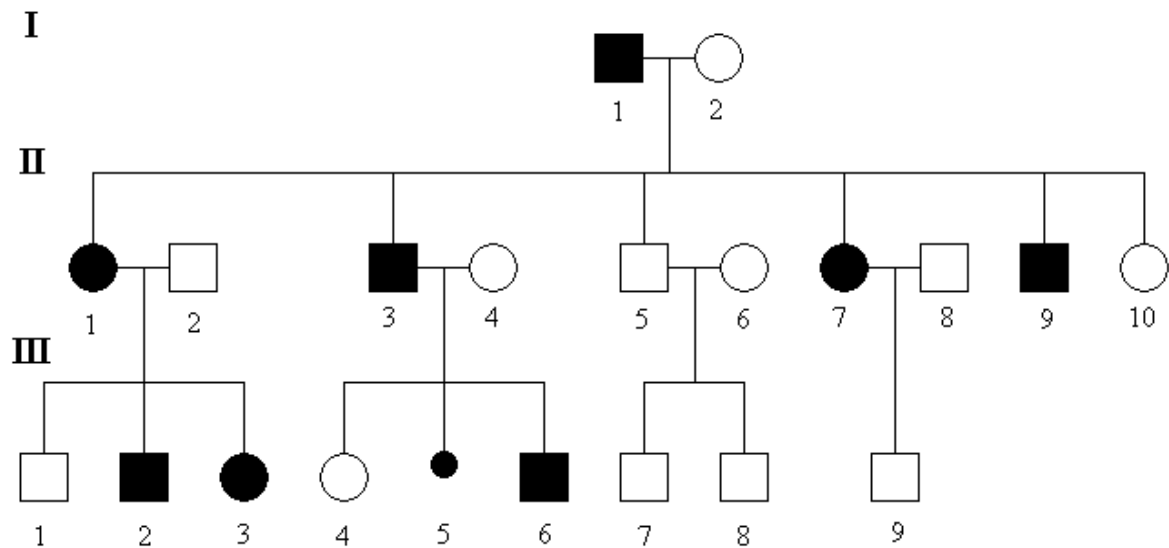
### 2.1.2 AUTOZOMÁLNĚ RECESIVNÍ DĚDIČNOST

Autozomálně recesivní dědičnost je charakterizována přenosem mutované kopie genu z obou rodičů na potomka. Pokud oba rodiče nesou mutaci ve stejném genu, jejich potomek má 25% riziko zděření obou alel a projevu daného recesivní onemocnění (Thompson, 2004; Stoltenberg, 1997).

Autozomálně recesivní typ dědičnosti můžeme zjistit již ze sestavení rodokmenu postižené rodiny, protože tento typ dědičnosti má svůj typický vzorec projevu. Fenotyp



autosomálně recesivního (AR) onemocnění se vyskytuje u více než jednoho člena rodokmenu, obvykle u sourozenců probanda, avšak rodiče jsou asymptomaticí přenašeči, jedná se o horizontální typ dědičnosti, přičemž ženy a muži jsou postiženi se stejnou pravděpodobností, viz Obr. 3 (Thompson, 2004; Gulani, 2020).

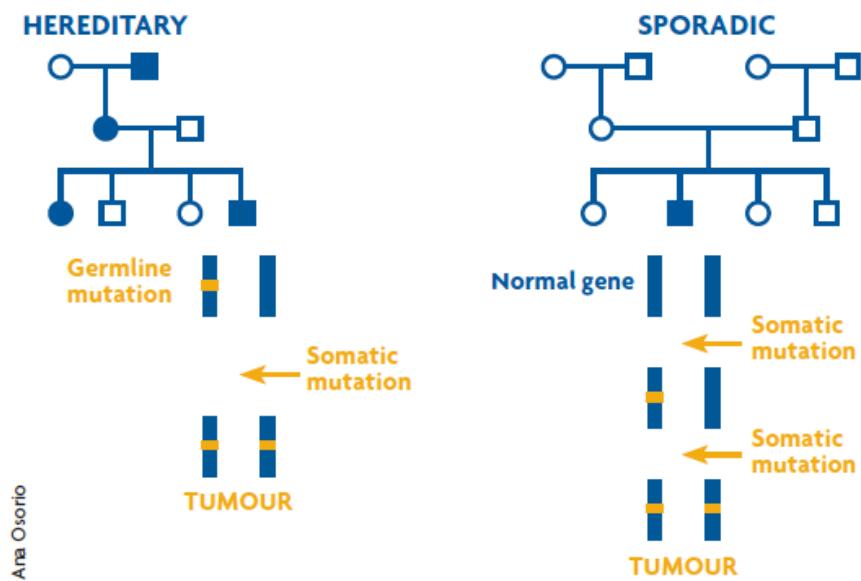


**Obrázek 3** - Autozomálně recesivní typ dědičnosti

(převzato z genetika-biologie <http://www.genetika-biologie.cz/typy-dedicnosti-v-rodokmenu>)

### 2.1.3 KNUDSOVA TEORIE DVOU ZÁSAHŮ

Knudsova teorie pochází z roku 1971 a byla popsána na základě pozorování 48 pacientů s nitroočním nádorem, retinoblastomem. Knudson (1971) zjistil, že nádorové onemocnění retinoblastom vzniká na základě dvou mutačních zásahů. V dominantně děděné formě se jedna mutace dědí zárodečnými buňkami (první zásah) a druhá mutace je v somatické buňce (druhý zásah). Pokud se jedná o nedědičnou formu nádoru, jsou obě mutace přítomné v somatických buňkách, viz Obr. 4 (Knudson, 1971).



**Obrázek 4 - Knudsova teorie dvou zásahů**

(převzato od Ana Osorio, 2013 <https://metode.org/issues/monographs/hereditary-cancer.html>)

(hereditary – dědičný typ, germline mutation – zárodečná mutace, somatic mutation – somatická mutace, tumor – nádor, sporadic – sporadický typ, normal gen – normální gen)

### **3 HEREDITÁRNÍ SYNDROMY**

Hereditární nádorové syndromy jsou ve většině případů autozomálně dominantní dědičná onemocnění s neúplnou, avšak vysokou penetrancí. Podle Knudsonovy teorie dvou zásahů vytváří germinální mutace první zásah do příslušného genu a tím zvýší pravděpodobnost neboli celoživotní riziko vzniku nádoru u postiženého jedince. Pro hereditární syndromy je typický výskyt určitého nádorového onemocnění v rodině, kde se toto onemocnění opakuje. V drtivé většině případů se nádorové onemocnění diagnostikuje již v nízkém věku (Hruška, 2019).

#### **3.1 HEREDITÁRNÍ NÁDOROVÉ SYNDROMY DOSPĚLÉHO VĚKU**

Dědičné nádorové syndromy dospělého věku se značně liší od hereditárních nádorů dětského věku tím, že mají jiné histologické podtypy a odlišné syndromy predispozice k nádorům. Nejčastější syndromy dospělého věku jsou karcinomy prsu a ovarií, adenomatózní polypóza a kolorektální karcinom, což je třetí nejčastější typ a příčina úmrtí na rakovinu po celém světě (Siegel, 2014).

#### **3.2 HEREDITÁRNÍ NÁDOROVÉ SYNDROMY DĚTSKÉHO VĚKU**

Ve většině případů se nádory vyskytují u dětí s dědičnou predispozicí k rakovině (Rednam, 2019).

Termín dědičná predispozice k nádorovému onemocnění zahrnuje mnoho familiárních nádorů, u kterých můžeme jasně stanovit způsob dědičnosti, i když nebyl jasně popsán specifický genový defekt (Monsalve, 2011).

Mezi běžné hereditární nádorové syndromy dětského věku patří retinoblastom, syndrom Li-Fraumeni, neurofibromatóza a Beckwith-Widemannův syndrom (Monsalve, 2011).

##### **3.2.1 RETINOBLASTOM**

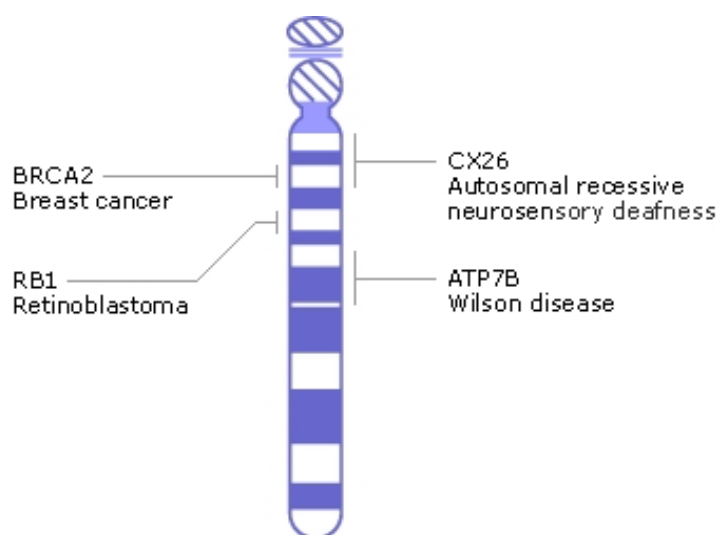
Retinoblastom (Rb) je nejčastější primární maligní onemocnění očí u dětí a batolat před dosažením věku 5 let (Ortiz, 2016). Tento nádor byl poprvé popsán v roce 1809 skotským chirurgem Jamesem Wardropem (Albert, 1987). V roce 1926 Verhoeff zjistil, že

tento druh nádoru vzniká z primitivních buněk sítnice, a proto je pojmenován jako retinoblastom (Albert, 1987).

Retinoblastom můžeme klasifikovat třemi různými způsoby: familiární nebo sporadický, jednostranný nebo bilaterální a dědičný nebo nedědičný. Přičemž se nejčastěji používají první dva způsoby klasifikace (Shields, 2017).

Hereditární Rb se většinou diagnostikuje u mladších dětí, okolo jednoho roku věku. Druhou formou je unilaterální forma Rb, v drtivé většině postihující jeden oční bulbus, kde vytváří pouze jedno ložisko, a častěji se vyskytuje u starších dětí mezi 1. a 3. rokem věku (MacCarthy, 2006). Pacienti s druhou formou Rb mají *RB1* gen mutován pouze v nádorové tkáni. Nicméně asi 10–15 % dětí s hereditárním retinoblastomem má onemocnění lokalizované pouze v jednom bulbu, proto jistotu, jestli pacient nese zárodečnou mutaci v *RB1* genu, a tím doživotně významně zvýšené riziko dalších nádorů, poskytnete pouze genetické vyšetření periferní krve pacienta (Abramson, 2004).

Gen retinoblastomu (*RB1*) se nachází na dlouhém rameni chromozomu 13 (13q14), viz Obr. 5. Předpokládá se, že gen je recesivní tumor supresorový gen a může hrát roli v růstu a ve vývoji buněk. Aby došlo k rozvoji retinoblastomu, musí být obě kopie genu v lokusu 13q14, známého jako gen *RB1*, odstraněny, inaktivovány nebo musí dojít k jejich mutaci. Tyto dvě mutace mají vztah ke Knudsově teorii dvou zásahů (Knudson, 1971).



**Obrázek 5** – Gen *RB1* retinoblastomu na 13 chromozomu

(převzato

[http://eridanus.cz/id32402/ve\(2da/pr\(2i\(1rodni\(1\\_ve\(2dy/biologie/genetika/\\_ostatni/Genes\\_and\\_Disease/Chromosome%2013.htm](http://eridanus.cz/id32402/ve(2da/pr(2i(1rodni(1_ve(2dy/biologie/genetika/_ostatni/Genes_and_Disease/Chromosome%2013.htm))

(breast cancer – rakovina prsu, retinoblastoma – retinoblastom, Wilson disease – Wilsonova choroba, autosomal recessive neurosensory deafness – autozomálně recesivní neurosenzoričká hluchota)

Nejběžnější příznaky retinoblastomu jsou leukokorie, která se projevuje bílým odrazem viditelným skrz zornici oka a strabismus, který vidíme jako nesouměrný pohled oka, kdy oči nehledí rovnoběžně (Dimaras, 2019). Dále také můžeme na oku pozorovat vápenatění, které vidíme pouhým okem nebo může být detekováno pomocí magnetické rezonance, viz Obr. 6 (Rodjan, 2015).

