

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2016**

**Daniela Staňková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



## **Biologické základy RASopatií**

Bakalářská práce

**Daniela Staňková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2016**

**Vedoucí práce: Ing. Arpád Bóday**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Arpáda Bódaye a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 4. 5. 2016

.....

## Souhrn

Tématem této bakalářské práce jsou RASopatie a jejich molekulárně genetická diagnostika. První část, teoretická, se zabývá jednotlivými syndromy patřící k RASopatiím, jejich incidencí, fenotypovým projevem, diagnózou a léčbou. Následně se teoretická část zaměřuje na popis RAS/MAPK signální dráhy, na jednotlivé geny a na funkci kódovaných proteinů.

Druhá část, experimentální, se zabývá vyšetřením genů RAS/MAPK signální kaskády a hledáním kauzální mutace RASopatií.

Cílem práce bylo zavést genetické testování genu *SOS1*. Po zavedení testování genu *SOS1* byl vybrán soubor 5 pacientů, u nichž byla provedena kompletní analýza genů RAS/MAPK signální kaskády. U jednoho pacienta byla nalezena kauzální mutace genu *PTPN11*. U dalších čtyř nebyla nalezena varianta asociována s onemocněním.

## Summary

The theme of this thesis are RASopathies and their molecular genetics diagnosis. First part, theoretical, is focused on individual syndromes classified as RASopathies, their incidence, phenotype features, diagnosis and treatment. Theoretical part is also focused on RAS/MAPK signal pathway, its genes and function of translated proteins.

Second, experimental, part is focused on medical testing of genes RAS/MAPK signal pathway and detecting causal mutation.

The aim was to bring testing of *SOS1*. When the testing of *SOS1* was optimized, the group of 5 patients was chosen. The complete analysis of genes of RAS/MAPK signal pathway was made. One mutation was found in gene *PTPNI*. Neither one of other four had mutation associated with disease.

### Poděkování:

Touto cestou bych chtěla poděkovat Ing. Arpádu Bódayovi za poskytnuté rady a připomínky k této bakalářské práci. Děkuji Mgr. Pavle Vaníčkové za odborné vedení při realizování praktické části bakalářské práce. Dík patří i vedení Laboratoře lékařské genetiky Úseku molekulární biologie, Laboratoří Agel a.s. v Novém Jičíně za umožnění zpracování experimentální části práce.

# Obsah

1. Úvod.....	9
2. RASopatie .....	10
1.1 Syndrom Noonanové .....	11
1.1.1 Prevalence .....	11
1.1.2 Genetický podklad.....	11
1.1.3 Fenotypový projev.....	12
1.1.4 Diagnóza.....	14
1.1.5 Léčba .....	15
1.2 Kardiofaciokutánní syndrom (CFC).....	15
1.2.1 Prevalence .....	16
1.2.2 Genetický podklad.....	16
1.2.3 Fenotypový projev.....	16
1.2.4 Diagnóza.....	17
1.2.5 Léčba .....	18
1.3 Costello syndrom.....	18
1.3.1 Prevalence .....	18
1.3.2 Genetický podklad.....	18
1.3.3 Fenotypový projev.....	18
1.3.4 Diagnóza.....	19
1.3.5 Léčba .....	20
1.4 LEOPARD syndrom.....	20
1.4.1 Prevalence .....	21
1.4.2 Genetický podklad.....	21
1.4.3 Fenotypový projev.....	21
1.4.4 Diagnóza.....	22
1.4.5 Léčba .....	22
2 RAS/MAPK signální dráha .....	23
2.1 PTPN 11 .....	24
2.2 SOS1.....	25
2.3 RAS .....	26
2.4 RAF .....	28
2.5 MEK .....	29
3 Cíle práce.....	31
4 Materiál a metodika.....	32
4.1 Materiál .....	32

4.1.1	Přístroje .....	32
4.1.2	Laboratorní pomůcky .....	32
4.1.3	Chemikálie a použité roztoky .....	32
4.2	Metodika.....	33
4.2.1	Navrhovní primerů .....	33
4.2.2	Optimalizace primerů .....	35
4.2.3	Měření koncentrace DNA.....	36
4.2.4	Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	36
4.2.5	Ověření výsledků pomocí elektroforézy.....	38
4.2.6	Purifikace PCR produktů.....	38
4.2.7	Sekvenční reakce .....	39
4.2.8	Automatická purifikace sekvenačního produktu pomocí pipetovacího robota Biomek 4000 .....	40
4.2.9	Automatické sekvencování.....	40
5	Výsledky.....	41
6	Diskuse .....	45
7	Závěr.....	48
8	Seznam použité literatury .....	49
9	Seznam použitých zkratk:.....	56



## 1. Úvod

RASopatie je souhrnné označení několika lidských syndromových onemocnění, která vznikají deregulací RAS/MAPK signální dráhy. Deregulace je způsobena mutací genů, které kódují jednotlivé komponenty dané dráhy. K dnešnímu datu je identifikováno nespočet kauzálních mutací RASopatií. RASopatie se tedy vyznačují širokou genotypovou variabilitou, se kterou souvisí i variabilita fenotypová. Mezi RASopatie se řadí syndrom Noonanové, Costello syndrom, CFC, LEOPARD syndrom, neurofibromatóza typu I, Noonan syndrome-like disorder with loose anagen hair, legius syndrom. Detailněji popsané budou pouze ty, jejichž výskyt byl zjišťován v rámci této práce.

Incidence RASopatií se u jednotlivých syndromů výrazně liší. Nejfrekventovanější z nich, syndrom Noonanové, se v populaci vyskytuje u každého tisícího jedince. Ostatní syndromy jsou celosvětově evidovány v řádu stovek jedinců. Tyto informace je ale třeba brát s rezervou, protože diagnostika RASopatií je obtížná a u jedinců s mírným průběhem nemusí být onemocnění odhaleno.

Mezi nejčastěji pozorované projevy patří deformace obličeje, kardiologické obtíže, kognitivní poruchy a kožní onemocnění. Ne všechny příznaky se projeví a někteří pacienti nejsou diagnostikováni. RASopatie mají i těžký průběh. Nejzávažnější jsou kardiologické potíže pacientů, které se vyskytují napříč jednotlivými syndromy. Zároveň je pozorována i vyšší incidence onkologických onemocnění.

Souvislost s onkologickými onemocněními není překvapivá, protože u mnoha rakovinných buněk byly nalezeny somatické mutace ovlivňující regulaci RAS/MAPK signální dráhy (Bos, 1989). Germinální mutace, které zapříčiňují RASopatie, jsou ale obvykle nacházeny na jiných místech, než mutace somatické, souvisí s onkologickými onemocněními (Rauen, 2013).

Nalezení kauzální mutace je často jediná možnost, jak určit přesnou diagnózu, protože fenotypové projevy jsou velice variabilní a mohou se překrývat i s jinými onemocněními. Základem vyšetření je analýza jednotlivých genů. Teprve po nalezení mutace lze RASopatii s určitostí potvrdit.

## 2. RASopatie

Jako RASopatie se označuje skupina syndromů, které jsou způsobeny germinální mutací genu kódujícího část RAS/MAPK signální kaskády.

Mutací, které byly doposud identifikovány jako kauzální pro vznik RASopatie, je mnoho. I pokud se soustředíme pouze na jeden konkrétní syndrom, nalzáme mutace ve větším počtu genů (genetická variabilita). Mutace se navíc vyskytují v různých částech genu, které jsou zodpovědné za různé funkční podjednotky výsledného proteinového produktu, a tak mohou mít odlišný vliv na deregulaci signální dráhy. V konečném důsledku pak získáváme široké spektrum fenotypových projevů i v rámci jednoho syndromu.

Přestože jsou RASopatie fenotypově i genotypově heterogenní, pozorujeme určité znaky, které jsou všem RASopatiím společné. Jedná se zejména o obličejovou dysmorfii, srdeční malformace, kožní, svalové, kosterní a oční abnormality, neurokognitivní poruchy, hypotonii a zvýšené riziko vzniku rakoviny (Rauen, 2013).

RAS/MAPK signální dráha, jejíž deregulace je příčinou vzniku RASopatií, hraje klíčovou roli pro správné fungování organismu. Zodpovídá za regulaci buněčného cyklu, buněčného růstu, diferenciaci a stárnutí. Je předmětem intenzivního výzkumu, a to zejména kvůli její roli při vzniku nádorů. Hledají se nové inhibitory této dráhy, které by v budoucnu mohly být významnými i při léčení RASopatií (Li *et al.*, 2005).

Přestože povědomí o RASopatiích je malé, jedná se o onemocnění relativně časté. Nejfrekventovanější RASopatií je syndrom Noonanové, který má v populaci prevalenci 1/1000 (Allanson *et al.*, 1987). Příčinou vzniku mohou být mutace *de novo*, ale v některých případech sledujeme předávání mutace z rodičů na potomky. RASopatie jsou obvykle způsobeny autozomálně dominantní mutací, a tak je riziko přenosu syndromu do další generace 50 % v případě, že postižený je pouze jeden z rodičů.

Kromě klasických syndromů; Noonanové syndrom, Costello syndrom, LEOPARD syndrom a Kardiofaciokutánní syndrom, které budou popsány v této práci, je mezi RASopatie řazena i Neurofibromatóza I, Legius syndrom a Noonan syndrome-like disorder with loose anagen hair, a to z toho důvodu, že jsou způsobeny mutací genů, jejichž proteiny zasahují do regulace RAS/MAPK signální dráhy (Rauen, 2013).

Neurofibromatóza typu I je heterogenní onemocnění, jehož typickým projevem jsou neurofibromy. V populaci má prevalenci 1/3000. Toto onemocnění je autozomálně dominantní

a je způsobeno mutací genu pro neurofibin (*NF1*), který se řadí mezi tumor supresorové geny. NF1 je aktivátorem GTPáz, díky čemuž ovlivňuje aktivitu RAS (Pálová, 2016).

Legius syndrom má podobný fenotypový projev jako neurofibromatóza I a je řazen mezi RASopatie. Je způsoben mutací genu *SPRED1*, jehož produktem je Spred-1 protein, který inhibuje interakci RAS a RAF (Messiaenet *al.*, 2009).

Noonan syndrome-like disorder with loose anagen hair má, jak už jeho název napovídá, podobný fenotypový projev jako syndrom Noonanové. Je však zapříčiněn mutací genu *SHOC2*, který je pozitivním regulátorem RAS/MAPK signální kaskády (Cordeddu *et al.*, 2009).

## **1.1 Syndrom Noonanové**

Syndrom Noonanové vzniká mutací genů kódujících komponenty RAS/MAPK signální dráhy a řadí se mezi RASopatie. Mezi RASopatiemi je nejfrekventovanějším syndromem. Poprvé ho popsaly Jacqueline Noonan a Dorthy Emenke v druhé polovině dvacátého století. Kardioložky si všimly, že někteří pacienti se kromě srdečních deformací vyznačovali menším vzrůstem a deformacemi obličeje a hrudníku (Noonan *et al.*, 1963). Následně provedly studii na souboru těchto pacientů a výsledky své práce opublikovaly.

### **1.1.1 Prevalence**

Toto onemocnění má v populaci prevalenci 1/1000-2000 (Allanson *et al.*, 1987). Syndrom je způsoben autozomálně dominantní germinální mutací v genech RAS/MAPK kaskády.

Polovina diagnostikovaných pacientů nemá příbuzného s podobným postižením, příčinou onemocnění je v těchto případech *de novo* mutace. U druhé poloviny je možné sledovat předávání mutace v rámci rodiny (Digilio *et al.*, 2001).