### A Glint or a Squint Should Make You Think!



Leukocoria (cat's eye reflex, white pupil)



Strabismus (squint)

**Obrázek 6** – Leukokorie a strabismus

(převzato z World Eye Cancer Hope <https://wechope.org>)

(cat's eye reflex – reflex kočičích očí, white pupil – bílá zornice, squint – šilhavost)

Děti s retinoblastomem jsou vystaveny třem důležitým a životu ohrožujícím problémům, kterými jsou metastáze z retinoblastomu, intrakraniální neuroblastická malignita neboli trilaterální retinoblastom a druhé primární nádory (Shields, 2017). Proto nejdůležitějším cílem u dětského pacienta s retinoblastomem je snaha o to, aby pacient přežil a druhým cílem je zachování bulvy oka (Shields, 2017).

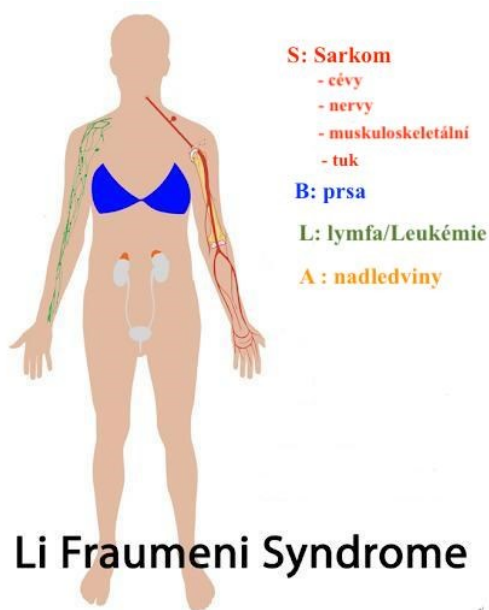
#### 3.2.2 SYNDROM LI-FRAUMANI

Syndrom Li-Fraumani (LFS) je syndrom s predispozicí pro nádorové onemocnění způsobené zárodečnou mutací genu *TP53* na chromozomu 17p13.1. Syndrom je přenášen autozomálně dominantním typem dědičnosti s vysokou penetrancí (Correa, 2016).

Protein kódovaný genem *TP53* je p53, což je základní buněčný transkripční faktor, který iniciuje protinádorové reakce na buněčný stres, jako je poškození DNA (Dutzmann, 2019).

Ztráta funkce proteinu p53 vede k vývoji malignit po celý život. Mezi nejčastější složené nádory patří nádor měkkých tkání, osteosarkom, premenopauzální karcinom prsu, mozkové tumory a také karcinom kůry nadledvin (Correa, 2016).

Některé publikace také ukazují na gen *CHEK2* lokalizovaný na chromozomu 22q12.1 jako na rizikový faktor, protože mutace v tomto genu mají asociaci s predispozicí k nádorovému bujení u LFS. Mutace v tomto genu způsobují nádor mozku a bilaterální karcinom prsu v rodinách, které jsou negativní na mutaci v zárodečné linii pro gen *TP53*, viz Obr. 7 (Vahteristo, 2001).



**Obrázek 7** – Li-Fraumeni syndrom

(převzato z Ivy Union Publishing <https://www.ivyunion.org/index.php/ajccr/article/view/1365>)

### 3.2.3 NEUROFIBROMATÓZA

Neurokutánní choroba je skupina onemocnění s fenotypickým projevem především na kůži a nervovém systému. Jedná se o vrozená, geneticky podmíněná, multisystémová onemocnění na podkladu postižení neuroektodermu při poruše vývoje neurální lišty.

Termín neurofibromatóza, neurokutánní choroba, sdružuje tři odlišná onemocnění označovaná jako neurofibromatóza 1. typu (NF1), neurofibromatóza 2. typu (NF2) a schwannomatóza. Všechny tyto genetické poruchy jsou zděděné autozomálně dominantním způsobem s vysokým podílem mutací vzniklých *de novo* a s variabilní expresivitou, přičemž u onemocnění NF1 a NF2 je popsána úplná penetrance naopak u schwannomatózy je zaznamenána neúplná penetrance onemocnění. Geny *NF1* a *NF2* asociované s neurofibromatózou jsou známé a potvrzují odlišnou etiologii onemocnění (Korf, 2013).

### 3.2.3.1 NEUROFIBROMATÓZA TYP 1 (NF1)

Neurofibromatóza 1. typu byla poprvé rozpoznána jako multisystémová klinická entita v roce 1882 Friedrichem von Recklinghausenem, který ji i pojmenoval (von Recklinghausen, 1882). Tento typ nádorového onemocnění je poměrně častá dědičná porucha, která postihuje jednoho člověka z 2500-3000 lidí po celém světě bez ohledu na pohlaví (Huson, 1989). Je způsobena mutací v zárodečné linii v genu *NF1*, který se nachází na chromozomu 17q11.2 a kóduje cytoplazmatický protein *neurofibromin* (Gutmann, 2012). U jedinců, kteří mají diagnostikovanou NF1 se netvoří pouze benigní a maligní nádory CNS a periferního nervového svalstva, ale i nádory v jiných částech těla (Williams, 2009). Jedná se především o gastrointestinální stromální nádor, leukémii, glioblastom a karcinom prsu (Brems, 2009).

Nicméně téměř 50 % jedinců s neurofibromatózou 1. typu nemá pozitivní rodinnou anamnézu, a tedy nádorové onemocnění vzniká *de novo* (spontánní) mutací (Kayes, 1994). U pacientů s mikrodeleci *NF1*, je nalézána zvýšená tendence vzniku mikrofibromů v dětském věku. Tito jedinci mají také nižší průměrné IQ, abnormální obličejové rysy a mají zvýšené riziko vzniku maligního nádorového onemocnění periferního nervového obalu (Leppig, 1997).

Mezi 7 diagnostických kritérií při hodnocení neurofibromatózy 1. typu patří především nález mnohočetných pigmentových lézí, označovaných jako *café-au-lait* spoty, tzv. skvrny bílé kávy. Pro NF1 je významný nález 6 a více skvrn o průměru pod 0,5 cm u jedinců před pubertou a nad 1,5 cm u jedinců po pubertě. Dále je také důležitý výskyt neurofibromů a výskyt gliomu, viz Obr. 8 a 9 (Gutmann, 1997).

Diagnostická kritéria neurofibromatózy typu 1	
1.	Skvrny <i>café-au-lait</i> na kůži v počtu 6 a více: – u dětí o průměru $\geq 0,5$ cm – u dospělých o průměru $\geq 1,5$ cm
2.	mnohočetný axillární a/nebo inkuinální freckling
3.	dva a více neurofibromů nebo jeden plexiformní neurofibrom
4.	gliom optického nervu
5.	typické kostní léze (dysplazie křídla sfenoidální kosti nebo ztenčení kortikální části dlouhých kostí s pseudoartrózou nebo bez pseudoartrózy)
6.	2 nebo více Lischových nodulů duhovky oboustranně
7.	příbuzný 1. stupně (rodič, sourozenec nebo potomek) s prokázanou diagnózou NF1 podle uvedených kritérií

**Obrázek 8** – Sedm diagnostických kritérií NF1

(převzato z Institute of Health Consensus Development Conference  
<https://www.prolekare.cz/casopisy/cesko-slovenska-dermatologie/2015-3/neurofibromatoza-z-pohledu-dermatologa-55781>)



**Obrázek 9** – *Café-au-lait* a drobné skvrnité hyperpigmentace („freckling“)

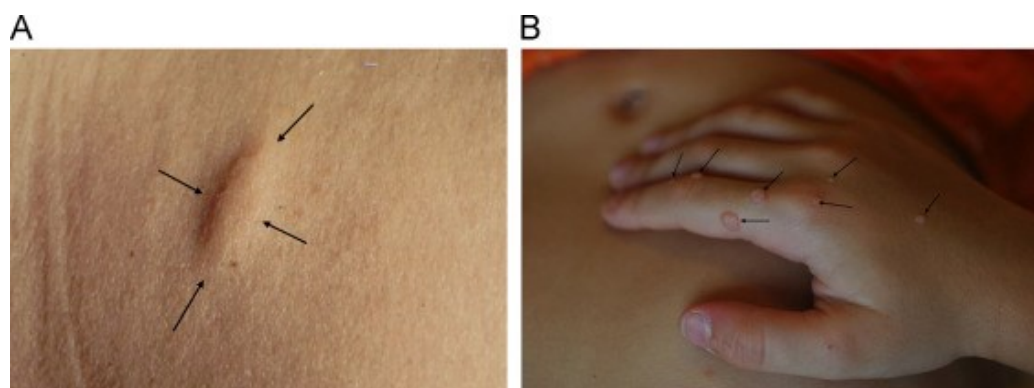
(převzato od D. Humhejové <https://www.prolekare.cz/casopisy/cesko-slovenska-dermatologie/2015-3/neurofibromatoza-z-pohledu-dermatologa-55781>)

### 3.2.3.2 NEUROFIBROMATÓZA TYP 2 (NF2)

Neurofibromatóza druhého typu je syndrom mnohočetné neoplázie. Tento syndrom je způsoben mutací v genu *NF2* umístěného na chromozomu 22q12, který kóduje protein zvaný *merlin* nebo *schwannomin*. Tato porucha se vyskytuje u 1: 25000 živě narozených dětí a je děděná jako autozomálně dominantní znak s velkou fenotypovou variabilitou a téměř 100% penetrancí do 60 let věku jedince (Evans, 1992; Rouleau, 1987). Asi 50 % jedinců tuto mutaci získá *de novo* a stejně velké procento je způsobeno sporadickými mutacemi, které se mohou vyskytovat v zárodečných rodičovských buňkách. Výsledkem sporadické mutace může být i mozaika, u které se odhaduje výskyt na 25 % (Evans, 1992; Kluwe, 2003).

U NF2 se nádory vyskytují v intrakraniálních a spinálních oblastech, ale také na periferních nervech, kde způsobují další příznaky v závislosti na jejich umístění. V nitrolebním prostoru mohou nádory způsobit hluchotu, slepotu, bolesti hlavy, abnormality chůze a záchvaty (Patronas, 2001). U neurofibromatózy mohou být fenotypické projevy na kůži a očích. Obdobně jako u NF1 se vyskytují skvrny *café-au-lait*, ale v mnohem menší míře a velikosti (Evans, 1992). Mnohem častější kožní projevy u NF2 jsou neurofibromy, nodulární schwannomy a NF2 plaky, které se objevují jako dobře definované hyperpigmentované léze, obvykle o průměru menší než 2 cm, viz Obr. 10 (Mautner, 1997).





**Obrázek 10** – NF2 plaky

(převzato od M.Ruggieri

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1071909115000753#f0010>)

### 3.2.4 WIEDEMANN-BECKWITHŮV SYNDROM (BWS)

Wiedemann-Beckwithův syndrom byl pozorován u různých etnických skupin s populačním výskytem 1:13700 a rovnoměrným zastoupením u mužů a žen (Thorburn, 1970). Tento syndrom byl pojmenován po lékařích, kteří ho jako první popsali, Beckwith v roce 1963 a Wiedemann v roce 1964 (Beckwith, 1998).

BWS je komplexní multigenní porucha způsobená změnami růstových regulačních genů na chromozomu 11p15 (Li, 1998). Velká část případů BWS, tedy přibližně 85 %, je sporadická s normálním karyotypem, což znamená, že jen u velmi málo jedinců jsou detekovány abnormality na chromozomu 11p15. Přibližně 10-15 % případů BWS je popsáno u jedinců s autozomálně dominantním typem dědičnosti, přičemž u rodokmenů je nalézán preferenční mateřský přenos, a proto je rodinná historie důležitá při počátečním hodnocení. Anamnestické údaje by měly zahrnovat porodní hmotnost rodičů, familiární historii defektu břišní stěny, zvětšenou velikost jazyka, pupečnickovou kýlu a další abnormality břišních orgánů (Weksberg, 2005).