### **1.1.2 Genetický podklad**

Genem, jehož mutace je identifikována až v polovině případů, je *PTPN11* (Trataglia *et al.*, 2001). Jeho produktem je tyrozin fosfatáza, která je součástí RAS/MAPK dráhy a slouží k aktivaci RAS. Druhou nejčastější mutací, která je příčinou onemocnění u 17 % jedinců (Tartaglia *et al.*, 2007), je mutace v *SOS1* genu, jehož produktem je RAS-GEF. *RAF* mutace,

kteří kódují serin/treonin specifickou kinázu, rovněž podmiňují vznik syndromu Noonanové, ve 3-7 % případů. Mutace *KRAS*, jejichž produktem jsou GTPázy, jsou kauzální u méně než 5 % jedinců. Další geny, které byly detekovány u jedinců se syndromem Noonanové, a to v méně než v 1 % případů, jsou *NRAS*, *BRAF*, a *MAP2K1* (Allanson, 1987).

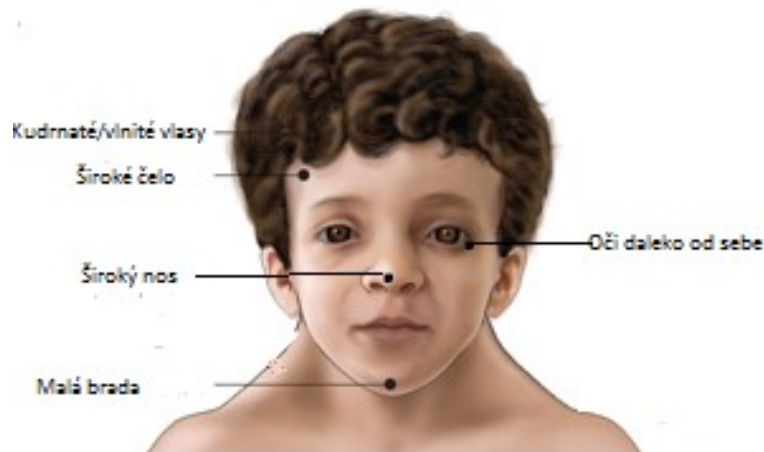
### 1.1.3 Fenotypový projev

Noonanové syndrom je charakterizován širokou škálou symptomů, které se liší svou závažností v závislosti na konkrétním případě. Většina postižených se vyznačuje deformacemi v obličeji, které se výrazněji projevují v dětství; u dospělých nejsou natolik výrazné.

Hlava se jeví v porovnání se zbytkem těla relativně velká, výrazněji tento jev pozorujeme u dětských pacientů, v dospělosti již rozdíl není tak výrazný (Allanson, 1987). Oči jsou posazeny daleko od sebe, horní víčka jsou pokleslá a neobvykle tlustá. V některých případech dochází k abnormalitě jednoho oka, zatímco druhé oko tyto abnormality nevykazuje. Víčka jsou zahnutá směrem dolů a vznikají tak netypické oční štěrby. Kožní záhyby na víčkách mohou překrývat oční koutek (Digilio *et al.*, 2001). Duhovky jsou zabarveny nápadně modře nebo zeleně. Vlasy jsou řídké a kudrnaté (viz obrázek 1).

V mnoha případech lze u pacientů, především dětí, pozorovat i další kraniofaciální malformace jako široké pilthrum, malou bradu a neobvyklé uspořádání zubů na dolní čelisti. Uši jsou posazeny nízko (Digilio *et al.*, 2001). Výrazné abnormality se projevují na nose, který je široký s typickou prohlubní v oblasti kořene (Sharland *et al.*, 1992). Vlasová hranice se nachází poměrně nízko vzadu na krku.

U dětí je pozorováno nadměrné množství kůže v oblasti krku. S přibývajícím věkem se rysy v obličeji pacientů mění typickým způsobem. Obličej získává trojúhelníkovitý tvar, krk se prodlužuje, zvyrazňují se trapézové svaly. Dospělí jedinci mají vysoko položenou vlasovou hranici na čele. Kůže je vrásčitá a neobvykle transparentní s typickými záhyby mezi ústy a nosem. Obočí je výrazné a vyklenuté (Sharland *et al.*, 1992).



**Obrázek 1: Obličej dítěte se syndromem Noonanové**

Prevzato z Bhambhani, Vikas, and Maximilian Muenke. "Noonan syndrome." *American family physician* 89.1 (2014): 37.

Porodní váha jedinců je průměrná. Novorozenci mají ale problémy s příjmem potravy (Sharland *et al.*, 1992), takže je často pozorována nižší hmotnost dětí v prvních osmnácti měsících. Výška při narození je standardní. Nízký vzrůst je typickým projevem syndromu po prvním roce života. Nejvýrazněji se projevuje v adolescenci, a to hlavně kvůli zpoždění období růstu. Kolem dvacátého roku života jedinci často dosahují téměř průměrné výšky.

U mužů i žen postižených syndromem Noonanové se mohou vyskytovat abnormality sekundárních pohlavních znaků. Přes 70 % mužů má potíže se sestupem jednoho nebo obou varlat (Sharland *et al.*, 1992; Digilio *et al.*, 2001). V kombinaci s dysfunkcí spermatozoí to může vést až ke sterilitě, nebo snížené fertilitě jedinců. Ženy obvykle nejsou postiženy neplodností. U obou pohlaví pak dochází k opoždění vývoje sekundárních pohlavních znaků (Sharland *et al.*, 1992).

Objevují se i kosterní abnormality. Výrazná je deformace hrudníku, zejména hrudní kosti, jejíž vrchní část bývá vyklenutá, anebo spodní část naopak prohloubená dovnitř. Dalším typickým znakem jsou níže umístěné bradavky a zaoblená ramena (Allanson, 1987). Poškození loktů se projevuje vychýlením předloktí směrem od těla až o několik stupňů. Prsty jsou krátké a páteř je vychýlená. Jedinci často trpí frakturami, a to kvůli řídnutí kostí.

Častá jsou poškození srdce, kterými trpí asi 50 - 80 % jedinců se syndromem Noonanové (Digilio *et al.*, 2001). V mnoha případech je identifikováno poškození cirkulace krve z pravé

komory do plic (stenóza pulmonární chlopně) a hypertrofická kardiomyopatie (Allanson, 1987), (Digilio *et al.*, 2001; Shaw *et al.* 2007). Závažnost onemocnění se velice liší, ale u jedinců s diagnostikovanými kardiologickými obtížemi je vysoká mortalita ve srovnání s jedinci s diagnostikovaným syndromem Noonanové, kteří jsou bez těchto obtíží (Shaw *et al.* 2007). U nejzávažnějších případů dochází k hypertrofii srdce ihned po narození a může docházet až k srdečnímu selhání. U některých se symptomy objeví ve vyšším věku. Mezi další časté obtíže patří defekt komorové přepážky. Dochází k většímu zatížení srdce a následné hypertrofii srdce.

Hematologické potíže doprovázejí třicet procent případů. Snížený počet krevních destiček, anebo jejich špatná funkce v kombinaci s deficiencí některých koagulačních faktorů, nejčastěji faktoru XI a v ojedinělých případech faktoru XII nebo VIII, vede k prodloužení doby krvácení a může docházet k častějšímu krvácení (Sharland *et al.*, 1992; Shaw *et al.* 2007). Zároveň je u pacientů pozorována vyšší incidence rakoviny krve než ve zbytku populace.

U některých jedinců lze pozorovat abnormální zbarvení kůže. Často se objevují dohněda zbarvené úseky na kůži (café au lait).

Inteligence je většinou průměrná (Digilio *et al.*, 2001). Po testování IQ jedinců a následném porovnání výsledků s ostatními členy rodiny bylo zjištěno, že v průměru dosahují nižšího skóre asi o 10 bodů (Allanson, 1987). Jedinci se potýkají s poruchami učení a psychomotorickou retardací (Allanson, 1987). Výrazná je i verbální retardace, která může být spojena s nedoslýchavostí a špatnou artikulací, což u pacientů vyvolává potíže při čtení, socializaci a vyjadřování emocí (Digilio *et al.*, 2001).

#### **1.1.4 Diagnóza**

Podezření na Noonan syndrom lze již prenatálně vyslovit pomocí ultrasonografu. Syndrom může být diagnostikován na základě abnormálního výsledku triple testu, což je vyšetření krevního séra na množství choriogonadotropinu, estriolu a alfa-fetoproteinu, které se provádí v druhém trimestru těhotenství (Baldassarre *et al.*, 2011).

Dalším vodítkem pro diagnózu může být nadměrné množství plodové vody v plodové bláně nebo strukturní srdeční abnormality plodu (Achiron *et al.*, 2000). Obvykle je však diagnóza

určena až po porodu nebo v dětství, protože většina projevů je kumulativních a fenotyp se vyvíjí s přibývajícím věkem.

Jedinci se stenózou pulmonární chlopně, nebo hypertrofickou kardiomyopatií by měli být automaticky vyšetřeni na syndrom Noonanové. Potvrzení diagnózy je zprostředkováno genetickým testováním. Kauzální jsou mutace v genech RAS/MAPK signální kaskády. Syndrom Noonanové se často spojuje s mutací v oblasti krátkého raménka chromozomu 12 (Jamieson *et al.*, 1994). V této oblasti totiž leží gen *PTPN11*, jehož mutace je nejčastější příčinou vzniku syndromu Noonanové.

Diagnostiku může komplikovat mírný průběh onemocnění se slabším fenotypovým projevem. Zároveň se fenotyp překrývá s ostatními RASopatiemi a Turnerovým syndromem, a i proto se přistupuje ke genetickému testování.

### **1.1.5 Léčba**

V současné době není možné pacienty postižené syndromem Noonanové kompletně vyléčit. Léčba těchto jedinců je obvykle symptomatická. Pokud je diagnostikovaný jedinec nižšího věku než jeho vrstevníci, je léčen pomocí růstového hormonu. Shaw ve své studii 53 pacientů, z nichž deset bylo léčeno růstovým hormonem, uvádí, že průměrná výška pacientů s diagnózou syndromu Noonanové, kteří byli léčeni růstovým hormonem, byla nižší, než u neléčených pacientů. Testovaná skupina, jak poukazuje sám autor, byla malá, a tak mohou být výsledky nepřesné (Shaw *et al.*, 2006). Jiná studie prokázala průběžný a zaznamenaný nárůst u takto léčených jedinců (Noordam *et al.*, 2008).

U chlapců je po prvním roce života v případě nutnosti provedena operace nesestoupených varlat.

Problémy s psychickým a mentálním vývojem mohou být díky správné diagnostice včas zachyceny a odborníci mohou pomoci s vývojem těchto pacientů.

## **1.2 Kardiofaciokutánní syndrom (CFC)**

Dalším syndromem, který se řadí mezi RASopatie, je kardiofaciokutánní syndrom. CFC byl poprvé rozpoznán a diagnostikován v roce 1986 (Reynolds *et al.* 1986). Bylo identifikováno osm jedinců, kteří se vyznačovali srdečními malformacemi (cardio), odlišnými rysy v obličeji (facio) a kožními abnormalitami (cutaneous).

### 1.2.1 Prevalence

Onemocnění je poměrně vzácné. V současnosti je celosvětově zaznamenáno přibližně 100 jedinců. Předpokládá se však, že toto číslo je podhodnocené. Vlivem slabého fenotypového projevu nemusí být všichni nositelé diagnostikováni (Roberts *et al.*, 2006).