V pozdější fázi je tento syndrom charakterizován postnatálním přerůstáním, hypotonií, hypoplázií obličeje, rozštěpy patra a nápadným projevem ploché tmavě červené až fialově zbarvené léze na čele, tzv. *naevus flammeus*, lidově zvaným “oheň“ (Mussa, 2016).

## 4 SYNDROMY CHROMOZOMÁLNÍ NESTABILITY

Syndromy chromozomální instability jsou také známé jako syndromy zlomených chromozomů patřící do skupiny genetických poruch, které jsou typicky přenášeny autozomálně recesivním typem dědičnosti. Syndromy chromozomální instability často vedou ke zvýšené tendenci rozvoje určitých typů nádorových onemocnění. Existuje několik poruch charakterizovaných jako syndromy chromozomální instability a těmi jsou Bloomův syndrom, Fanconiho anémie, Ataxia Telangiectasia a Xeroderma pigmentosum (Taylor, 2001).

### 4.1 BLOOMŮV SYNDROM (BS)

Bloomův syndrom je autozomálně recesivní onemocnění způsobené mutací genu *BLM*, který je umístěn na chromozomu 15q26.1. Tento gen kóduje protein *RecQL3* zapojený v DNA replikaci a reparaci (Kaneko, 2004; Karow, 2000).

Kvůli genetické instabilitě na molekulární úrovni mají jedinci s BS vysoké riziko vzniku nádorového onemocnění v dolní i horní části gastrointestinálního traktu, genitálií, močového traktu a kůže. Mimo jiné mají zvýšenou přecitlivost na světlo, sníženou plodnost, imunodeficienci B a T lymfocytů, dále dermatologické projevy na kůži včetně tzv. poikilodermie, změnami kůže s hypo-/hyper-pigmentací, telangiectáziemi a atrofii (Belmont, 2013; Taylor, 2019).

Pacienti s Bloomovým syndromem mají charakteristické rysy, mezi které patří vysoký hlas, malá a hubená postava, dlouhé končetiny, velké uši, dlouhé ruce a nohy, úzký obličej a prominující nos, viz Obr. 11 (Arora, 2014).



*Bloomův  
syndrom*

**Obrázek 11** – Bloomův syndrom projevy

(převzato od MUDr. E. Konupkové <https://www.priznaky-projevy.cz/geneticke-nemoci/1390-bloomuv-syndrom-priznaky-projevy-symptomy-pricina-lecba>)

## 4.2 FANCONIHO ANÉMIE (FA)

Falconiho anémie je vzácné autozomálně recesivní onemocnění a u homozygotních nosičů patogenní varianty bývá nalézán vysoký výskyt vrozených vývojových vad (Fanconi, 1927). Fanconiho anémie je nejběžnější typ dědičného syndromu selhání vyzrávání buněk v kostní dřeni (těžká dřevná hypoplazie) a tito pacienti mají vysokou predispozici ke vzniku leukémie. Průměrný věk nástupu aplastické anémie (dřevného útlumu) je 8 let. FA se vyskytuje ve všech etnických skupinách s genovou frekvencí 1:300, ale tato frekvence může být i značně vyšší (Auerbach, 1991; Swift, 1971).

U pacientů s Fanconiho anémií se nejčastěji vyskytují onemocnění, jako jsou myeloidní leukémie, myelodysplastické syndromy, nádorová onemocnění jater, orofaryngu, gastrointestinálního traktu a gynekologického systému. Léčba u pacientů s FA je složitá kvůli velmi úzkému terapeutickému indexu pro chemoterapii a ozařování, protože pacienti mají primární nestabilitu DNA (Alter, 1996).

## 4.3 ATAXIA TELANGIECTASIA (AT)

Ataxia telangiectasia je také nazývána jako Louis-Barové syndrom. Tento syndrom pojmenovali Elena Boder a Robert Sedgwick, kteří ho v roce 1957 popsali (Boder, 1957).

Ataxia telangiectasia je autozomálně recesivní cerebelární ataxie (Anheim, 2012). Toto onemocnění je způsobené mutací v *ATM* genu lokalizovaném na chromozomu 11q22 - 23, který kóduje proteinovou kinázu serin/threonin (Gatti, 1988). AT se vyskytuje po celém světě s odhadovanou prevalencí od 1:40000 až po 1:100000 (Swift, 1986).

Pacienti s AT mají buňky vykazující citlivost na ionizující záření, chromozomální nestabilitu, dále mají zkrácené telomery a s tím spojené předčasné stárnutí a defektní opravy dvouvláknových zlomů DNA (Shiloh, 2001). Mají také širokou škálu klinických projevů, jakými jsou progresivní cerebelární ataxie, okulokutánní telangiektasie, variabilní imunodeficiencie, radiosenzitivita, citlivost na malignity a metabolické poruchy. U pacientů s AT byly zjištěny i další abnormality jako je selhání růstu, špatný pubertální vývoj, cukrovka s rezistencí na inzulín, gonadální atrofie, onemocnění plic, kožní abnormality a kardiovaskulární onemocnění (Nissenkorn, 2016; Teive, 2015; Schalch, 1970).

#### 4.4 XERODERMA PIGMENTOSUM (XP)

Xeroderma pigmentosum je dědičné autozomálně recesivní onemocnění, kdy ženy i muži jsou postiženi rovnoměrně. Toto onemocnění se vyskytuje po celém světě s rozdílnou prevalencí, v Západní Evropě je výskyt 2,3:1000000 nově narozených dětí (Kleijer, 2008).

Xeroderma pigmentosum byla poprvé popsána v roce 1874 dermatologem Kaposim u skupiny pacientů s tenkou, suchou kůží, na které byly viditelné vrásky a pigmentace, malé dilatace cév a vývoj nádoru kůže (Hebra, 1874).

XP je popisována jako citlivost na sluneční svit s vysokou mírou malignit na pokožce vyvolaných slunečním, především UV zářením. Citlivost na slunce se projevuje tvorbou puchýřů na kůži nebo erytémem, který je viditelný i několik týdnů. Většina pacientů také trpí na opakované záněty spojivek a fotofobii. Příznaky se objevují již v dětském věku, a to před 10. rokem života. Mezi první symptomy patří dyschromie a pigmentové skvrny na kůži, které mají různou velikost a barvu od hnědé až po černou, viz Obr. 12 (Jung, 1986). Další abnormality, které jsou také velmi časté, jsou abnormality očí, které jsou omezené především na přední stranu oka, kde jsou víčka, rohovka a spojivka vystaveny UV záření. U pacientů se také často rozvíjí nádory v dutině ústní, nejčastěji nádor jazyka (Stefanini, 2008; Ramkumar, 2011).



**Obrázek 12** – Xeroderma pigmentosum

(převzato z Life Force <https://www.askdrshah.com/blog/everything-need-know-xeroderma-pigmentosum/>)

## 5 MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA HEREDITÁRNÍCH NÁDOROVÝCH SYNDROMŮ

Mezi moderní genetické metody, které se používají stále více, patří především metody sekvenování nové generace, celogenomové sekvenování a sekvenování parciálních genomových úseků. Podle současných znalostí méně než 10 % všech maligních neoplastických onemocnění souvisí s dobře definovanými dědičnými predispozicemi (Pagon, 2021). Nicméně podobně vysoké číslo je spojováno i se specifickými variantami v zárodečné linii svědčící o dědičné etiologii, i když s dosud nedefinovaným fenotypem a klinickým významem (Ballinger, 2016; Pearlman, 2017). Čísla v dospívající a pediatrické populaci jsou ještě znatelně vyšší, blíží se 35 %, záleží však na konkrétním typu nádorového onemocnění (Mork, 2015).

Vývoj a zavedení komplexních genetických vyšetření, jako je NGS (sekvenování nové generace, z angl. *Next Generation sequencing*) a WGS (sekvenování celého genomu, z angl. *Whole Genome Sequencing*), zvýšily chápání molekulárně biologických aspektů rodinných nádorových syndromů (Ripperger, 2017).

### 5.1 METODY SEKVENOVÁNÍ NOVÉ GENERACE

Metody sekvenování nové generace, také nazývané masivní paralelní sekvenování (MPS), jsou novější metody z původní automatizované Sangerovy metody, která je nazývána metodou sekvenování první generace. Obě metody jsou úzce propojené z hlediska jejich základních enzymologických základů. Tyto nové metody představují několik různých strategií, které se spoléhají na kombinaci přípravy šablony sekvenování, zobrazování a zarovnávání genomu. Hlavní výhodou nové generace sekvenování je, že umí relativně levně vyprodukovat enormní množství dat. V některých případech dokáže přístroj přečíst i jednu miliardu krátkých čtení za jeden tzv. běh přístroje. Tato funkce tedy rozšiřuje oblast experimentování nad rámec pouhého určení pořadí bází. Také umožňuje sekvenování milionů fragmentů DNA bez předchozí znalosti frekvencí (Wang, 2009; Kamps, 2017).

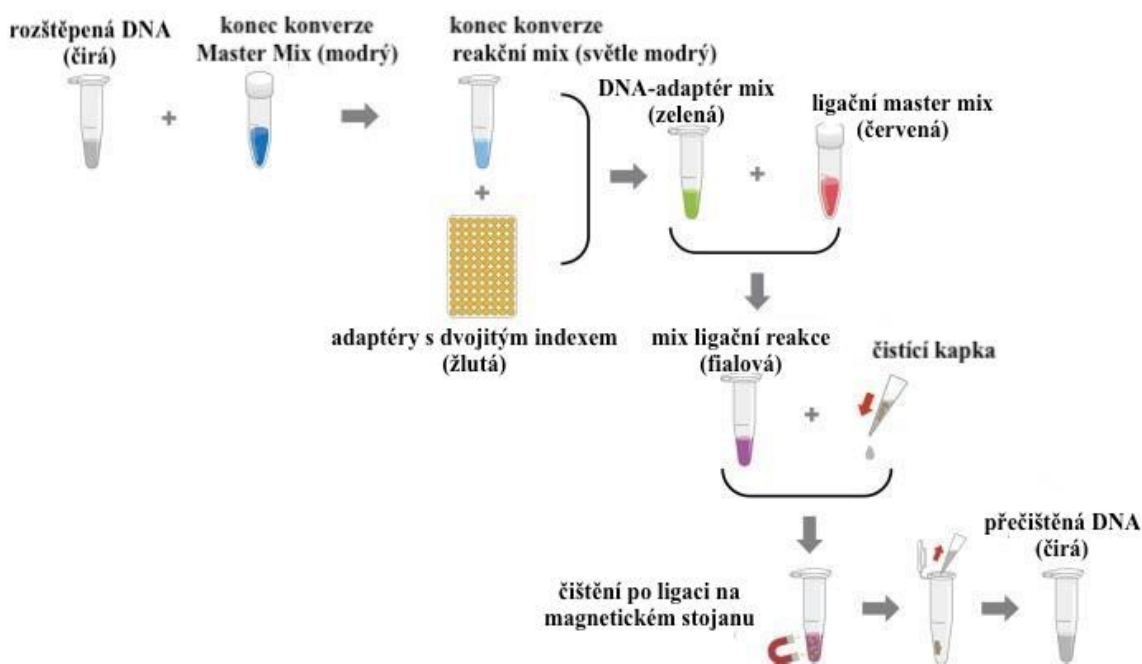
#### 5.1.1 Next Generation Sequencing (NGS)

Příchod technologií NGS na trh změnil způsob, jakým uvažujeme o vědeckých přístupech v základním, aplikovaném a klinickém významu. V některých ohledech je potenciál NGS podobný počátkům PCR, přičemž primární omezení jeho použití je

představivost člověka. Při aplikaci NGS můžeme resekvenovat genom člověka, abychom lépe pochopili, jak genetické rozdíly ovlivňují zdraví či nemoci (Metzker, 2010).

U NGS lze rozlišit několik platforem a přístupů mezi které patří: Illumina, Oxford Nanopores, PacBio nebo Roche.

Aktuálně se NGS technologie dělí na dva typy, kterými je sekvenování krátkého a dlouhého čtení. Sekvenování krátkého čtení umožňují sekvenátory Illumina a samotné sekvenování je popsáno jako sekvenování syntézou (SBS, z angl. *Sequencing By Synthesis*) se čtením kratším než 300 bp, viz Obr. 13 (Kamps, 2017).



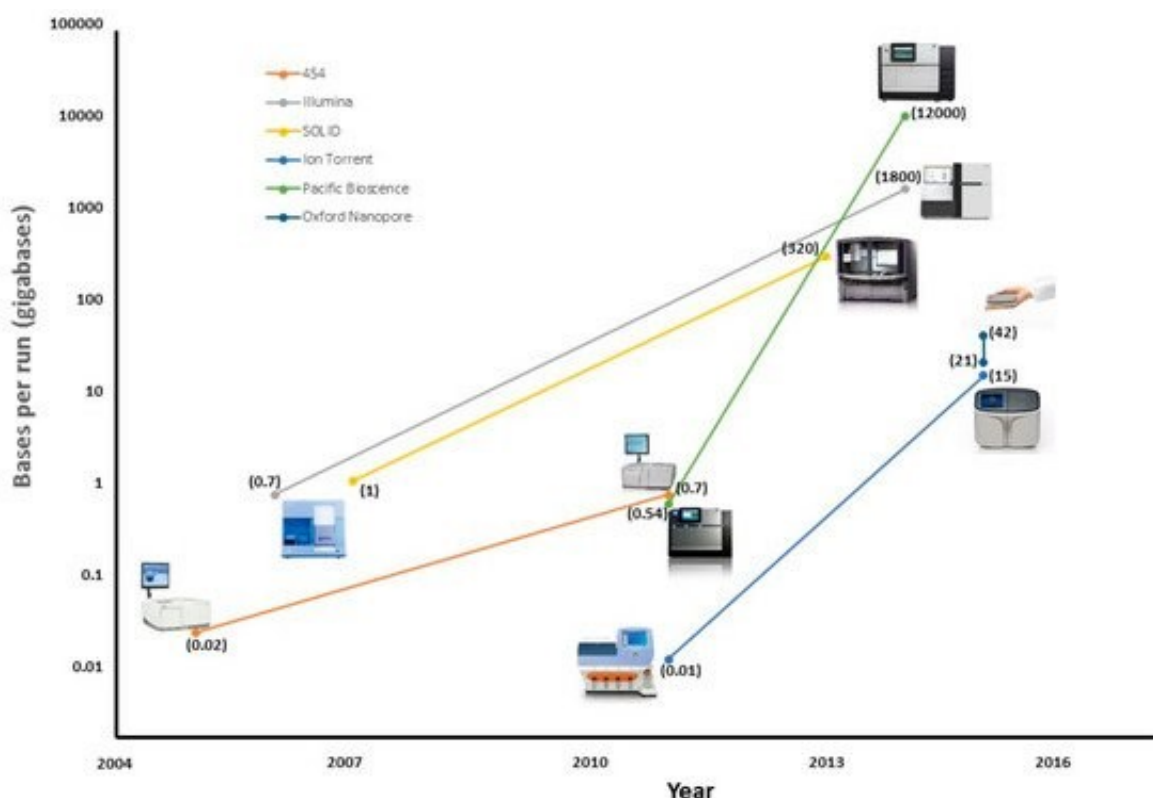
**Obrázek 13** – Znárodnění přípravy sekvenační knihovny pro systém Illumina

(převzato od Thermo Fisher Scientific <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ngs-library-preparation-illumina-systems.html>)

Sekvenování dlouhého čtení se provádí hlavně pomocí PacBio a Roche, což je nákladná technologie z angl. *single molecule real-time* (SMRT) neboli čtení jedné molekuly v reálném čase o velikosti delším než 2,5 kb. Sekvenování dlouhého čtení je vhodnější pro rodinné haplotypování neboli fázování alely, k detekci DNA a variabilitě v chromozomové struktuře (Kamps, 2017).

Sekvenační technologie zahrnují řadu metod, které mohou být široce charakterizovány jednotlivými kroky, kterými jsou příprava templátu, sekvenování, vizualizace a analýza dat. Unikátní kombinace specifických protokolů odlišuje jednotlivé technologie NGS a určuje typ produkovaných dat z každé platformy, viz Obr. 14

(Fan, 2006; Metzker, 2010). Tyto metody mohou být klasifikovány jako cyklické reverzibilní terminace (CRT), adice jednoho nukleotidu (SNA, z angl. Single-nucleotide addition) a sekvenování v reálném čase. Je také popsáno sekvenování ligací (SBL), což je přístup, při kterém je DNA polymeráza nahrazena DNA ligázou. Zobrazovací metody spojené s těmito strategiemi sekvenování sahají od měření bioluminiscenčních signálů po čtyřbarevné zobrazování jednotlivých molekulárních událostí (Pop, 2008).

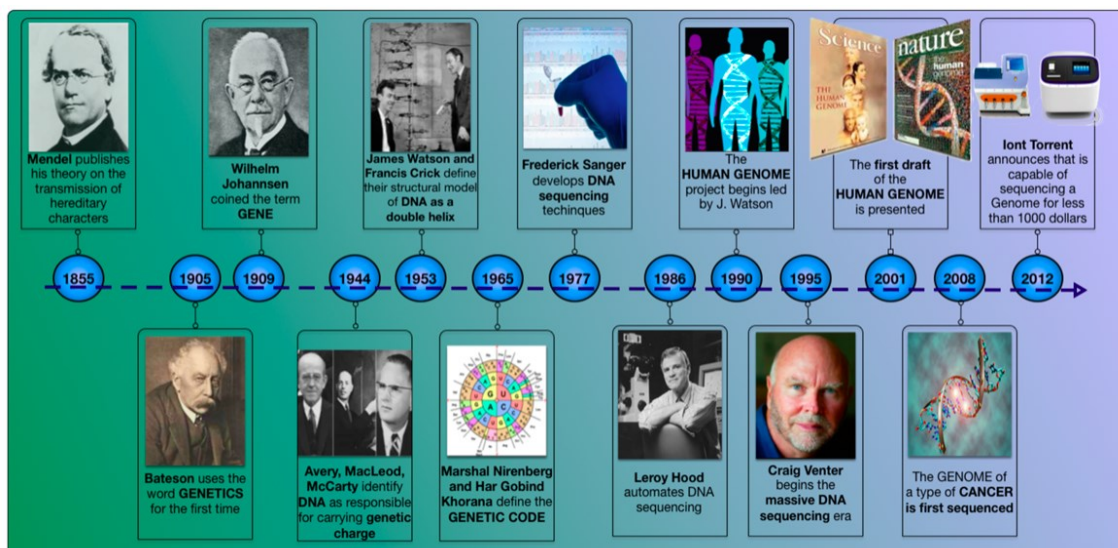


**Obrázek 14** – Časová osa čtecí kapacity pro různé metody (převzato z Almeria University z <https://doi.org/10.3390/s17030588>)

## 5.2 KAPILÁRNÍ SEKVENOVÁNÍ

Technologie sekvenování se zrodila jako soubor technik, které vedou k poznání o pořadí, ve kterém jsou v DNA přítomny čtyři nukleotidy – adenin, cytosin, guanin a thymin. Zjištění pořadí těchto bází způsobilo revoluci v molekulární biologii, medicíně, genomice a příbuzných oborech. Prvním organismem, jehož kompletní genom byl sekvenován v roce 1977 Frederickem Sangerem, byl bakteriofág Phi-X174 (Sanger, 1977). Tento genom měl pouhých 5386 nukleotidů distribuovaných v 11 genech, ale jeho sekvenování bylo velkým milníkem. Hlavní pokrok v sekvenčních technologiích v průběhu let vedl k vývoji nových a vylepšených platform sekvenování DNA. Tyto technologie

spolu s různými výpočetními nástroji pro analýzu a interpretaci dat pomohly vědcům lépe porozumět genomům různých ekonomicky důležitých organismů. Od té doby byly sekvenovány genomy velkého počtu druhů, až nakonec byl v roce 2001 předveden první návrh lidského genomu, viz Obr. 15 (Lander, 2001; Verma, 2017).



**Obrázek 15** - Časová osa sekvenování DNA

(převzato z <https://doi.org/10.3390/s17030588>)

(1855 – Mendel publikoval svou teorii o dědičnosti, 1905 – Bateson použil poprvé slovo genetika, 1909 – Johannsen vytvořil pojem gen, 1944 – Avery, MacLeod, McCarty identifikovali DNA jako odpovědnou za přenos genetického náboje, 1953 – Watson, Crick definovali strukturu DNA jako dvoušroubovici, 1965 – Nirenberg, Khorana definovali genetický kód, 1977 – Sanger vynalezl metodu sekvenování DNA, 1986 – Hood zautomatizoval DNA sekvenování, 1990 – Watson začal projekt s názvem lidský genom, 1995 – Venter započal éru masivního sekvenování DNA, 2001 – byl představen první návrh lidského genomu, 2008 – poprvé je sekvenován genom rakoviny, 2012 – Torrent oznámil, že je schopen sekvenovat genom za méně než 1000 dolarů)

Dokončení sekvenování lidského genomu bylo provedeno pomocí metody známé jako Sangerova dideoxy metoda nebo metoda enzymatického ukončení řetězce (Kircher, 2010).

### 5.2.1 SANGEROVA METODA SEKVENOVÁNÍ

Sangerova metoda byla vyvinuta Frederickem Sangerem v roce 1975, ale na trh byla uvedena v roce 1977 (Zimmermann, 1988).

Ačkoliv většina technik sekvenování je zcela odlišných, jejich postupy lze shrnout do obecného pracovního toku, který je zásadní pro dosažení sekvenování s nízkými náklady a vysokou výkonností. Sangerova metoda sekvenování patří do první generace



sekvenačních technologií a stanovila základ, o který se opíral vývoj následujících technologií, jakými jsou metody sekvenování nové generace, viz Obr. 16 (Verma, 2017).



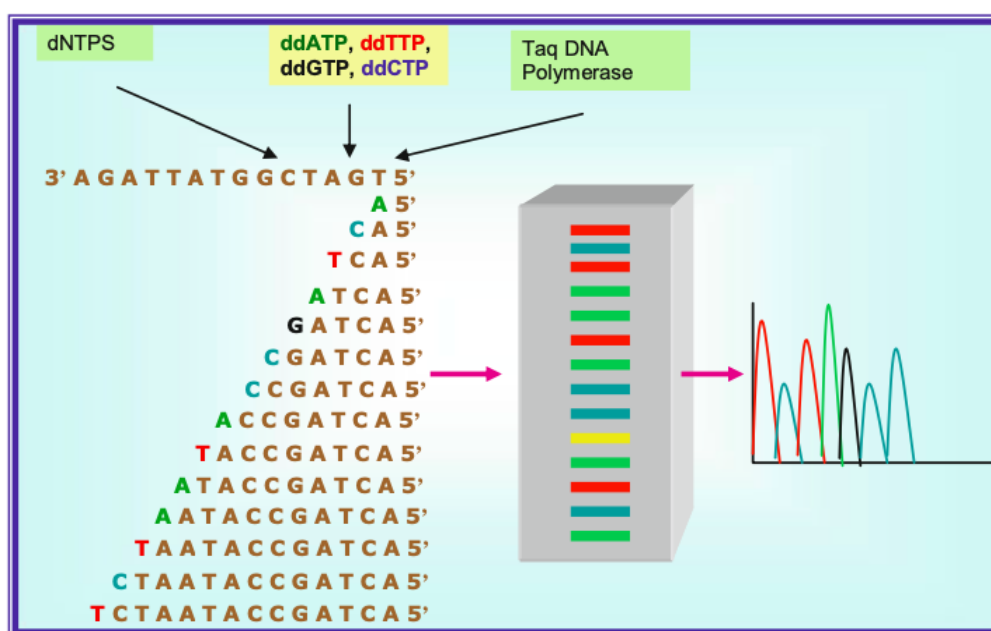
**Obrázek 16** – Pracovní diagram jednotlivých kroků sekvenování genomu (převzato z knihy Genome Sequencing od Mensi Verma a přeloženo)

Ačkoliv byly zavedeny nové techniky, stále se připisuje velké množství údajů o sekvencích DNA, které byly získány technologiemi první generace. I když jsou tyto technologie starší, pomalejší a nákladnější, i po paralelizaci a automatizaci, stále se používají ve studiích, kde nelze přesnost ani v malé míře ohrozit, včetně syntetických oligonukleotidů a genových cílů (Stranneheim, 2012; Hutchison, 2007). Hlavní výhoda použití této metody spočívá v její větší přesnosti (Franca, 2002).