Kardiofaciokutanní syndrom se vyskytuje sporadicky a obvykle je způsoben *de novo* mutací. Byly však zaznamenány případy vertikálního přenosu mutace v průběhu až čtyř generací (Rauen *et al.*, 2010). Jako u většiny RASopatií i v případě kardiofaciokutanního syndromu se jedná o autozomálně dominantní onemocnění.

### 1.2.2 Genetický podklad

Syndrom je způsoben mutací jednoho ze čtyř genů, které se podílejí na tvorbě RAS/MAPK kaskády. Mutace *BRAF* genu jsou nejčastěji příčinou vzniku tohoto syndromu. V závislosti na skupině jedinců, kteří jsou testováni, se frekvence pohybuje od 37 % (Niihori *et al.*, 2006) do 75 % (Rodriguez-Viciano *et al.*, 2006). *MAP2K1* a *MAP2K2* mutace byly objeveny u 25 % pacientů (Rodriguez-Viciano *et al.*, 2006). *KRAS* mutace se podílejí na vzniku syndromu jen z 5 % (Niihori *et al.*, 2006).

### 1.2.3 Fenotypový projev

Jedinci se vyznačují relativní makrocefalií, jejich čelo je vysoké s nápadným zúžením ke stranám obličeje (Roberts *et al.*, 2006; Goodwin *et al.* 2013). Uši směřují dozadu a jsou nízko položené. Oči jsou umístěny relativně daleko od sebe, jedno nebo obě horní víčka mají tendenci padat. Brada je malá, ústa jsou naopak široká. Nos je malý a má typickou prohlubeň u kořene. Rysy v obličeji jedinců s CFC jsou podobné jako u jedinců s diagnostikovaným syndromem Noonanové. Nejpodobnější jsou si děti mladší šesti let. Ale zatímco u syndromu Noonanové se typické rysy v obličeji zjemňují, u pacientů s CFC jsou rysy u dospělých výraznější (Roberts *et al.*, 2006).

Vlasy jsou pomalu rostoucí, vlnité nebo kudrnaté, řídké, a to obzvlášť v okolí spánků (Roberts *et al.*, 2006). Řídké je také ochlupení na pažích a na nohách. Obočí je normální pouze u 10 % jedinců, ostatním buď chybí úplně, nebo jsou ochlupená místa řídká a roztroušená (Pierpont *et al.*, 2014). Pigmentové skvrny se nacházejí ve větším počtu než u ostatních RASopatií. V drtivé většině případů se na kůži objevují drobné hrbolky, které jsou důsledkem folikulární keratózy. Postižení jedinci mají nízkou toleranci k vysokým teplotám, při kterých dochází



k nadměrnému pocení (Pierpont *et al.*, 2014). Dalšími projevy může být výskyt ekzému, nebo suché pokožky. Nehty jsou dystrofické a rostou relativně rychle (Roberts *et al.*, 2006).

Asi tři čtvrtiny jedinců s CFC jsou postiženy vrozenou srdeční vadou (Pierpont *et al.*, 2014). Nejčastěji je pozorována porucha proudění krve z pravé komory do plic (stenóza pulmonární chlopně). U některých jedinců není vyvinuta přepážka oddělující srdeční komory. Hypertrofická kardiomyopatie se vyskytuje u dvou třetin jedinců s tímto onemocněním (Pierpont *et al.*, 2014).

I přesto, že se IQ pacientů pohybuje okolo průměru nebo lehce pod průměrem, čelí téměř všichni postižení intelektuálním potížím. Motorika je poškozena, děti se naučí sedět bez pomoci průměrně ve 34 měsících, chodit kolem třetího roku života, přičemž někteří nedokážou sedět bez pomoci ani v dospělosti (Yoon *et al.*, 2007). Časté jsou rovněž problémy s řečí, které vykazují velkou variabilitu. V rámci syndromu se setkáváme s jedinci, kteří používají pouze nonverbální komunikaci, až po jedince, kteří jsou schopni normálního způsobu komunikace pomocí rozvitých vět.

Jedním z klíčových projevů CRC syndromu je porucha příjmu potravy. Zhoršená je schopnost sání nebo polykání a často se jedinci vyhýbají příjmu potravy (Pierpont *et al.*, 2014; Roberts *et al.*, 2006). Až v polovině případů je nutno vyživovat jedince uměle.

Dvě třetiny dětí jsou nízkého vzrůstu. To je způsobeno rezistencí na růstový hormon, nebo jeho nedostatečným množstvím v kombinaci se špatným příjmem potravy.

#### **1.2.4 Diagnóza**

Syndrom může být diagnostikován i prenatálně. Stejně jako u syndromu Noonanové lze pomocí ultrazvuku pozorovat nadměrné množství plodové vody. Dítě mající kardiofaciokutánní syndrom se v polovině případů narodí před řádným termínem porodu (Armour *et al.*, 2008).

Podezření na kardiofaciokutánní syndrom získávají lékaři obvykle až v prvních letech života jedince. Fenotypový projev se částečně překrývá s ostatními RASopatiemi, proto je potvrzení diagnózy závislé na genetických testech. Fenotypový projev onemocnění může být slabý a k odhalení syndromu nemusí vůbec dojít. Dokladem je rodina, ve které byla mutace objevena po čtyřech generacích. Rodiče sice vykazovali některé projevy syndromu, ale

diagnóza byla potvrzena až po genetickém testování, které bylo vyžádáno kvůli fenotypovým projevům jejich dítěte (Rauen *et al.*, 2010).

### **1.2.5 Léčba**

CFC ovlivňuje mnoho orgánů, takže pacienti potřebují péči multidisciplinárního týmu. Léčba jednotlivých defektů je stejná jako v běžné populaci. Závažné problémy s příjmem potravy v raných fázích života vyžadují pozornost gastroenterologů. Příjem potravy může být zajištěn nosogastrickou, nebo gastrickou sondou. Endokrinologové mohou navrhnout léčbu pomocí růstového hormonu.

## **1.3 Costello syndrom**

Dalším syndromem, který je zapříčiněn deregulací RAS/MAPK dráhy, je Costello syndrom. Poprvé byl popsán v sedmdesátých letech minulého století (Costello, 1971), kdy stejnojmenný lékař vyšetřoval dvě mentálně retardované děti, které měly problémy s příjmem potravy. Oba pacienti měli vysokou porodní hmotnost a kudrnaté vlasy.

### **1.3.1 Prevalence**

Costello syndrom je poměrně vzácným onemocněním. Na celém světě je zaznamenáno 300 lidí s tímto onemocněním (Gripp *et al.*, 2012). Syndrom je ve většině popsáných případů způsoben *de novo* mutací, která je autozomálně dominantní.

### **1.3.2 Genetický podklad**

Costello syndrom je způsoben mutací *HRAS* genu, který stejně jako *KRAS* a *NRAS* kóduje GTPázu. Vlivem této mutace se tvoří nefunkční H-RAS protein, který je součástí RAS/MAPK signální dráhy. Doposud nebyla nalezena mutace jiného genu zapříčiňující vznik Costello syndromu.

### **1.3.3 Fenotypový projev**

Fenotypový projev se u Costello syndromu vyvíjí během života. Hlava je relativně velká vzhledem ke zbytku těla (Gripp *et al.*, 2012). Krk je krátký, vlasy jsou kudrnaté a zasahují až do čela. Obočí je široké, vnitřní koutek je překryt horním víčkem (epikantus). Typická je

i prohlubeň u kořene nosu, jehož špička je zbytnělá. Plné jsou tváře a ústa u pozorovaných jedinců (Rauen, 2007; Hennekam, 2003).

Většina kloubů, zejména prstů, je hypermobilní, ale lokty, kolena a zápěstí mají sníženou pohyblivost. Nadbytečná kůže se nachází na krku, dlaních a chodidlech (Hennekam, 2003). Kůže má tmavší odstín a zvýšený počet mateřských znamének. Dalším kožním projevem, který se vyskytuje u poloviny pacientů, je výskyt papilomů, což jsou benigní nádory na kůži (Hennekam, 2003).

Přes osmdesát procent dětí je postiženo vrozenou srdeční vadou. Pozorována je porucha proudění krve z pravé komory do plic. U některých jedinců není vyvinuta přepážka oddělující srdeční komory. Nejčastějším srdečním onemocněním je hypertrofická kardiomyopatie. Zároveň se objevuje i tachykardie. Srdeční potíže jsou u postižených jedinců velice závažné a v mnoha případech dochází ke smrti jedince v mladém věku (Lin *et al.*, 2002).

Pacienti mají zvýšené riziko vzniku rakoviny během života (Rauen, 2007). Typická je rakovina močového měchýře, nervů a svalů.

Porodní váha je normální, nebo vyšší oproti průměru, ale slabý sací reflex v kombinaci s potížemi s polykáním zapříčiňuje malý nárůst hmotnosti a problém s růstem (Hennekam, 2003). První potravu jsou schopni pozřít po prvním roku života a často se jedná o potraviny s výraznou chutí, jako je například kečup.

Intelektuální schopnosti se velice liší a vykazují korelaci s druhem mutace. Avšak celkově mají pacienti lehce snížené intelektuální dovednosti. Relativně dobře zvládají neverbální řešení problémů. Zatímco neverbální schopnosti jsou rozvinuty během dospívání, verbální dovednosti se rozvíjejí až v dospělosti (Axelrad *et al.*, 2011). Zároveň výzkumy ukazují, že jedinci jsou přehnaně úzkostliví. Lidé s Costello syndromem jsou popisováni jako otevření a přátelští.

#### **1.3.4 Diagnóza**

Teoreticky lze syndrom diagnostikovat prenatálně, ale přesto, jako u předchozích syndromů, dochází k diagnostice až po narození, případně v prvních letech života. Na ultrazvuku lze pozorovat zkrácení kosti pažní a stehenní, rovněž lékaři zaznamenali tachykardii plodu. Tyto příznaky ovšem nejsou unikátní pro Costelloův syndrom, který je navíc velice vzácným onemocněním. Novorozené děti mají zvýšenou porodní váhu (Rauen, 2007).

Syndrom je obvykle diagnostikován po zdravotní prohlídce. Potvrzen je pak pomocí sekvencování genu *HRAS*, které odhalí přítomnost mutací. Pokud není mutace v *HRAS*, jedná se o některou z příbuzných RASopatií.

Costello syndrom je zaměnitelný s ostatními RASopatiemi, především se syndromem Noonanové a kardiofaciokutánním syndromem. Nespecifičnost diagnózy je problémem v dětství. Během dospívání dochází k diferenciaci fenotypů, a tak je ulehčeno správné diagnostikování.

### 1.3.5 Léčba

Léčba je symptomatická, stejně jako u ostatních RASopatií. Kvůli vyšší incidenci vzniku nádorů u pacientů s Costello syndromem se provádí pravidelný screening těchto pacientů.

Pro lepší porozumění různým vývojovým vadám byl vytvořen speciální kmen myší, nesoucí germinální mutaci *HRAS* genu. Tento kmen slouží jako modelový organizmus pro studium vývoje a variability jednotlivých klinických příznaků Costello syndromu a pro hledání nových terapeutických postupů. Na tomto modelu byl vyzkoušen lék captopril, který je inhibitorem ACE a používá se i při léčbě kardiologických pacientů. U myší došlo ke snížení hypertenze a k částečné léčbě hypertrofické kardiomyopatie (Schumacher *et al.*, 2008).

Léčba Costello syndromu zahrnuje i terapii růstovým hormonem, protože pacienti s tímto syndromem mají obvykle nízkou hladinu růstového hormonu.