Tato technika zahrnuje sedm různých komponent pro provádění sekvenování. Patří mezi ně ssDNA templát, který má být sekvenován, primery, Taq polymeráza pro

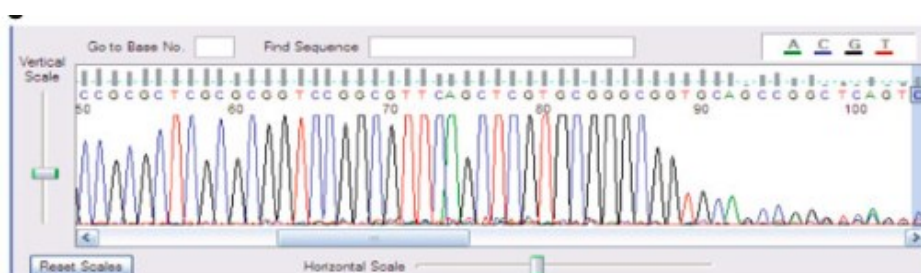
amplifikaci templátového řetězce, pufr, deoxynukleotidy (dNTP), fluorescenčně značené dideoxynukleotidy (ddNTP) a DMSO k vyšetření sekundárních struktur, pokud jsou vytvořeny ve vlákně templátu (Sanger, 1977; Ansorge, 1989).

Po zavedení prošla Sanderova metoda sekvenování dalšími úpravami pro automatizovaný sekvenční protokol. Jedním z takových pokroků bylo sekvenování s terminačním barvivem, viz Obr. 17 a 18 (Rosenthal, 2009).



**Obrázek 17** – Kapilární elektroforéza

(převzato od Verma [https://sci-hub.do/10.1007/978-1-4939-6622-6\\_1](https://sci-hub.do/10.1007/978-1-4939-6622-6_1))



**Obrázek 18** – Elektroferogram sekvence DNA

(převzato od Verma [https://sci-hub.do/10.1007/978-1-4939-6622-6\\_1](https://sci-hub.do/10.1007/978-1-4939-6622-6_1))

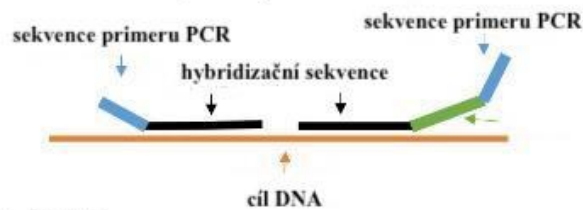
### 5.3 METODA Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

Metoda MLPA je unikátní metoda vyvinutá holandským výrobcem MRC Holand charakterizovaná jako multiplexní amplifikace závislá na ligaci sond. Tato technika je založená na multiplexní polymerázové řetězové reakci (PCR) pro relativní kvantifikaci až 60 různých cílových sekvencí v jedné reakci. Tato metoda dokáže detekovat současně

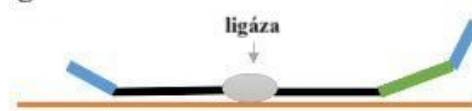
genomové duplikace, bodové mutace, odchylky počtu kopií a methylaci DNA. Metoda MLPA umožňuje použití jednoho protokolu pro všechny aplikace MLPA, který zahrnuje čtyři kroky, kterými jsou, viz Obr. 19 (Hömig-Hölzel, 2012; Schouten, 2002):

- denaturace a hybridizace
- ligace
- PCR s univerzálními primery X a Y
- separace fragmentů pomocí kapilární elektroforózy a fragmentové analýzy

### 1 - denaturace, 2 - hybridizace



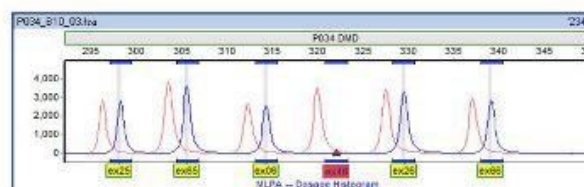
### 3 - ligace



### 4 - amplifikace



### 5 - oddělení fragmentů a analýza dat



**Obrázek 19** – Přehled jednotlivých kroků technologie MLPA

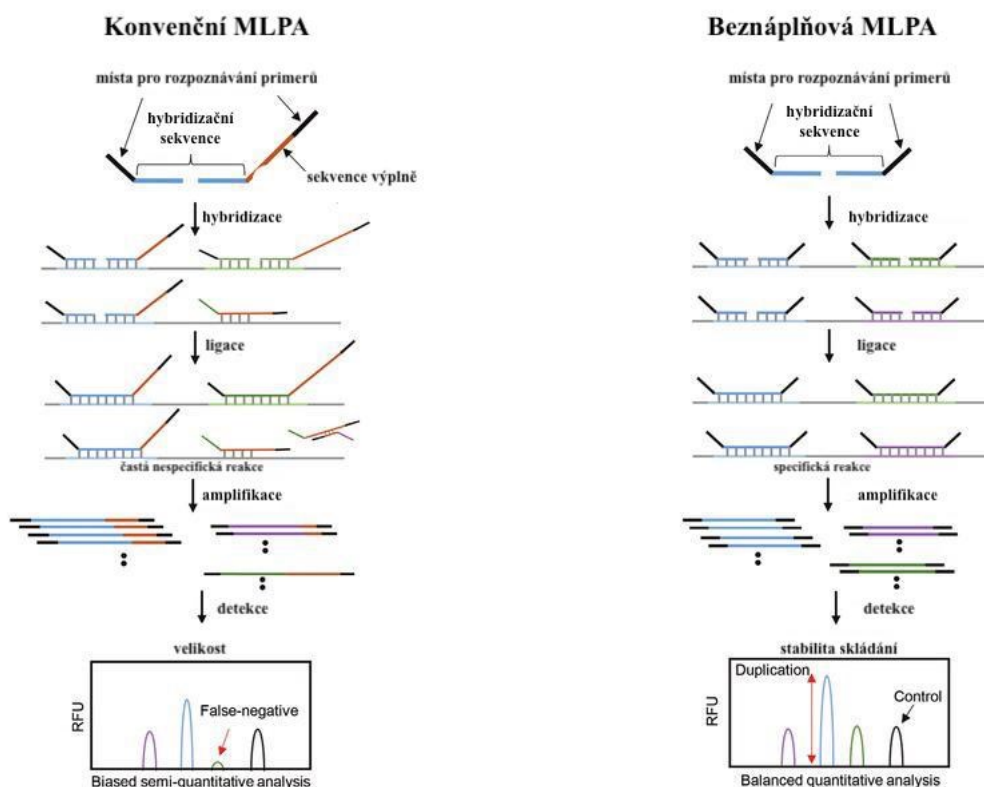
(převzato od Hömig-Hölzela <https://sci-hub.do/10.1097/PDM.0b013e3182595516>)

Změna počtu kopií detekované sekvence, tzv. cílových sekvencí, vede k nižšímu nebo vyššímu relativnímu množství produktu amplifikované sondy. Vysoká reprodukovatelnost ligačních amplikonových reakcí umožňuje detekovat ztráty (např. heterozygotní delece) či zisky (např. heterozygotní duplikace) porovnáním relativní síly signálu sond mezi vzorkem pacienta a normálním, tzv. referenčním vzorkem DNA. Změny v počtu kopií lze dosáhnout porovnáním relativního signálu této sondy s průměrným relativním signálem stejné sondy v referenčním vzorku. Dále je vždy navrženo několik

referenčních sond zahrnutých ve směsích sond, aby bylo možné porovnat signály sondy mezi jednotlivými vzorky. U nádorového vzorku by tyto sondy měly cílit na chromozomovou oblast, ve kterých se neočekávají změny počtu kopií (delece a amplifikace). Jako reference by se neměly používat onkogeny nebo supresory nádoru, které byly spojeny se zahájením a progresí sledovaného karcinomu, protože je pravděpodobnější, že budou ovlivněny počtem kopií než jiné geny (Hömig-Hölzel, 2012).

Protože jsou nádorové buňky často geneticky nestabilní, doporučuje se pro nádorové aplikace MLPA techniky použít více referenčních sond. Použití alespoň 10 referenčních sond ve směsi unikátních práb MLPA analýzy je doporučeným minimálním množstvím referenčních sond pro spolehlivou analýzu dat. Distribuce referenčních sond na několik chromozomů navíc snižuje riziko ovlivnění normalizační konstanty, a tím zvyšuje robustnost normalizace dat, viz Obr. 20 (Hömig-Hölzel, 2012).

Analýza MLPA reakcí vzorků nádorů poskytuje informace o průměrné situaci v buňkách, ze kterých byl vzorek DNA purifikován. Zisky nebo ztráty genomových oblastí nebo genů nemusí být detekovány, pokud je procento nádorových buněk nízké. Ale oblast, kde je umístěno více sond MLPA, lze již detekovat, pokud je přítomno pouze 10-20 % nádorových buněk s heterozygotní delecí (Van Opstal, 2009).



**Obrázek 20** – Detekce bodových mutací metodou MLPA

(převzato od Seon Hee Yim [https://www.researchgate.net/figure/Multiplex-ligation-dependent-probe-amplification-MLPA-technology-for-detecting-copy\\_fig2\\_276535501](https://www.researchgate.net/figure/Multiplex-ligation-dependent-probe-amplification-MLPA-technology-for-detecting-copy_fig2_276535501))

V diagnostice nádorů je přesná, spolehlivá a rychlá diagnóza nezbytná pro včasné zahájení optimální léčby pacienta, aby se zabránilo další progresi a metastázování nádoru. Přes svou limitaci je MLPA metoda, která může poskytnout několik z těchto aspektů, cenným nástrojem pro podporu a doplnění klasické patologie.

Pro MLPA metodu je zapotřebí malé množství DNA, stačí 20 až 200 ng vzorku. Přesné měření koncentrace DNA vzorku může být obtížné kvůli kontaminujícím látkám. Spolehlivé výsledky poskytují čerstvě zmrazené vzorky nádorové DNA i vysoce fragmentované vzorky nádorové DNA z parafinových bločků (FFPE). Výsledky z měření lze získat do 24 hodin díky snadnému postupu. Na rozdíl od metody FISH a karyotypingu je snadné metodu MLPA automatizovat, protože není příliš pracná a lze provádět na tzv. 96 jamkových PCR destičkách. Nízké náklady na reakci a skutečnost, že je potřeba pouze standardní výbava pro PCR a sekvenování, udržuje celkové náklady nízké. MLPA je tedy vhodná metoda pro screening rizika nádorového onemocnění, kde je třeba analyzovat velké množství vzorků nezávisle na akutní indikaci (Schouten, 2002).