## 1.4 LEOPARD syndrom

LEOPARD syndrom je onemocnění způsobené mutací genu RAS/MAPK dráhy a jako takové je řazeno mezi RASopatie. Označení LEOPARD je akronymem. Jednotlivá písmena reprezentují projevy nemoci, a sice **l**entignies, **E**EG abnormalities, **o**cular hypertelorism, **p**ulmonary valve stenosis, **a**bnormalities of genitalia, **r**etardation of growth, **d**eafness.

Tento akronym byl poprvé použit Robertem Gorlinem, který se podílel na definici tohoto syndromu. LEOPARD syndrom je také někdy označován jako Syndrom Noonanové s mnohočetnými lentigy (Noonan syndrom with multiple lentignites). První zaznamenaný případ LEOPARD syndromu je pravděpodobně již z roku 1936 (Coppin *et al.*, 1997).

### 1.4.1 Prevalence

Přesná prevalence onemocnění není známá, ale celosvětově se odhaduje na více než 200 pacientů (Sarkozy *et al.* 2008).

### 1.4.2 Genetický podklad

LEOPARD syndrom je onemocnění způsobené nejčastěji autozomálně dominantní mutací genu *PTPN11* nebo *RAF1*. Mutace *PTPN11* je nalezena u 90 % pacientů s LEOPARD syndromem. Zbytek mutací je nalezen v genu *RAF1*. V současnosti jsou evidovány i mutace v genech *BRAF* a *MAP2K1* a předpokládá se, že existuje ještě jeden kauzální gen (Gelb *et Tartaglia*, 2015).

### 1.4.3 Fenotypový projev

Symptomy popisující LEOPARD syndrom se mohou podstatně lišit v závislosti na konkrétním případě. Zároveň se fenotyp překrývá s ostatními RASopatiemi, zejména však se syndromem Noonanové (Sarkozy *et al.*, 2004).

Obličejový dimorfismus se výrazně mění. V prvních letech života jsou projevy nevýrazné. Během dospívání se začínají ve větší míře projevovat znaky charakteristické pro syndrom LEOPARD. Vzdálenost očí je větší než v běžné populaci. Znak je pro daný syndrom typický, stejně jako plochý kořen nosu a dysmorfické uši (Digilio *et al.*, 2006). Dalším charakteristickým znakem je ptóza horního víčka, mohutné rty, nízko položené uši, nebo nadbytečná pokožka v oblasti krku (Sarkozy *et al.*, 2008).

Nejvýraznějším a také nejvýznamnějším znakem jsou lentiga, jejichž počet je v dětství okolo tisíce a narůstá až do puberty (Coppin *et al.*, 1997). Jejich velikost je od jednoho do dvou milimetrů a na rozdíl od pih jejich počet nebo barva nejsou ovlivněny pobytem na slunci. V prvních letech života se lentiga nemusí vyskytovat vůbec a jsou zaznamenány i případy LEOPARD syndromu, kdy se během celého života lentiga na kůži nevyskytla.

Elektrokardiografické anomálie a progredující anomálie vedení vzruchu jsou nejčastěji se vyskytujícími kardiovaskulárními potížemi. Přestože síně bijí v normálním rytmu, komory se stahují se zpožděním. V závislosti na délce zpoždění se rozvíjejí různě závažné problémy. Může docházet k malému zpoždění, ale v nejtěžších případech jsou údery síní a komor zcela nezávislé. Další kardiovaskulární obtíže jsou morfologické. U pacientů byla zaznamenána

hypertrofická kardiomyopatie (Gelb *et* Tartaglia, 2007) a stenóza pulmonární chlopně, která v případě LEOPARD syndromu mívá lehčí průběh (Sarkozy *et al.*, 2008).

Genitální abnormality se vyskytují u obou pohlaví. Asi polovina mužů má nesestoupené jedno, nebo obě varlata, anebo malý penis. U žen mohou být vaječníky nevyvinuté, nebo mohou zcela chybět. Pokud dochází k vertikálnímu předávání mutace, je postiženým rodičem obvykle žena, což ukazuje na sníženou fertilitu mužské části populace. Ale jsou zaznamenány i případy, kdy je otec nositelem mutovaného genu (Coppin *et al.*, 1997).

Hluchota se vyskytuje u 25 % jedinců postižených syndromem. Ve většině případů je hluchota diagnostikována již v dětství, ale jsou známy i případy, kdy se hluchota vyvinula v dospělosti (Coppin *et al.*, 1997).

#### **1.4.4 Diagnóza**

Podezření, že daný jedinec je nositelem mutace, která zapříčiňuje LEOPARD syndrom, může být získáno těsně po narození, a to zejména díky přítomnosti světle hnědých skvrn na pokožce (café au lait). S přibývajícím věkem se mění i fenotypový projev a syndrom je patrnější.

Největším problémem je odlišení LEOPARD syndromu od ostatních RASopatií, a to zejména syndromu Noonanové. Nejen, že je podobný fenotypový projev, ale i kauzální gen je stejný (*PTPN11*). Diagnóza může být určena na díky přítomnosti mnohačetných lentiga dalších dvou výše zmíněných hlavních projevů (Voron *et al.*, 1976). Při absenci lentig jsou nutné tři typické projevy a blízký příbuzný, u kterého byl již LEOPARD syndrom diagnostikován.

#### **1.4.5 Léčba**

Léčba jako taková je směřována k jednotlivým projevům. Některé malformace faciální či genitální mohou být odstraněny chirurgicky. Pokud testy odhalí nízkou hladinu gonadotropinu, může být navržena i hormonální léčba.

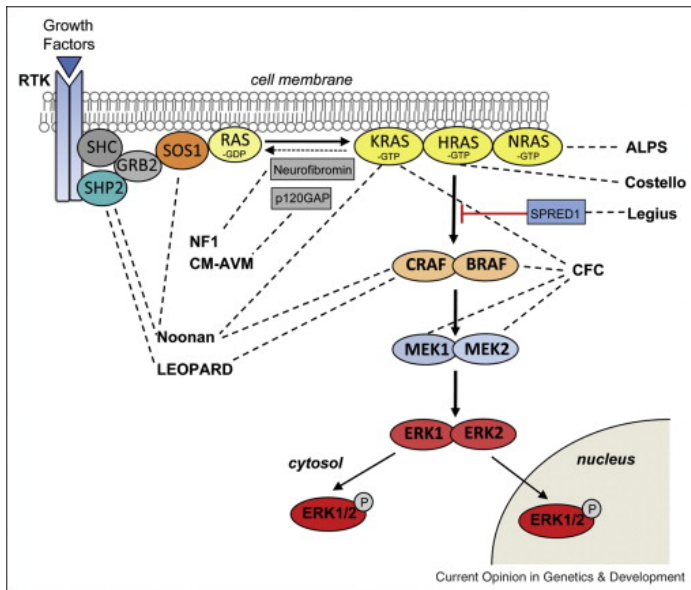
## 2 RAS/MAPK signální dráha

RAS/MAPK signální dráha reguluje pro buňku, a tudíž i pro celý organismus, klíčové funkce zahrnující buněčné dělení, buněčný cyklus, angiogenesi a buněčnou migraci. Tato široká škála funkcí podtrhuje důležitost této dráhy, která hraje zásadní roli i při onkogenezi.

Celá kaskáda zahrnuje množství jednotlivých členů, ale obecně je klasifikována jako lineární signální dráha, která je aktivovaná receptorem pro tyrozin kinázy, které se nacházejí na buněčné membráně. Dráha v konečném důsledku reguluje transkripci genů pomocí ERK. Přestože se v zásadě jedná o lineární dráhu, objevují se i „cross-talk“ signály s jinými signálními drahami (Aksamitiene *et al.*, 2012).

Signální dráha je aktivovaná vazbou ligandu na receptor pro tyrozin kinázu. Výsledkem je autofosforylace receptoru. Adaptorové proteiny následně asociují s fosforylovanými doménami. Guaninin nukleotid exchange faktory jsou přemístěny na buněčnou membránu, kde interagují s RAS proteiny, které se na buněčné membráně nacházejí přirozeně. Dojde ke konformační změně a výměně GDP za GTP, a tím k aktivaci RAS. Ukončení RAS aktivity zahrnuje hydrolýzu GTP na GDP. RAS má malou GTPázovou aktivitu, která je stimulována GTPázovými aktivačními proteiny (viz obrázek 5).

Po RAS aktivaci je na buněčnou membránu pomocí vazby na RAS translokována RAF. RAF je aktivována v komplikovaném procesu, který zahrnuje fosforylaci a množství kofaktorů a který není v současné době plně znám. RAF následně fosforyluje serinových residuí aktivuje MEK1 a MEK2. MEK1 a MEK2 jsou kinázy, které fosforylují treoninové a tyrozinové zbytky na ERK1 a ERK2 (viz obrázek 2).

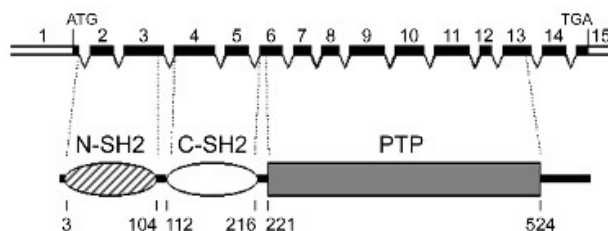


**Obrázek 2: Schéma RAS/MAPK signální kaskády s naznačenými geny způsobujícími RASopatie**

Převzato z: Tidyman, William E., and Katherine A. Rauen. "The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation." *Current opinion in genetics & development* 19.3 (2009): 230-236.

## 2.1 PTPN 11

Gen *PTPN11* se nachází na dlouhém raménku dvanáctého chromozomu (Jamieson, 1994) v oblasti 12q24. Skládá se z patnácti exonů a produktem tohoto genu je protein tyrosin fosfatáza SHP-2 protein, který obsahuje dva src homology 2 (SH2 domény) a tyrosin fosfatázovou doménu (PTP) (viz obrázek 3).



**Obrázek 3 Genomická struktura genu *PTPN11* v souvislosti s proteinovou strukturou SHP proteinu**

Převzato z: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/PTPN11ID41910ch12q24.html>



Rentgenová krystalografie ukázala, že protein má autoinhibiční funkci (Hof *et al.* 1998). N-koncová SH2 doména se váže vodíkovou vazbou na PTP doménu, kterou tímto zablokuje. Po stimulaci receptoru pro růstové faktory, dojde k navázání SH2 skupiny na fosforylované tyrozinové zbytky, a tím k uvolnění vazebného místa enzymu s fosfatázovou aktivitou.

Tyrozin fosfatáza je součástí RAS/MAPK dráhy, která hraje klíčovou roli v proliferaci, diferenciaci a apoptóze buněk. Je zásadní i při vývoji tkání, a to zejména srdce.

Přestože tyrozin fosfatázy jsou obvykle negativními regulátory signálních drah (mají opačný efekt než tyrozin kinázy), v RAS/MAPK dráze mají aktivační úlohu. Fosfatázová aktivita je zásadní pro plnou aktivaci RAS proteinu. Přesný mechanismus této aktivace není ještě zcela znám.

Germinální missense mutace v genu *PTPN11* je příčinou vzniku RASopatií, konkrétně syndromu LEOPARD a syndromu Noonanové.

Syndrom Noonanové je asi v polovině případů zapříčiněn právě mutacemi v *PTPN11* genu (Tartaglia *et al.*, 2001). Studium mutací v genu *PTPN11* se zabývalo a zabývá mnoho výzkumných skupin s různě velkým souborem pacientů. Drtivá většina mutací, a to až 97 % (Jongmans *et al.*, 2005), byla nalezena v oblastech kódujících N-SH2 doménu a PTP doménu. Nejčastěji postiženými jsou exony 3 a 8 (Kosaki, *et al.*, 2002; Tartaglia, *et al.*, 2002), sporadicky jsou pak nalezeny mutace v C-SH2 doméně.

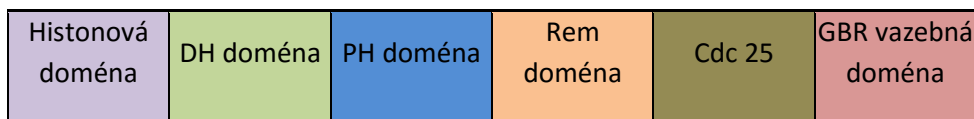
Záměna A→G v pozici 922 v exonu 8, která má za následek substituci asparaginu na kyselinu asparagovou v PTP doméně, je jednou z nejčastějších mutací a byla nalezena u třetiny pacientů (Tagalia *et al.*, 2002).

## 2.2 SOS1

Gen *SOS1* se nachází na krátkém raménku druhého chromozomu v oblasti 2p22-p16. Skládá se z 23 exonů. Produktem tohoto genu je enzym RAS-GEF, který katalyzuje GDP-GTP výměnu a způsobuje aktivaci RAS proteinu, který je dalším členem RAS/MAPK dráhy.

SOS je komplexní multidoméno­vý protein (viz obrázek 4). N-terminální doména obsahuje dvě tandemové histon-fold domény (Sondermann *et al.*, 2003). Následuje Dbl homologní doména (DH) a pleckstrin homologní doména (PH). Tyto dvě domény jsou zodpovědné za inhibici SOS tím, že zakryjí allosterické místo SOS (Sondermann *et al.*, 2003). Další dvě

domény, nacházející se blízko C konce enzymu, jsou významné pro specifickou výměnu nukleotidů. Jedná se o Rem doménu (ras exchange motif) a Cdc25 doménu (Sordemann *et al.*, 2004). Na C-konci se nachází rozpoznávací místo pro SH3 domény, které zprostředkovává interakci SOS s adaptorovým proteinem GRB2, který po aktivaci translokuje SOS na membránu, kde interaguje s RAS proteinem.



**Obrázek 4: Domény SOS proteinu**

Při interakci RAS a SOS dochází k odhalení vazebného místa pro nukleotidy na RAS (Borjack-Sjodin *et al.*, 1998). Po katalyticky podmíněném uvolnění GDP dojde k vazbě GTP na RAS protein, a tím k jeho aktivaci. Ovšem za tuto interakci zodpovídá pouze Cdc25 doména. Úloha druhé katalytické domény, Rem domény, zůstávala dlouhou dobu nejasná. Krystalografická studie odhalila, že má tato doména neočekávanou roli. Ras-GTP, produkt reakce, se váže na vazebné místo mezi Rem doménou a Cdc25 doménou. Tato allosterická modifikace má za následek zvýšení aktivity SOS (Margarit *et al.*, 2003). Ještě překvapivější je fakt, že vazba RAS-GDP v allosterickém místě enzymu je potřebná pro bazální funkci enzymu.

Missense mutace *SOS1* genu jsou druhou nejčastější příčinou vzniku syndromu Noonanové, detekovanou asi v 17 % případů (Tartaglia *et al.*, 2007). Většina mutací se nachází v kodonech, které kódují místa, která jsou zodpovědná za inhibici enzymu.

### 2.3 RAS

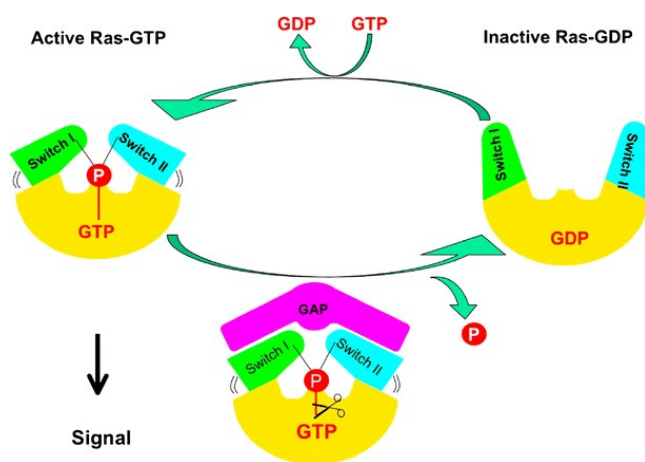
RAS proteiny patří do velké rodiny proteinů, které kódují malé a vysoce konzervované GTPázy, které jsou součástí mnoha významných signálních kaskád. V současné době jsou předmětem mnoha výzkumů, a to kvůli jejich vazbě ke vzniku nádorů.

Savčí genom kóduje tři RAS geny, jejichž produktem jsou čtyři funkční proteiny: N-RAS, H-RAS, K-RAS4A a K-RAS4B. Poslední dva zmíněné jsou proteinové izoformy, které vznikají alternativním sestřihem *KRAS* genu. *KRAS* se nachází na krátkém raménku dvanáctého chromozomu v oblasti 12p12.1, *NRAS* se nachází na krátkém raménku prvního chromozomu

v oblasti 1p13.2 a *H-RAS* se nachází na krátkém raménku jedenáctého chromozomu v regionu 11p15.5.

Pro normální funkci musí být RAS protein posttranslačně modifikován. Podstatná je správná lokalizace RAS proteinu, obvykle na vnitřní straně plazmatické membrány. Chybně lokalizované proteiny jsou inaktivní, zřejmě kvůli špatné interakci s cílovými enzymy.

RAS proteiny se vyskytují ve dvou formách, aktivní forma je ve vazbě s GTP, zatímco neaktivní forma je ve vazbě s GDP. Za aktivaci RAS proteinu a tedy záměnu GDP za GTP zodpovídají GEF, mezi které patří již výše zmíněný SOS. Po uvolnění GDP z vazby na RAS, se na protein váže GTP, jelikož jeho koncentrace v cytoplazmě je daleko vyšší než koncentrace GDP (Mor *et* Philips, 2006). Během vazby dojde k dramatické změně struktury dvou oblastí RAS proteinu (viz obrázek 5). Tyto oblasti, známé jako Switch region I a Switch region II, vytváří vazebné místo pro efektorové molekuly, mezi které řadíme různé druhy kináz, například RAF kinázu.



**Obrázek 5: Konformace RAS proteinu při vazbě GTP a GDP**

Převzato z : Kratz, Christian P., Charlotte M. Niemeyer, and Martin Zenker. "An unexpected new role of mutant Ras: perturbation of human embryonic development." *Journal of Molecular Medicine* 85.3 (2007): 227-235.

Aby se RAS dostal opět do neaktivní konformace, musí dojít k disociaci GTP na GDP a fosfátovou skupinu. RAS má, podobně jako velké množství signálních GTPáz, malou katalytickou aktivitu. Ta je stimulována proteiny známými jako GAP (GTPase activating proteins) (Mor *et* Philips, 2006).

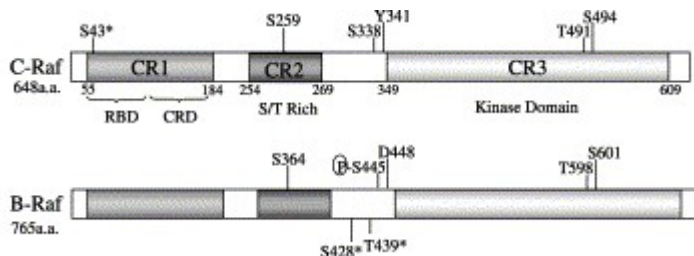
Mutace *RAS* mají v mnoha případech fatální účinek. Jsou intenzivně studovány v souvislosti s genetikou nádorů. Germinální mutace však způsobují syndromy známé jako RASopatie.

*NRAS* a *KRAS* mutace, které způsobují syndrom Noonanové, jsou poměrně vzácné a objevují v méně než 2 % případů (Cirstea *et al.*, 2010; Carta *et al.*, 2006). *HRAS* mutace způsobuje Costello syndrom.

## 2.4 RAF

Rodina RAF serin/threonin specifických kináz je součástí významných buněčných kaskád. *RAF1* se nachází na krátkém raménku třetího chromozomu v oblasti 3p25, *B-RAF* leží na dlouhém raménku sedmého chromozomu v oblasti 7q34.

Každá RAF kináza obsahuje tři konzervované oblasti označované jako CR1, CR2 a CR3 (viz obrázek 6). CR1 region obsahuje RAS vazebné místo a doménu bohatou na cystein, která dokáže navázat dva zinečnaté ionty. Navíc je tento region zodpovědný za vazbu na fosfolipidy, a tedy zajišťuje uchycení kinázy na membránu. CR2 region obsahuje množství serinu a treoninu. Nachází se zde vazebné místo, na které po fosforylaci navazuje regulační protein, který inhibuje RAF kinázu. CR3 region, který je lokalizovaný blízko C konce proteinu, obsahuje protein kinázovou doménu.



**Obrázek 6: Struktura RAF kinázy; tři konzervované domény, CR1 RAS vazebná doména, CR2 serin/threonin bohatá doména a CR3 katalytická doména**

Převzato z: Chong, Huiru, Haris G. Vikis, and Kun-Liang Guan. "Mechanisms of regulating the Raf kinase family." *Cellular signalling* 15.5 (2003): 463-469.

Pro aktivaci musí nejprve dojít k translokaci proteinu na buněčnou membránu, kde dojde k interakci s enzymem s GTPázovou aktivitou, jakým je například RAS. Efektorová doména RAS proteinu se naváže na dvě místa v CR1 oblasti, a to na RAS vazebné místo (RBD) a na doménu bohatou na cystein (CRD) (Morrison *et al.*, 1997).

Fosforylace a defosforylace jsou důležitým mechanismem regulace RAF kináz. Fosforylační místa se liší v závislosti na druhu kinázy.

RAF1 kináza obsahuje fosforylační místa Ser259 a Ser621 (Dougherty *et al.*, 2005). Fosforylace těchto míst je nezbytným krokem pro navázání 14-3-3 proteinu, který má inhibiční funkci. Fosforylace Ser 471 je nezbytná pro aktivitu RAF1 kinázy, protože umožňuje interakci se substráty RAF1 kinázy (Zhu *et al.*, 2005). Kináza dále obsahuje dvě fosforylační místa Thr491 a Ser494, které hrají roli při aktivaci RAF1 kinázy (Chong *et al.*, 2001)

Pro navázání inhibičního proteinu 14-3-3 musí být fosforylovaná místa Ser365 a Ser729 u BRAF kinázy. Fosforylace Thr599 a Ser602 je nezbytná pro aktivaci BRAF (Welbrock *et al.*, 2004).

Mutace RAF kináz, které jsou součástí regulačních kaskád organismu, jsou asociované s nádorovými onemocněními. Germinální mutace vedou k projevu vrozených syndromů. Mutace *RAF1* byly pozorovány u jedinců postižených syndromem Noonanové a LEOPARD. Mutace se obvykle projevují zvýšením aktivity RAF kinázy, například u RAF1 dochází k mutaci kodonu kódujícího Ser259, který je důležitý pro vazbu inhibitoru 14-3-3 (Pandit *et al.* 2007). BRAF mutace se vyskytují u CNC, syndromu Noonanové a u syndromu LEOPARD (Sarkozy *et al.*, 2009).