## 6 LÉČBA

Hereditární nádorová onemocnění u dětí vyžadují speciální přístup k pacientovi. Protože se jedná o dětské pacienty, je léčba volena po domluvě s rodiči (či zákonnými zástupci).

Nádorová onemocnění vyskytující se v dětském věku vedla k zavedení specializovaných oddělení, tedy pediatrických onkologických center, která jsou schopna poskytnout komplexní péči o děti a dospívající. Tato komplexní centra dětské onkologie jsou v České republice 2 a nacházejí se v Praze a Brně (Bajčiová, 2021).

Za posledních třicet let poklesla úmrtnost dětí s hereditárními nádorovými onemocněními o více než 50 %. A to tedy znamená, že přežije více než 85 % dětí a mladistvých s tímto onemocněním.

Jako protinádorová terapie se v léčbě používají nejčastěji tyto tři postupy (Adam, 2010):

- chirurgický zákrok
- radioterapie
- chemoterapie

První dvě metody, tedy chirurgický zákrok a radioterapie slouží především k lokální kontrole nádoru a zamezení jeho růstu. Třetí metoda, chemoterapie je léčba cytostatiky, které ničí především nádorové buňky, ale může zasáhnout i buňky zdravé. Proto má chemoterapie i nežádoucí účinky. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří únava, slabost, snížená krvetvorba, a tedy nižší počet červených krvinek, krevních destiček a snížený počet bílých krvinek, což způsobuje větší náchylnost pacienta ke vzniku infekcí. Další nežádoucí účinky jsou nevolnost, nadměrné padání vlasů, zarudnutí kůže, průjem nebo zácpa. Trvání nežádoucích účinků je u každého pacienta odlišné. Nežádoucí účinky závisí především na druhu a dávce podaného léčiva (Vorlíček, 2013).

Úspěchy v léčbě dětských hereditárních onkologických onemocnění stále nejsou 100%. Nadále existuje až 20 % dětí, pro které není ani jeden způsob léčby možný, a tedy je nedokážeme vyléčit. V tomto případě je nezbytné hledat další možnosti léčby.

Součástí léčby u dětských a dospívajících pacientů s nádorovým onemocněním je i léčba následných, tedy sekundárních komplikací, tzv, podpůrná léčba. Do podpůrné léčby řadíme léčbu bolesti, vzniklých infekcí a také psychologickou podporu.

U onkologických pacientů je dále velmi důležitá i terminální léčba, která probíhá v hospicích nebo mohou být pacienti léčeni doma, takzvaná homecare, kdy k pacientovi dochází specializovaná sestra nebo lékař (Bajčiová, 2021).

## 7 ZÁVĚR

Hereditární syndromy predisponující k nádorovým onemocněním v dětském věku tvoří až 30 % zhoubných nádorů diagnostikovaných u dětských pacientů. V posledních letech jsou dostupnější informace o vzniku nádorových syndromů a o mechanismu jejich vzniku. U nádorových onemocnění dětí a dospívajících je velmi důležitá včasná a správná diagnóza. Nedílnou a klíčovou součástí diagnostiky je genetické vyšetření umožňující odhalení původu nádorového onemocnění.

U rodinných příslušníků pacienta, u kterého byla odhalena patogenní varianta asociována s nádorovým onemocněním, je indikováno prediktivní testování nalezené, často pro rodinu unikátní, familiární varianty. Prediktivní testování má enormní význam v případě odhalení mutace před projevy nádorového onemocnění, neboť bezpříznakový nosič patogenní varianty je zařazen do preventivních programů pro včasné odhalení nádorového onemocnění. Preventivní opatření jsou v těchto případech vysoce účinná.

V dnešní době je známo přibližně 200 typů hereditárních syndromů s nádorovou predispozicí, přičemž zhruba 33 syndromů je s predispozicí u dětských pacientů. Syndromy, které vznikají v dětském věku, se liší od nádorových syndromů dospělého věku. U dětí je většinou první, kdo detekuje první příznaky nádorového onemocnění pediatr. Nicméně rozpoznání hereditárních syndromů může být někdy obtížné, protože projevy onemocnění nejsou zcela specifické a onemocnění se může vyskytovat u jiných členů rodiny, avšak v jiné manifestaci.

Od roku 2009 na dětské onkologii ve FN v Brně sledují rostoucí incidenci hereditárních nádorových predispozičních syndromů. V posledních letech počet pacientů s germinálními mutacemi stále roste, ale daří se rozpoznat typické znaky dysmorfizmu dříve, než se rozvine zhoubné nádorové onemocnění.

Pacienti, kteří absolvují léčbu a jsou úspěšně vyléčeni, jsou stále vedeni v dispenzární ambulantní péči do věku 18 let, někdy i delší dobu. Pacienti jsou nadále ambulantně kontrolováni z důvodu včasného zaznamenání případného návratu nemoci. Po pěti letech remise je předpokládané riziko návratu nádorového onemocnění minimální.



## 8 POUŽITÁ LITERATURA

ABRAMSON, DAVID H. a AMY C. SCHEFLER, 2004. UPDATE ON RETINOBLASTOMA. *Retina* [online]. **24**(6), 828-848 [cit. 2021-03-22]. ISSN 0275-004X. Dostupné z: 10.1097/00006982-200412000-00002

ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK, c2010. *Speciální onkologie: příznaky, diagnostika a léčba maligních chorob*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-648-9.

ALBERT, Daniel M., 1987. Historic Review of Retinoblastoma. *Ophthalmology* [online]. **94**(6), 654-662 [cit. 2021-03-17]. ISSN 01616420. Dostupné z: 10.1016/S0161-6420(87)33407-4

ALTER, Blanche P., 1996. Fanconi's anemia and malignancies. *American Journal of Hematology* [online]. **53**(2), 99-110 [cit. 2021-04-03]. ISSN 03618609. Dostupné z: 10.1002/(SICI)1096-8652(199610)53:299::AID-AJH73.0.CO;2-Z

ANHEIM, Mathieu, Christine TRANCHANT a Michel KOENIG, 2012. The Autosomal Recessive Cerebellar Ataxias. *New England Journal of Medicine* [online]. **366**(7), 636-646 [cit. 2021-04-04]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: 10.1056/NEJMra1006610

ANSORGE, W., H. VOSS, U. WIRKNER, C. SCHWAGER, J. STEGEMANN, R. PEPPERKOK, J. ZIMMERMANN a H. ERFLE, 1989. Automated sanger DNA sequencing with one label in less than four lanes on gel. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* [online]. **20**(1), 47-52 [cit. 2021-5-3]. ISSN 0165022X. Dostupné z: 10.1016/0165-022X(89)90080-8

ARORA, Harleen, Anna H. CHACON, Sonal CHOUDHARY, Michael P. MCLEOD, Lauren MESHKOV, Keyvan NOURI a Jan IZAKOVIC, 2014. Bloom syndrome. *International Journal of Dermatology* [online]. **53**(7), 798-802 [cit. 2021-03-29]. ISSN 00119059. Dostupné z: 10.1111/ijd.12408

AUERBACH, Arleen D. a R.G. ALLEN, 1991. Leukemia and preleukemia in Fanconi anemia patients. *Cancer Genetics and Cytogenetics* [online]. **51**(1), 1-12 [cit. 2021-04-02]. ISSN 01654608. Dostupné z: 10.1016/0165-4608(91)90002-C

BAJČIOVÁ, Viera, 2021. Linkos. *Linkos* [online]. 2021: Klinika dětské onkologie FN Brno [cit. 2021-5-18]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/lecba/vekova-specifika/solidni-nadory-detskeho-veku/>

BALLINGER, Mandy L, David L GOODE, Isabelle RAY-COQUARD, et al., 2016. Monogenic and polygenic determinants of sarcoma risk: an international genetic study. *The Lancet Oncology* [online]. **17**(9), 1261-1271 [cit. 2021-04-16]. ISSN 14702045. Dostupné z: 10.1016/S1470-2045(16)30147-4

BARRETT, J C a R W WISEMAN, 1987. Cellular and molecular mechanisms of multistep carcinogenesis: relevance to carcinogen risk assessment. *Environmental Health Perspectives* [online]. **76**(76), 65-70 [cit. 2021-03-22]. ISSN 0091-6765. Dostupné z: 10.1289/ehp.877665

BARRETT, J C, 1993. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environmental Health Perspectives* [online]. **100**(100), 9-20 [cit. 2021-03-22]. ISSN 0091-6765. Dostupné z: 10.1289/ehp.931009

BECKWITH, J. Bruce, 1998. Vignettes from the history of overgrowth and related syndromes. *American Journal of Medical Genetics* [online]. **79**(4), 238-248 [cit. 2021-03-29]. ISSN 0148-7299. Dostupné z: 10.1002/(SICI)1096-8628(19981002)79:4238::AID-AJMG33.0.CO;2-I

BELMONT, John W., 2013. *T Cell and Combined Immunodeficiency Disorders*. New York: OMMBID. ISBN 10.1036/ommbid.218. Dostupné z: 10.1036/ommbid.218

BERLINER, Janice L. a Angela Musial FAY, 2007. Risk Assessment and Genetic Counseling for Hereditary Breast and Ovarian Cancer: Recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *Journal of Genetic Counseling* [online]. **16**(3), 241-260 [cit. 2021-03-07]. ISSN 1059-7700. Dostupné z: 10.1007/s10897-007-9090-7

BIGNOLD, Leon P., 2020. Hereditary predispositions to tumors, tumor suppressor genes, and their clinico-genomic complexities. *Principles of Tumors* [online]. 2. vydání. Austrálie: Elsevier, 2020, s. 105-144 [cit. 2021-03-07]. ISBN 9780128169209. Dostupné z: 10.1016/B978-0-12-816920-9.00005-5

BODER, E. a R.P. SEDGWICK, 1957. A familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection: a preliminary report on 7 children, an autopsy, and a case history. *Univ Southern Calif Med Bull.* **1957**(9), 15-28.

BOVERI, Theodor, 1914. *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren*. Německo: Jena: Fischer. ISBN 8075786.

BREMS, Hilde, Eline BEERT, Thomy DE RAVEL a Eric LEGIUS, 2009. Mechanisms in the pathogenesis of malignant tumours in neurofibromatosis type 1. *The Lancet Oncology* [online]. **10**(5), 508-515 [cit. 2021-03-23]. ISSN 14702045. Dostupné z: 10.1016/S1470-2045(09)70033-6

CORREA, Hernán, 2016. Li–Fraumeni Syndrome. *Journal of Pediatric Genetics* [online]. **05**(02), 084-088 [cit. 2021-03-18]. ISSN 2146-4596. Dostupné z: 10.1055/s-0036-1579759

DIMARAS, Helen a Timothy W. CORSON, 2019. Retinoblastoma, the visible CNS tumor: A review. *Journal of Neuroscience Research* [online]. **97**(1), 29-44 [cit. 2021-03-18]. ISSN 03604012. Dostupné z: 10.1002/jnr.24213

EVANS, D G, S M HUSON, D DONNAI, et al., 1992. A genetic study of type 2 neurofibromatosis in the United Kingdom. I. Prevalence, mutation rate, fitness, and confirmation of maternal transmission effect on severity. *Journal of Medical Genetics* [online]. **29**(12), 841-846 [cit. 2021-03-27]. ISSN 1468-6244. Dostupné z: 10.1136/jmg.29.12.841