## 2.5 MEK

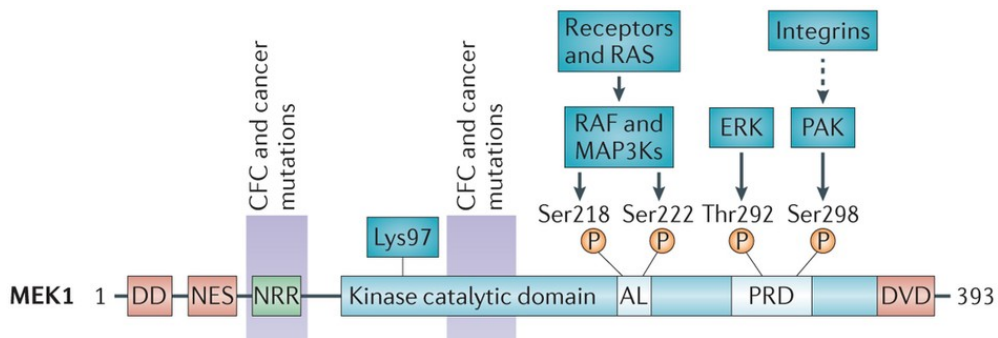
Součástí signální kaskády způsobující RASopatie jsou i mitogen aktivované kinázy MEK1 a MEK2, které mají schopnost fosforylovat, a tím aktivovat ERK1 a ERK2. MEK1 kináza je kódována *MAP2K1* genem, který se nachází na dlouhém raménku patnáctého chromozomu v pozici 15q22.1-q22.33. *MAP2K2* gen, jehož produktem je MEK2 kináza leží na krátkém raménku devatenáctého chromozomu v oblasti 19p13.3.

MEK kinázy obsahují na N-konci segment (Docking domain), který napomáhá vazbě efektoru MEK kinázy, a to ERK. Dále se zde nachází Nuclear export segment a regulační doména. Na C-konci najdeme kinázovou doménu, která v případě MEK1 a MEK2 obsahuje oblast bohatou na prolin (viz obrázek 7).

Pro aktivaci kinázy je zapotřebí fosforylace na dvou místech, Ser218 a Ser 222 (Zheng *et al.*, 2004). Tato místa jsou fosforylována RAF1 kinázou. Interakce MEK s upstream nebo

downstream komponenty je usnadňována scaffold proteiny. Fosforylace mají nejen aktivační, ale i inhibiční účinek, například fosforylace S212 (Gopalbhai *et al.*, 2003). Tato inhibice byla pozorována u MEK1, ale výskyt tohoto místa je potvrzen napříč celou skupinou MEK.

Gerinální mutace *MEK1* a *MEK2* jsou kauzálními pro CFC syndrom, a to asi z 25 % (Dentici *et al.*, 2009).



**Obrázek 7: Struktura MEK1**

Docking doména (DD) pro ERK, nuclear export sequence (NES), negative regulatory region (NRR), aktivační doména proteinu zanáčena modře, activation loop (AL)- místo aktivační fosforylace proteinu, proline rich domain (PRD)

Převzato z: Caunt, Christopher J., *et al.* "MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: the long and winding road." *Nature Reviews Cancer* 15.10 (2015): 577-592.

### **3 Cíle práce**

Cílem práce bylo vytvořit literární přehled o RASopatiích, genech, jejichž mutace je příčinou vzniku jednotlivých syndromů, a signální dráze, jejíž součástí jsou produkty těchto genů.

V praktické části pak byly pomocí sekvencování hledány mutace v genu *SOS1*, které mohou být kauzální pro vznik RASopatií.

## **4 Materiál a metodika**

### **4.1 Materiál**

Pro experimentální část bakalářské práce byla použita kontrolní DNA a vzorky DNA izolované z krve pacientů s podezřením na RASopatie. DNA poskytly Laboratoře Agel a.s., Nový Jičín. Byla analyzována DNA pěti pacientů, kteří nesli označení DD4, DD5, DD7, DD10 a DD12.

#### **4.1.1 Přístroje**

- Spektrofotometr NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)
- PCR box (Biosan)
- Termocyklér Mastercycler pro S (Eppendorf)
- Pipetovací robot Biomek 4000 (BeckmanCoulter)
- Elektroforetický zdroj Consort E815 (Scie-Plas)
- Chlazená centrifuga 5804R (Eppendorf)
- Sekvenátor ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
- Sekvenátor ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
- Fotoaparát (Olympus)
- Transiluminátor (Scie-Plas)
- Elektroforetická vana (Scie-Plas)
- Vortex (Biosan)

#### **4.1.2 Laboratorní pomůcky**

- Mikropipety (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1 000 µl - Eppendorf)
- Multikanálová pipeta 10 µl (Eppendorf)
- Jednorázové špičky s filtrem (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1 000 µl - Bioplastics)
- Mikrozkušavky (0,2 ml, 1,5 ml - Bioplastics)
- Jednorázové rukavice SensiPlus (Vulkan - medicals)
- Septa (Applied Biosystems)
- Stojan na mikrozkušavky (Bioplastics)
- Špičky do pipetovacího robota (Biomek AP96 P250 Pipette Beckman Coulter)

#### **4.1.3 Chemikálie a použité roztoky**

- Voda (PCR - H<sub>2</sub>O) (Bioline)
- LightCycler FastStart DNA Master HybProbe (Roche)



- *MyTaq* DNA polymerase (Bioline)
- HyperLadder 100 bp (Bioline)
- Agencourt CleanSEQ (Beckman Coulter)
- 85% Ethanol (Bio Basic)
- Alkalická fosfatáza (Thermo Scientific)
- Exonukleáza I (Thermo Scientific)
- BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
- BigDye Terminator Sequencing Buffer (Applied Biosystems)
- 10x TBE pufr
  - 216 g Tris (Bio Basic)
  - 110 g kyselina boritá (Bio Basic)
  - 80 ml 0,5M EDTA<sub>pH 8</sub>(Bio Basic)
  - doplnit do 2 l destilovanou H<sub>2</sub>O
- Ethidium Bromid (Bio Basic)
- Nanášecí barvička
  - 0,25 % bromfenylová modř (Bio Basic)
  - 0,25 % xylencyanol(Bio Basic)
  - 30 % glycerol v dH<sub>2</sub>O

## 4.2 Metodika

### 4.2.1 Navrhování primerů

Před samotnou prací bylo třeba navrhnout primery pro vyšetřovaný gen *SOS1* (viz tabulka 1). Pro každý z 23 exonů byla vytvořena dvojice primerů tak, aby jejich vlastní sekvence zasahovala až do intronové oblasti. Exony 10 a 23 byly příliš dlouhé, a tak byly pro každý z nich vytvořeny dvě dvojice primerů pomocí programu Primer - BLAST (Ye *et al.* 2012), který využívá Primer 3 pro navrhování primerů.

**Tabulka 1: Primery pro amplifikaci exonů genu *SOS1***

Označení primeru	Sekvence Primeru
<i>SOS1</i> -ex1-F	TCCGGGCCGCGTCCGTTCTCCAC
<i>SOS1</i> -ex1-R	ACGCGGCGAGACCGGGAAGAAAG
<i>SOS1</i> -ex3-F	ACCACATGTGAAAAGCTCTACT
<i>SOS1</i> -ex3-R	CCCTTAAAAGGCAAGAAGGCA
<i>SOS1</i> -ex4-F	TGTTGTTGGTAAGCACAGGC

<b>Označení primeru</b>	<b>Sekvence Primeru</b>
<i>SOSI</i> -ex4-R	ACTGGAGATATTCCCCAACACA
<i>SOSI</i> -ex5-F	GTGGAGGGATGCTGGCAATA
<i>SOSI</i> -ex5-R	CACAACACATTCAATGAGAGGCA
<i>SOSI</i> -ex6-F	AGGAGTCCTGAGACCAGAAAG
<i>SOSI</i> -ex6-R	AGGCTTTTATGCAGACTTTTCG
<i>SOSI</i> -ex7-F	ATTGTGCTCGCATAGTCGTG
<i>SOSI</i> -ex7-R	CTTTTCAGACATTGTACATCTTCAT
<i>SOSI</i> -ex8-F	GCCTGGGGCAGCACTTTATT
<i>SOSI</i> -ex8-R	CACACTAATGTGCAGGGTACTCA
<i>SOSI</i> -ex9-F	TGCCTGTCACAAGATATAACCCA
<i>SOSI</i> -ex9-R	TTACTTGAGGAGGGAAGTGGGA
<i>SOSI</i> -ex10 -1-F	TGGGGAATTAGTGAATACCTTCTCA
<i>SOSI</i> -ex10-1-R	CTCTTCAGCTGACTTGGCAGA
<i>SOSI</i> -ex10-2-F	GCCAAGACTTCCTGGTGCTA
<i>SOSI</i> -ex10-2-R	GCACAATAAACCCATGCAGGAA
<i>SOSI</i> -ex11-F	AGGAGGCACTAAGCTAGCAG
<i>SOSI</i> -ex11-R	TTATTGAAAAAGTGCTTGTGAAGT
<i>SOSI</i> -ex12-F	TGACTGGTGAAAACGTTTGTGG
<i>SOSI</i> -ex12-R	CACCCCTCTCCTTGTTTGGG
<i>SOSI</i> -ex13-F	TGGAAGTGTTAAGCACACTGA
<i>SOSI</i> -ex13-R	ACTGAGCCCCAATGACATCAA
<i>SOSI</i> -ex14-F	ATTCAGGTGTCATCCGTGTG
<i>SOSI</i> -ex14-R	TGCCTGGCCTTATTACTAGA
<i>SOSI</i> -ex15-F	TTCACAGACTTTCTGTTGGT
<i>SOSI</i> -ex15-R	GCATTGAAATTCATAACATAGCTGA
<i>SOSI</i> -ex16-F	GAGCAGTATGCCTGACTGGA
<i>SOSI</i> -ex16-R	ACTACTGAAAAGACAAATGAGACA
<i>SOSI</i> -ex17-F	GGGCGTTTCTGTTAGCCTAGT
<i>SOSI</i> -ex17-R	CTAAAGGGCTTCAGGTGCTAA
<i>SOSI</i> -ex18-F	TGGCAACTGAGATGGTACAG
<i>SOSI</i> -ex18-R	TCTCCCCTATAAAAATAAACCTGCCT
<i>SOSI</i> -ex19-F	GGGGAGAAAAAGTAAAATAAACCT
<i>SOSI</i> -ex19-R	TGGTAGTAATGACATCACCAGACAA
<i>SOSI</i> -ex20-F	TTAGATACCAGGGCTTTAGCAA

Označení primeru	Sekvence Primeru
<i>SOSI-ex20-R</i>	AGTACTAACAAATACCTTAATGCAC
<i>SOSI-ex21-F</i>	GCATTCTTTAAAACGACAATGACA
<i>SOSI-ex21-R</i>	AATGCTGCCAGACCCAAGAA
<i>SOSI-ex22-F</i>	GCATGCTTTTATGGCAGTTTGC
<i>SOSI-ex22-R</i>	AGTGAGAACTAAACTAGACAGCCG
<i>SOSI-ex23-1-F</i>	TGTTCCACACTTAGCATCCTGCCA
<i>SOSI-ex23-1-R</i>	TGTCGTGGAGGAACAGGCGG
<i>SOSI-ex23-2-F</i>	ACATCTCCAACCTCCCCCTT
<i>SOSI-ex23-2-R</i>	TCAGTGCTGGCACATTCAGT

#### 4.2.2 Optimalizace primerů

Nové primery byly optimalizovány (viz tabulka 2). Reakce se prováděly přednostně s *Faststart Taq* DNA polymerázou. Exon 14, který nebylo možné amplifikovat ani při různých teplotách polymerázou *Faststart Taq* DNA, byl amplifikován za použití *MyTaq* DNA polymerázy. Pro amplifikaci exonu 1 byl do reakční směsi přidán 1  $\mu$ l DMSO. Annealingová teplota byla 55°C nebo 60°C. Výjimkou z tohoto pravidla byl exon 8, jehož amplifikační teplota byla 50°C. Přítomnost PCR produktů byla ověřena pomocí elektroforézy.

**Tabulka 2: Podmínky PCR u amplifikovaných exonů**

Číslo exonu	Annealingová teplota	Použitá DNA polymeráza
Exon 1	60°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza <sup>1</sup>
Exon2	60°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza
Exon 3	60°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza
Exon 4	60°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza
Exon 5	55°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza
Exon 6	60°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza
Exon 7	55°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza
Exon 8	50°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza
Exon 9	55°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza
Exon 10-1	55°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza
Exon 10-2	55°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza
Exon 11	55°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza
Exon 12	60°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza
Exon 13	60°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza
Exon 14	55°C	<i>MyTaq</i> DNA polymeráza

<sup>1</sup> Přidán 1  $\mu$ l dimethylsulfoxidu

Číslo exonu	Annealingová teplota	Použitá DNA polymeráza
Exon 15	60°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza
Exon 16	55°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza
Exon 17	60°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza
Exon 18	60°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza
Exon 19	55°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza
Exon 20	55°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza
Exon 21	55°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza
Exon 22	60°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza
Exon 23-1	60°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza
Exon 23-2	60°C	<i>Faststart Taq</i> DNA polymeráza

#### 4.2.3 Měření koncentrace DNA

Měření koncentrace a čistoty DNA probíhalo na přístroji Nanodrop 2000 (viz tabulka 3).

Postup:

Nejprve byla stanovena nulová hodnota nanesením 1 µl destilované vody. Pro vlastní měření byl nanesen 1 µl vzorku DNA. Bylo spuštěno měření a hodnoty byly zaznamenány do tabulky.

**Tabulka 3: Koncentrace a čistota použité DNA**

Měřený vzorek	Koncentrace (ng/µl)	Poměr absorbancí (260/280)
<b>Referenční lidská DNA</b>	220	1,86
<b>DNA pacienta DD4</b>	57,8	1,91
<b>DNA pacienta DD5</b>	49,6	1,85
<b>DNA pacienta DD7</b>	55,4	1,90
<b>DNA pacienta DD10</b>	52,7	1,84
<b>DNA pacienta DD12</b>	57,6	1,93

#### 4.2.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

K PCR se používaly navržené primery a DNA pacientů, kteří nesli označení DD4, DD5, DD7, DD10 a DD12. Každý exon byl amplifikovaný zvlášť (podmínky viz tabulka 2).

Postup:

Všechny potřebné reagenty byly nachystány do sterilního boxu. Po rozmrznutí chemikálií byla připravena reakční směs (viz tabulka 4) pro každého pacienta smícháním termostabilní

polymerázy, vody a DNA, dle počtu fragmentů a negativní kontroly. Reakční směs byla pipetována do popsaných 0,2 ml mikrozkušavek po 19  $\mu\text{l}$ . Do každé zkumavky byla následně přidána daná dvojice primerů (F a R). Vzorčky byly vortexovány a centrifugovány. Zkumavky byly vloženy do termocycleru, teplotní profily reakce se lišily u jednotlivých skupin primerů (viz tabulky 5, 6, a 7)

**Tabulka 4: Složení reakční směsi pro amplifikaci exonu genu *SOS1***

Chemikálie	Pipetovaný objem
DNA polymeráza	10 $\mu\text{l}$
Voda	8 $\mu\text{l}$
DNA	1 $\mu\text{l}$
Primer F	1 $\mu\text{l}$
Primer R	1 $\mu\text{l}$

**Tabulka 5: Teplotní profil PCR pro amplifikaci primerů annealingovou teplotou 60°C (pro exony: 1, 2, 3, 4, 6, 12, 13, 15, 17, 18)**

Denaturace	95 °C	5 min	
Denaturace	95 °C	30 sec	32 cyklů
Annealing	60 °C	30 sec	
Syntéza	72 °C	30 sec	
Dosyntetizování	72 °C	10 min	

**Tabulka 6: Teplotní profil PCR pro amplifikaci primerů annealingovou teplotou 55°C (pro exony 5, 7, 9, 10-1, 10-2, 11, 14, 16, 19)**

Denaturace	95 °C	5 min	
Denaturace	95 °C	30 sec	32 cyklů
Annealing	55 °C	30 sec	
Syntéza	72 °C	30 sec	
Dosyntetizování	72 °C	10 min	

**Tabulka 7: Teplotní profil PCR pro amplifikaci primerů annealingovou teplotou 50°C (pro exon 8)**

<b>Denaturace</b>	95 °C	5 min	
<b>Denaturace</b>	95 °C	30 sec	32 cyklů
<b>Annealing</b>	50 °C	30 sec	
<b>Syntéza</b>	72 °C	30 sec	
<b>Dosyntetizování</b>	72 °C	10 min	

#### 4.2.5 Ověření výsledků pomocí elektroforézy

Pro ověření výsledků polymerázové řetězové reakce byla provedena elektroforéza.

Postup:

Nejprve byl připraven 2% agarózový gel. V mikrovlnné troubě bylo rozvařeno 12 g agarózy rozpuštěné v 600 ml 1x TBE pufru. Po zchlazení bylo do agarózy přidáno 30 µl ethidium bromidu. Takto připravený gel byl nalit do vaničky s předem připravenými hřebeny.

Po ztuhnutí byl gel vložen do elektroforetické vany naplněné puftrem. Do první jamky byly nanесeny 2 µl markeru molekulové hmotnosti, do ostatních jamek bylo nanесeno 7 µl PCR produktu, který byl promíchán s 2 µl nanášecího pufru. Vzorky byly separovány 25 minut při napětí 200 V. Výsledky elektroforézy byly vizualizovány pomocí transluminátoru. Gel se vzorky byl vyfocen a vyhodnocen.

#### 4.2.6 Purifikace PCR produktů

Produkty byly pročištěny pomocí exonukleázy a alkalické fosfatázy, aby výsledek sekvencování byl kvalitní a dobře čitelný (odstranění nevyužitých primerů, dNTP's, solí a nekompletních fragmentů). Poměr jednotlivých enzymů využívaný v této reakci byl 1:2. Exonukleáza, která štěpí fosfodiesterovou vazbu na volných koncích, se používá při odstranění jednořetězových primerů. Alkalická fosfatáza slouží k defosforylaci volných dNTP's.

Postup:

Nejprve byly popsány sterilní stripy. Následně byla do čisté zkumavky pipetována směs enzymů exonukleázy a alkalické fosfatázy v poměru 1:2. Před použitím bylo potřeba enzymy

vortexovat. Do jednotlivých zkumavek bylo napipetováno 1,5 µl roztoku výše zmíněných enzymů. K nim pak bylo pipetováno 5 µl PCR produktů pomocí multikanálové pipety.

Vzorky pak byly vloženy do termocycleru (teplotní profil viz tabulka 8).

**Tabulka 8: Teplotní profil purifikace PCR produktů**

Krok	Teplota	Doba trvání
1	37°C	15 min
2	85°C	15 min

#### 4.2.7 Sekvenční reakce

Sekvenační reakce probíhá obdobně jako klasická PCR. Kromě dNTP jsou v reakční směsi i ddNTP, jejichž zařazením je ukončena syntéza vznikajícího vlákna. Tyto nukleotidy mohou být značeny, v našem případě fluorescenčně.

Postup:

Po rozmrznutí chemikálií byla připravena reakční směs smícháním BigDye terminátoru 1.1, vody, a sekvenačního pufru dle počtu vzorků (viz tabulka 10). Reakční směs byla pipetována do popsaných 0,2 ml mikrozskumavek po 7 µl. Do každé zkumavky byl následně přidán jeden z dvojice primerů (F nebo R) a PCR produkt. Vzorky byly zcentrifugovány a vloženy do termocycleru (viz tabulka 9).

**Tabulka 9: Teplotní profil sekvenační reakce**

Denaturace	96 °C	1 min	25 cyklů
Denaturace	96 °C	10 sec	
Annealing	50 °C	5 sec	
Syntéza	60 °C	4min	

**Tabulka 10: Složení reakční směsi sekvenační reakce**

	<b>1x</b>	<b>10x</b>	<b>25x</b>
<b>BigDye</b>	1 µl	10 µl	25 µl
<b>Voda</b>	5 µl	50 µl	125 µl
<b>Sekvenační pufr</b>	1 µl	10 µl	25 µl
<b>Primer F/R</b>	0,5 µl	5 µl	12,5 µl
<b>PCR produkt</b>	0,8 µl	8 µl	20 µl

#### **4.2.8 Automatická purifikace sekvenačního produktu pomocí pipetovacího robota Biomek 4000**

Před sekvenací byly vzorky opětovně pročištěny pomocí pipetovacího robota Biomek 4000. Byl použit program CleanSEQ, který purifikuje produkty sekvenační reakce na bázi magnetických kuliček. Produkty sekvenační reakce se navážou na magnetické kuličky. Obsah zkumavky je promýván za účelem odstranění kontaminujících látek. Odplavení produktů je zabráněno výše zmíněným navázáním na magnetické kuličky, které po umístění na magnetickou desku tvoří po obvodu zkumavky prsteneček. DNA je v konečné fázi eluována do pufru.

Postup:

Produkty sekvenační reakce byly napipetovány do PCR desky, která byla následně zcentrifugována. Do pipetovacího robota byly voženy špičky a byly připraveny reagenty dle programu CleanSEQ a dle počtu vzorků. Následně byl spuštěn program CleanSEQ.

#### **4.2.9 Automatické sekvenování**

Připravené vzorky byly vloženy do sekvenátoru (ABI 3130 Genetic Analyzer - Applied Biosystems) a byla zahájena sekvenace při 2 V a času nástřiku 3 s. Výsledky byly zanalyzovány pomocí programu Sequencis Analysis 5.1.1.

Získané sekvence byly porovnány s referenční sekvencí za pomocí programu Sequencher.



## 5 Výsledky

Experimentální část bakalářské práce se zabývala zavedením vyšetření genu *SOS1*, jehož produktem je GEF, který způsobuje aktivaci RAS proteinu a je součástí RAS/MAPK buněčné signální dráhy.

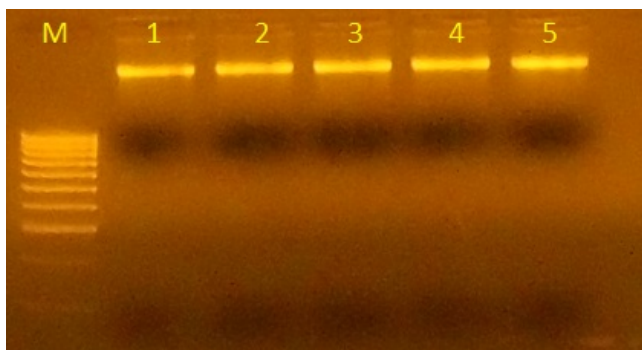
Mutace v tomto genu mohou být důvodem k deregulaci dané dráhy, jejímž důsledkem může být v případě germinální mutace vývoj RASopatií. Mutace *SOS1* se podílejí na vzniku syndromu Noonanové asi v 17 % případů (Tartaglia *et al.*, 2007).