- FAN, Jian-Bing, Mark S. CHEE a Kevin L. GUNDERSON, 2006. Highly parallel genomic assays. *Nature Reviews Genetics* [online]. **7**(8), 632-644 [cit. 2021-04-20]. ISSN 1471-0056. Dostupné z: 10.1038/nrg1901
- FANCONI, G., 1927. Familiare infantile perniziosaartige Anämie. *Jahrbuch Kinder*. **1927**(117), 257. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-012448510-5.50106-0>
- FRANÇA, Lilian T. C., Emanuel CARRILHO a Tarso B. L. KIST, 2002. A review of DNA sequencing techniques. *Quarterly Reviews of Biophysics* [online]. **35**(2), 169-200 [cit. 2021-5-3]. ISSN 0033-5835. Dostupné z: 10.1017/S0033583502003797
- GARBER, Judy E. a Kenneth OFFIT, 2005. Hereditary Cancer Predisposition Syndromes. *Journal of Clinical Oncology* [online]. **23**(2), 276-292 [cit. 2021-03-07]. ISSN 0732-183X. Dostupné z: 10.1200/JCO.2005.10.042
- GATTI, Richard A., Izzet BERKEL, Elena BODER, et al., 1988. Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22–23. *Nature* [online]. **336**(6199), 577-580 [cit. 2021-04-04]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: 10.1038/336577a0
- GULANI, Aaishwariya a Tracey WEILER, 2020. Genetics, Autosomal Recessive. *NCBI* [online]. Rockville Pike: StatPearls Publishing [cit. 2021-03-08]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546620/>
- GUTMANN, D. H., L. F. PARADA, A. J. SILVA a N. RATNER, 2012. Neurofibromatosis Type 1: Modeling CNS Dysfunction. *Journal of Neuroscience* [online]. **32**(41), 14087-14093 [cit. 2021-03-23]. ISSN 0270-6474. Dostupné z: 10.1523/JNEUROSCI.3242-12.2012
- GUTMANN, David H., 1997. The Diagnostic Evaluation and Multidisciplinary Management of Neurofibromatosis 1 and Neurofibromatosis 2. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* [online]. **278**(1), 51-57 [cit. 2021-03-23]. ISSN 0098-7484. Dostupné z: 10.1001/jama.1997.03550010065042
- HEBRA, F., 1874. On diseases of the skin including exanthemata. *New Sydenham Soc*. **1874**(61), 252–8.
- HENNINGS, H., A. B. GLICK, D. A. GREENHALGH, D. L. MORGAN, J. E. STRICKLAND, T. TENNENBAUM a S. H. YUSPA, 1993. Critical Aspects of Initiation, Promotion, and Progression in Multistage Epidermal Carcinogenesis. *Experimental Biology and Medicine* [online]. **202**(1), 1-8 [cit. 2021-03-23]. ISSN 1535-3702. Dostupné z: 10.3181/00379727-202-43511A
- HOFMANOVÁ, Jiřina, 2013. *Genotoxicita a karcinogeneze*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 1802-128X.
- HÖMIG-HÖLZEL, Cornelia a Suvi SAVOLA, 2012. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) in Tumor Diagnostics and Prognostics. *Diagnostic Molecular Pathology* [online]. **21**(4), 189-206 [cit. 2021-5-14]. ISSN 1052-9551. Dostupné z: 10.1097/PDM.0b013e3182595516

HRUŠKA, Libor, 2019. Rare Hereditary Burden associated with a Hypercalcemic Small-Cell Carcinoma of Cervix in a Young Female Patient. *Klinická onkologie*. **2019**(32(6), 456-462. Dostupné z: 10.14735/amko2019456.

HUSON, S M, D A COMPSTON a P S HARPER, 1989. A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in south east Wales. II. Guidelines for genetic counselling. *Journal of Medical Genetics* [online]. **26**(11), 712-721 [cit. 2021-03-23]. ISSN 1468-6244. Dostupné z: 10.1136/jmg.26.11.712

HUTCHISON, C. A., 2007. DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Research* [online]. **35**(18), 6227-6237 [cit. 2021-5-3]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: 10.1093/nar/gkm688

CHOUDHURI, Supratim, Ronald CHANDERBHAN a Antonia MATTIA, 2018. Carcinogenesis. *Veterinary Toxicology*. Elsevier, 2018, **2018**(9780128114100), 339-354. ISBN 9780128114100. Dostupné z: 10.1016/B978-0-12-811410-0.00020-9

JUNG, Ernst G., 1986. Xeroderma Pigmentosum. *International Journal of Dermatology* [online]. **25**(10), 629-633 [cit. 2021-04-04]. ISSN 0011-9059. Dostupné z: 10.1111/j.1365-4362.1986.tb04522.x

KAMPS, Rick, Rita BRANDÃO, Bianca BOSCH, Aimee PAULUSSEN, Sofia XANTHOULEA, Marinus BLOK a Andrea ROMANO, 2017. Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **18**(2), 1-57 [cit. 2021-04-20]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: 10.3390/ijms18020308

KANEKO, H, T FUKAO a N KONDO, 2004. The function of RecQ helicase gene family (especially BLM) in DNA recombination and joining. *Advances in Biophysics* [online]. **38**(38), 45-64 [cit. 2021-03-29]. ISSN 0065227X. Dostupné z: 10.1016/S0065-227X(04)80061-3

KAROW, Julia K, Leonard WU a Ian D HICKSON, 2000. RecQ family helicases: roles in cancer and aging. *Current Opinion in Genetics & Development* [online]. **10**(1), 32-38 [cit. 2021-03-29]. ISSN 0959437X. Dostupné z: 10.1016/S0959-437X(99)00039-8

KAYES, L.M., 1994. Deletions spanning the neurofibromatosis 1 gene: identification and phenotype of five patients. *American Journal of Human Genetics*. **1994**(54(3), 424-436. 8116612.

KIRCHER, Martin a Janet KELSO, 2010. High-throughput DNA sequencing - concepts and limitations. *BioEssays* [online]. **32**(6), 524-536 [cit. 2021-5-3]. ISSN 02659247. Dostupné z: 10.1002/bies.200900181

KLEIJER, Wim J., Vincent LAUGEL, Mark BERNEBURG, et al., 2008. Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *DNA Repair* [online]. **7**(5), 744-750 [cit. 2021-04-04]. ISSN 15687864. Dostupné z: 10.1016/j.dnarep.2008.01.014

- KLUWE, L., 2003. Molecular study of frequency of mosaicism in neurofibromatosis 2 patients with bilateral vestibular schwannomas. *Journal of Medical Genetics* [online]. **40**(2), 109-114 [cit. 2021-03-27]. ISSN 14686244. Dostupné z: 10.1136/jmg.40.2.109
- KNAPKE, Sara, Rajaram NAGARAJAN, Judy CORRELL, Debra KENT a Karen BURNS, 2012. Hereditary cancer risk assessment in a pediatric oncology follow-up clinic. *Pediatric Blood & Cancer* [online]. **58**(1), 85-89 [cit. 2021-03-07]. ISSN 15455009. Dostupné z: 10.1002/pbc.23283
- KNUDSON, A. G., 1971. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **68**(4), 820-823 [cit. 2021-03-08]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: 10.1073/pnas.68.4.820
- KNUDSON, Alfred G., 2001. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Reviews Cancer* [online]. **1**(2), 157-162 [cit. 2021-03-07]. ISSN 1474-175X. Dostupné z: 10.1038/35101031
- KONTOMANOLIS, Emmanuel, 2020. Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Research*. **2020**(40), 6009-6015. Dostupné z: <https://doi.org/10.21873/anticancer.14622>
- KORF, Bruce R., 2013. Neurofibromatosis. *Pediatric Neurology Part I* [online]. USA: Elsevier, 2013, s. 333-340 [cit. 2021-03-23]. Handbook of Clinical Neurology. ISBN 9780444528919. Dostupné z: 10.1016/B978-0-444-52891-9.00039-7
- LANDER, E.S., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* [online]. **409**(6822), 860-921 [cit. 2021-5-3]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: 10.1038/35057062
- LEPPIG, Kathleen A., Paige KAPLAN, David VISKOCHIL, Molly WEAVER, June ORTENBERG a Karen STEPHENS, 1997. Familial neurofibromatosis 1 microdeletions: Cosegregation with distinct facial phenotype and early onset of cutaneous neurofibromata. *American Journal of Medical Genetics* [online]. **73**(2), 197-204 [cit. 2021-03-23]. ISSN 01487299. Dostupné z: 10.1002/(SICI)1096-8628(1997)73:2197::AID-AJMG173.0.CO;2-P
- LI, M., 1998. Molecular genetics of Wiedemann-Beckwith syndrome. *Am J Med Genet* . **1998**(79(4)), 253-9. 9781904.
- MACCARTHY, A., G.J. DRAPER, Eva STELIAROVA-FOUCHER a J.E. KINGSTON, 2006. Retinoblastoma incidence and survival in European children (1978–1997). Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *European Journal of Cancer* [online]. **42**(13), 2092-2102 [cit. 2021-03-22]. ISSN 09598049. Dostupné z: 10.1016/j.ejca.2006.06.003
- MAUTNER, V. F., 1997. Skin abnormalities in neurofibromatosis 2. *Arch Dermatol*. **1997** 133(12), 1539-43. 9420538.

- MENDEL, Gregor a Reginald Crundall PUNNETT, 1866. *Versuche über Pflanzen-Hybriden* [online]. Brünn: Im Verlage des Vereines [cit. 2021-03-22]. ISBN 10.5962/bhl.title.61004. Dostupné z: 10.5962/bhl.title.61004
- METZKER, Michael L., 2010. Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics* [online]. **11**(1), 31-46 [cit. 2021-04-20]. ISSN 1471-0056. Dostupné z: 10.1038/nrg2626
- MONSALVE, Johanna, Jeevesh KAPUR, David MALKIN a Paul S. BABYN, 2011. Imaging of Cancer Predisposition Syndromes in Children. *RadioGraphics* [online]. **31**(1), 263-280 [cit. 2021-03-17]. ISSN 0271-5333. Dostupné z: 10.1148/rg.311105099
- MORK, Maureen E., Y. Nancy YOU, Jun YING, Sarah A. BANNON, Patrick M. LYNCH, Miguel A. RODRIGUEZ-BIGAS a Eduardo VILAR, 2015. High Prevalence of Hereditary Cancer Syndromes in Adolescents and Young Adults With Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* [online]. **33**(31), 3544-3549 [cit. 2021-04-16]. ISSN 0732-183X. Dostupné z: 10.1200/JCO.2015.61.4503
- MUSSA, Alessandro, Silvia RUSSO, Agostina DE CRESCENZO, et al., 2016. (Epi)genotype–phenotype correlations in Beckwith–Wiedemann syndrome. *European Journal of Human Genetics* [online]. **24**(2), 183-190 [cit. 2021-03-29]. ISSN 1018-4813. Dostupné z: 10.1038/ejhg.2015.88
- MUSSA, Alessandro, Stefania DI CANDIA, Silvia RUSSO, et al., 2016. Recommendations of the Scientific Committee of the Italian Beckwith–Wiedemann Syndrome Association on the diagnosis, management and follow-up of the syndrome. *European Journal of Medical Genetics* [online]. **59**(1), 52-64 [cit. 2021-03-29]. ISSN 17697212. Dostupné z: 10.1016/j.ejmg.2015.11.008
- NAROD, SA, C STILLER a GM LENOIR, 1991. An estimate of the heritable fraction of childhood cancer. *British Journal of Cancer* [online]. **63**(6), 993-999 [cit. 2021-03-22]. ISSN 0007-0920. Dostupné z: 10.1038/bjc.1991.216
- NISSENKORN, Andreea, Yael LEVY-SHRAGA, Yonit BANET-LEVI, Avishay LAHAD, Ifat SAROUK a Dalit MODAN-MOSES, 2016. Endocrine abnormalities in ataxia telangiectasia: findings from a national cohort. *Pediatric Research* [online]. **79**(6), 889-894 [cit. 2021-04-04]. ISSN 0031-3998. Dostupné z: 10.1038/pr.2016.19
- ORTIZ, Michael V. a Ira J. DUNKEL, 2016. Retinoblastoma. *Journal of Child Neurology* [online]. **31**(2), 227-236 [cit. 2021-03-17]. ISSN 0883-0738. Dostupné z: 10.1177/0883073815587943
- PAGON, Roberta A., 2021. *GeneReviews*. University of Washington, Seattle: University of Washington. ISBN 2372-0697.
- PATRONAS, Nicholas J., Nikos COURCOUTSAKIS, Christina M. BROMLEY, Gregory L. KATZMAN, Mia MACCOLLIN a Dilys M. PARRY, 2001. Intramedullary and Spinal Canal Tumors in Patients with Neurofibromatosis 2: MR Imaging Findings and Correlation with Genotype. *Radiology* [online]. **218**(2), 434-442 [cit. 2021-03-27]. ISSN 0033-8419. Dostupné z: 10.1148/radiology.218.2.r01fe40434

PEARLMAN, Rachel, Wendy L. FRANKEL, Benjamin SWANSON, et al., 2017. Prevalence and Spectrum of Germline Cancer Susceptibility Gene Mutations Among Patients With Early-Onset Colorectal Cancer. *JAMA Oncology* [online]. **3**(4), 464-471 [cit. 2021-04-16]. ISSN 2374-2437. Dostupné z: 10.1001/jamaoncol.2016.5194

PITOT, Henry C., Thomas GOLDSWORTHY a Susan MORAN, 1981. The natural history of carcinogenesis: Implications of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer. *Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry* [online]. **17**(2), 133-146 [cit. 2021-03-22]. ISSN 0275-3723. Dostupné z: 10.1002/jsscb.380170204

POP, Mihai a Steven L. SALZBERG, 2008. Bioinformatics challenges of new sequencing technology. *Trends in Genetics* [online]. **24**(3), 142-149 [cit. 2021-04-20]. ISSN 01689525. Dostupné z: 10.1016/j.tig.2007.12.006

RAMKUMAR, H., 2011. Ophthalmic manifestations and histopathology of xeroderma pigmentosum: two clinicopathological cases and a review of the literature. *Surv Ophthalmol.* **2011** 56(4), 348-61. Dostupné z: 10.1016/j.survophthal.2011.03.001

REDNAM, Surya P., 2019. Updates on progress in cancer screening for children with hereditary cancer predisposition syndromes. *Current Opinion in Pediatrics* [online]. **31**(1), 41-47 [cit. 2021-03-17]. ISSN 1040-8703. Dostupné z: 10.1097/MOP.0000000000000709

RIPPERGER, Tim, Stefan S. BIELACK, Arndt BORKHARDT, et al., 2017. Childhood cancer predisposition syndromes-A concise review and recommendations by the Cancer Predisposition Working Group of the Society for Pediatric Oncology and Hematology. *American Journal of Medical Genetics Part A* [online]. **173**(4), 1017-1037 [cit. 2021-04-16]. ISSN 15524825. Dostupné z: 10.1002/ajmg.a.38142

RODJAN, F., P. DE GRAAF, P. VAN DER VALK, et al., 2015. Detection of Calcifications in Retinoblastoma Using Gradient-Echo MR Imaging Sequences: Comparative Study between In Vivo MR Imaging and Ex Vivo High-Resolution CT. *American Journal of Neuroradiology* [online]. **36**(2), 355-360 [cit. 2021-03-18]. ISSN 0195-6108. Dostupné z: 10.3174/ajnr.A4163

ROSENTHAL, André a D. Stephen CHARNOCK-JONES, 2009. New protocols for DNA sequencing with dye terminators. *DNA Sequence* [online]. **3**(1), 61-64 [cit. 2021-5-3]. ISSN 1042-5179. Dostupné z: 10.3109/10425179209039697

ROULEAU, Guy A., Wladimir WERTELECKI, Jonathan L. HAINES, et al., 1987. Genetic linkage of bilateral acoustic neurofibromatosis to a DNA marker on chromosome 22. *Nature* [online]. **329**(6136), 246-248 [cit. 2021-03-27]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: 10.1038/329246a0

RUEBEN, Lewis G. a Brittany SIMPSON, 2020. StatPearls. *NCBI* [online]. Rockville Pike: StatPearls Publishing [cit. 2021-03-08]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557512/>

- SANGER, F., G. M. AIR, B. G. BARRELL, et al., 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage  $\phi$ X174 DNA. *Nature* [online]. **265**(5596), 687-695 [cit. 2021-5-3]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: 10.1038/265687a0
- SANGER, F., S. NICKLEN a A. R. COULSON, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **74**(12), 5463-5467 [cit. 2021-5-3]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: 10.1073/pnas.74.12.5463
- SÉGUREL, Laure, Minyoung J. WYMAN a Molly PRZEWORSKI, 2014. Determinants of Mutation Rate Variation in the Human Germline. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* [online]. **15**(1), 47-70 [cit. 2021-03-08]. ISSN 1527-8204. Dostupné z: 10.1146/annurev-genom-031714-125740
- SHIELDS, Carol L. a Jerry A. SHIELDS, 2017. Diagnosis and Management of Retinoblastoma. *Cancer Control* [online]. **11**(5), 317-327 [cit. 2021-03-18]. ISSN 1073-2748. Dostupné z: 10.1177/107327480401100506
- SHILOH, Yosef a Michael B. KASTAN, 2001. ATM: Genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. *Adv Cancer Res*. Elsevier, 2001, **2001**(83), 209-254. Advances in Cancer Research. ISBN 9780120066834. Dostupné z: 10.1016/S0065-230X(01)83007-4
- SCHALCH, Don S., Dale E. MCFARLIN a Mahlon H. BARLOW, 1970. An Unusual Form of Diabetes Mellitus in Ataxia Telangiectasia. *New England Journal of Medicine* [online]. **282**(25), 1396-1402 [cit. 2021-04-04]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: 10.1056/NEJM197006182822503
- SCHIFFMAN, Joshua D., James I. GELLER, Erin MUNDT, Anthony MEANS, Lindsey MEANS a Von MEANS, 2013. Update on pediatric cancer predisposition syndromes. *Pediatric Blood & Cancer* [online]. **60**(8), 1247-1252 [cit. 2021-03-22]. ISSN 15455009. Dostupné z: 10.1002/pbc.24555
- SCHOUTEN, J. P., 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research* [online]. **30**(12), 57e-57 [cit. 2021-5-14]. ISSN 13624962. Dostupné z: 10.1093/nar/gnf056
- SIEGEL, Rebecca, Jiemin MA, Zhaohui ZOU a Ahmedin JEMAL, 2014. Cancer statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. **64**(1), 9-29 [cit. 2021-03-16]. ISSN 00079235. Dostupné z: 10.3322/caac.21208
- STEFANINI, M., 2008. Xeroderma pigmentosum. *In Neurocutaneous Diseases*. **2008**(51), 771-792.
- STOLTENBERG, C., P. MAGNUS, R. T. LIE, A. K. DALTVEIT a L. M. IRGENS, 1997. Birth Defects and Parental Consanguinity in Norway. *American Journal of Epidemiology* [online]. **145**(5), 439-448 [cit. 2021-03-22]. ISSN 0002-9262. Dostupné z: 10.1093/oxfordjournals.aje.a009126



STRAHM, Brigitte a David MALKIN, 2006. Hereditary cancer predisposition in children: Genetic basis and clinical implications. *International Journal of Cancer* [online]. **119**(9), 2001-2006 [cit. 2021-03-22]. ISSN 00207136. Dostupné z: 10.1002/ijc.21962

STRANNEHEIM, Henrik a Joakim LUNDEBERG, 2012. Stepping stones in DNA sequencing. *Biotechnology Journal* [online]. **7**(9), 1063-1073 [cit. 2021-5-3]. ISSN 1860-6768. Dostupné z: 10.1002/biot.201200153

SWIFT, M., 1971. Fanconi's anaemia in the genetics of neoplasia. *Nature*. **1971**(230), 370-373.

SWIFT, M., 1986. The incidence and gene frequency of ataxia-telangiectasia in the United States. *Am J Hum Genet* . **1986** 39(5), 573-83.

TAYLOR, A. Malcolm R., Cynthia ROTHBLUM-OVIATT, Nathan A. ELLIS, et al., 2019. Chromosome instability syndromes. *Nature Reviews Disease Primers* [online]. **5**(1), 798–802 [cit. 2021-03-29]. ISSN 2056-676X. Dostupné z: 10.1038/s41572-019-0113-0

TAYLOR, A.M.R., 2001. Chromosome instability syndromes. *Best Practice & Research Clinical Haematology* [online]. **14**(3), 631-644 [cit. 2021-03-29]. ISSN 15216926. Dostupné z: 10.1053/beh.2001.0158

TEIVE, Hélio A.G., Adriana MORO, Mariana MOSCOVICH, Walter O. ARRUDA, Renato P. MUNHOZ, Salmo RASKIN a Tetsuo ASHIZAWA, 2015. Ataxia-telangiectasia — A historical review and a proposal for a new designation: ATM syndrome. *Journal of the Neurological Sciences* [online]. **355**(1-2), 3-6 [cit. 2021-04-04]. ISSN 0022510X. Dostupné z: 10.1016/j.jns.2015.05.022

THOMPSON, 2004. *Klinická genetika*. 6. Praha: Triton. ISBN 80-7254-475-6.

THORBURN, Marigold J., 1970. Exomphalos-Macroglossia-Gigantism Syndrome in Jamaican Infants. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* [online]. **119**(4), 316 [cit. 2021-03-29]. ISSN 1072-4710. Dostupné z: 10.1001/archpedi.1970.02100050318006

VAHTERISTO, Pia, 2001. P53, CHK2, and CHK1 Genes in Finnish Families with Li-Fraumeni Syndrome. *Cancer res.* **2001**(61), 5718–5722. Dostupné z: Published August 2001

VAN OPSTAL, Diane, Marjan BOTER, Danielle DE JONG, Cardi VAN DEN BERG, Hennie T BRÜGGENWIRTH, Hajo I J WILDSCHUT, Annelies DE KLEIN a Robert-Jan H GALJAARD, 2009. Rapid aneuploidy detection with multiplex ligation-dependent probe amplification: a prospective study of 4000 amniotic fluid samples. *European Journal of Human Genetics* [online]. **17**(1), 112-121 [cit. 2021-5-15]. ISSN 1018-4813. Dostupné z: 10.1038/ejhg.2008.161

VERMA, Mansi, Samarth KULSHRESTHA a Ayush PURI, 2017. Genome Sequencing. KEITH, Jonathan M., ed. *Bioinformatics* [online]. New York, NY: Springer New York, 2017-11-29, s. 3-33 [cit. 2021-5-3]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-6620-2. Dostupné z: 10.1007/978-1-4939-6622-6\_1

VON RECKLINGHAUSEN, Friedrich, 1882. *Über die multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den multiplen Neuromen*. Německo: Vero Verlag. ISBN 9783957004284.

VORLÍČEK, Jiří, 2013. Linkos. *Linkos* [online]. Brno: FN Brno [cit. 2021-5-18]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/pece-o-pacienta/nezadouci-ucinky-lecby-chemo/nezadouci-ucinky-chemoterapie-1/>

WANG, Zhong, Mark GERSTEIN a Michael SNYDER, 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* [online]. **10**(1), 57-63 [cit. 2021-04-16]. ISSN 1471-0056. Dostupné z: 10.1038/nrg2484

WEKSBERG, Rosanna, Cheryl SHUMAN a Adam C. SMITH, 2005. Beckwith-Wiedemann syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* [online]. **137C**(1), 12-23 [cit. 2021-03-29]. ISSN 1552-4868. Dostupné z: 10.1002/ajmg.c.30058

WILLIAMS, V. C., J. LUCAS, M. A. BABCOCK, D. H. GUTMANN, B. KORF a B. L. MARIA, 2009. Neurofibromatosis Type 1 Revisited. *PEDIATRICS* [online]. **123**(1), 124-133 [cit. 2021-03-23]. ISSN 0031-4005. Dostupné z: 10.1542/peds.2007-3204

ZIMMERMANN, J., H. VOSS, C. SCHWAGER, J. STEGEMANN a W. ANSORGE, 1988. Automated Sanger dideoxy sequencing reaction protocol. *FEBS Letters* [online]. **233**(2), 432-436 [cit. 2021-5-3]. ISSN 00145793. Dostupné z: 10.1016/0014-5793(88)80477-0