Vyšetření tohoto genu je součástí diagnostiky RASopatií. Nejprve byla získána referenční sekvence genu *SOS1*, kterou lze najít pod označením NM\_005633.3. Díky referenční sekvenci a programu Primer - BLAST, který využívá primer 3 pro designování primerů, byly vytvořeny primery pro amplifikaci exonů genu *SOS1*. Primery byly navrženy v intronech minimálně 20 bp před daným exonem a po něm (primery viz tabulka1).

Po navržení byla provedena optimalizace PCR za použití referenční lidské DNA (kontrolní DNA), která měla výchozí koncentraci 220 ng/μl a poměr absorbancí 260/280 byl 1,86. Celistvost referenční DNA byla před použitím ověřena pomocí horizontální elektroforézy v 2% agarózovém gelu (viz obrázek 8).

Výsledky optimalizace PCR byly také ověřeny separací v 2% agarózovém gelu. PCR produkty byly vizualizovány pomocí ethidium bromidu. (výsledky optimalizace viz obrázek 9a, 9b, 9c, 9d)

**Obrázek 8: Elektroforéza referenční lidské DNA**

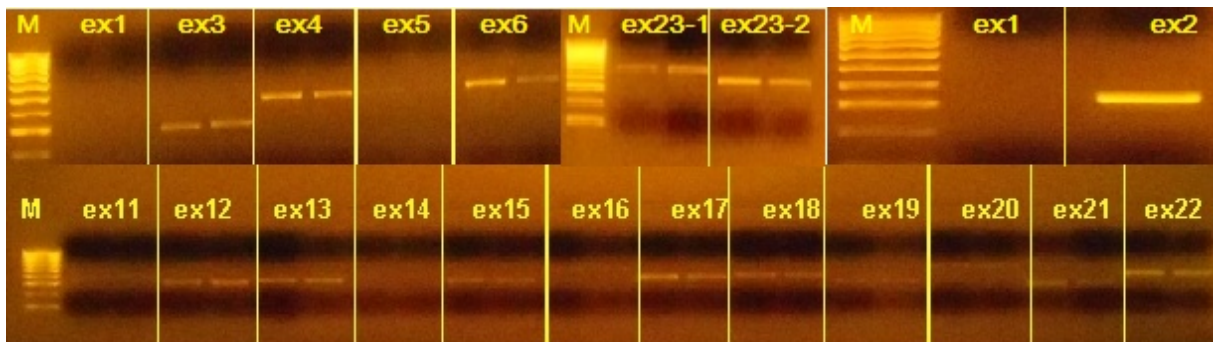


Legenda:

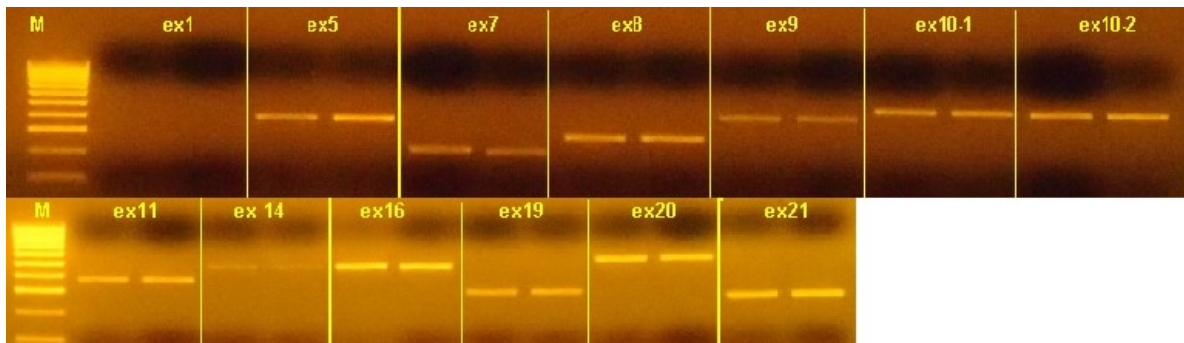
M marker molekulové hmotnosti

1-5 referenční lidská DNA

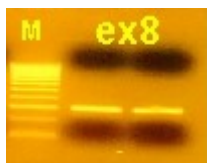
**Obrázek 9a:** Agarózový gel s amplifikovanými exony genu *SOS1* při annealingové teplotě 60°C za použití *FastStart* DNA polymerázy



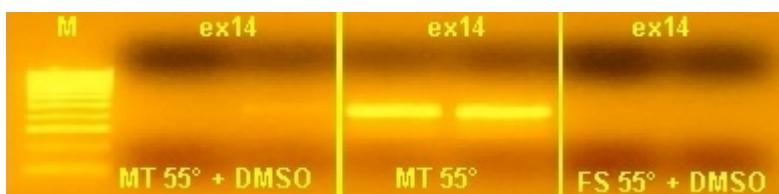
**Obrázek 9b:** Agarózový gel s amplifikovanými exony genu *SOS1* při annealingové teplotě 55°C za použití *FastStart* DNA polymerázy



**Obrázek 9c:** Agarózový gel s amplifikovanými exony genu *SOS1* při annealingové teplotě 50°C za použití *FastStart* DNA polymerázy



**Obrázek 9d:** Agarózový gel s amplifikovanými exony genu *SOS1* při annealingové teplotě 55°C za použití *MyTaq* DNA polymerázy



U souboru pěti pacientů bylo provedeno vyšetření genů RAS/MAPK signální kaskády pomocí sekvencování a následného porovnání získaných sekvencí s referenční sekvencí. Po navržení

primerů a optimalizaci PCR byl vyšetřen gen *SOS1* u pěti pacientů, kteří vykazovali fenotypové projevy RASopatií.

Každý exon *SOS1* genu byl sekvencován oboustranně (v jedné reakci ve směru 5'-3' a v druhé 3'-5') pomocí forward a reverse primeru. Analýza byla provedena na sekvenátoru ABI (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Výsledky sekvencování byly porovnány s referenční sekvencí NM\_005633.3. Ani u jednoho z pěti pacientů nebyla nalezena mutace v genu *SOS1*. Objeveny byly jen polymorfismy v intronové oblasti (viz tabulka 11).

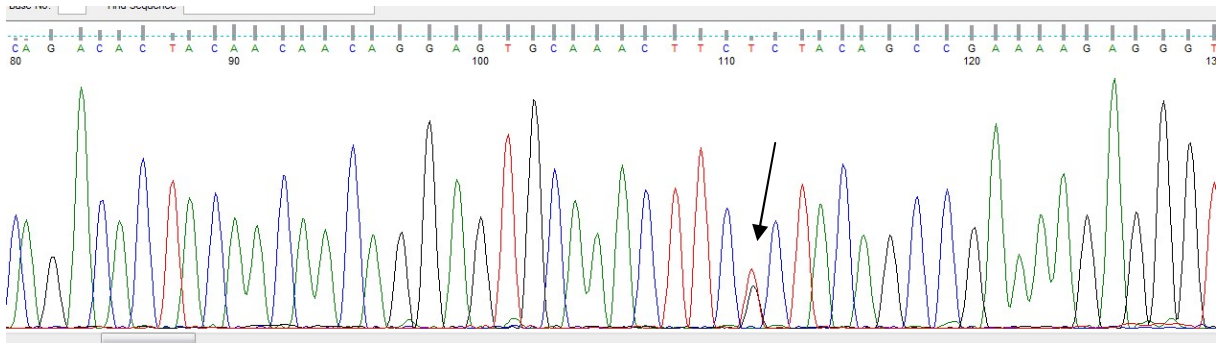
**Tabulka 11: Seznam nalezených polymorfismů intronů genu *SOS1***

Identifikační číslo pacienta	Vyšetřovaný exon	Nalezený polymorfismus
DD4	ex9	c. 1076-97_99dupGTG
DD4	ex17	c.2792 + 53 C>T homozygotní
DD4	ex18	c. 2793 -58_59 insA homozygotní
DD4	ex18	c. 2965 + 43 C>A homozygotní
DD5	ex9	c. 1076-97_99dupGTG
DD5	ex17	c.2792 + 53 C>T homozygotní
DD5	ex18	c. 2793 -58_59 insA homozygotní
DD5	ex22	c.3393-89 T>G homozygotní
DD7	ex17	c.2792 + 53 C>T homozygotní
DD7	ex18	c. 2793 -58_59 insA homozygotní
DD7	ex18	c. 2965 + 43 C>A homozygotní
DD7	ex22	c.3393-89 T>G homozygotní
DD10	ex17	c.2792 + 53 C>T homozygotní
DD10	ex18	c. 2793 -58_59 insA homozygotní
DD10	ex18	c. 2965 + 43 C>A homozygotní
DD12	ex5	c. 512-115 T>C homozygotní
DD12	ex17	c.2792 + 53 C>T homozygotní
DD12	ex18	c. 2793 -58_59 insA homozygotní
DD12	ex18	c. 2965 + 43 C>A homozygotní
DD12	ex9	c. 1076-97_99dupGTG
DD12	ex22	c.3393-89 T>G homozygotní

Zavedením sekvenace genu *SOS1* se zkompletovalo na pracovišti spektrum analýz pro syndrom Noonanové. Následně byla v souboru pěti indikovaných pacientů s podezřením na Noonanové syndrom provedena mutační analýza všech pěti souvisejících genů *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *BRAF* a *KRAS*. U pacienta s identifikačním číslem DD7 měl indikující lékař v rámci diferenciální diagnostiky podezření na Costello syndrom. Tudíž byl vyšetřen i gen *HRAS*.

V tomto souboru pacientů byla nalezena jen jedna kauzální mutace u pacienta s identifikačním číslem DD10. A to genu *PTPN11* c.785 T>G (p.Leu262Arg) (viz obrázek 10, 11).

**Obrázek 10: Sekvence genu *PTPN11* pacienta DD10 s nalezenou kauzální mutací c. 785 T>G (p.Leu262Arg) způsobující Costello syndrom**



**Obrázek 11: Sekvence úseku genu *PTPN11* s červeně vyznačeným nukleotidem, jehož mutace byla detekována**

```

Y *RR**** K* R YW *D R MR KD R R
961 CAA C A A C A G G A G T G C A A A C T T C T C T A C A G C C G A A A A G A G G G T C A A A G G C A A G A A A A C A A A
763 C A C A A C A G G A G T G C A A A C T T C T C T A C A G C C G A A A A G A G G G T C A A A G G C A A G A A A A C A A A
255 - Q - - Q - - Q - - E - - C - - K - - L - - L - - Y - - S - - R - - K - - E - - G - - Q - - R - - Q - - E - - N - - K -

```

Po kompletním vyšetření pacientů na požadované geny nebyla nalezena kauzální mutace pro syndrom Noonanové ve vyšetřovaných genech u pacientů DD4, DD5, DD7 a DD12. U pacienta DD7 nebyla nalezena mutace způsobující Costello syndrom.

## 6 Diskuse

RASopatie vznikají germinálními mutacemi genů, jejichž produktem jsou části RAS/MAPK buněčné signální dráhy. Jelikož se jedná o deregulaci jedné signální kaskády, jednotlivé syndromy se fenotypově překrývají a jsou charakteristické genotypovou a fenotypovou variabilitou. Přesná diagnóza bez genetického testování je proto obtížná. Pro správnou diagnostiku je ideální provést vyšetření genů kódujících produkty RAS/MAPK signální kaskády.

Cílem této práce bylo provést literární rešerši syndromových onemocnění známých jako RASopatie. Praktická část se zabývala kompletováním vyšetření RASopatií zavedením analýzy *SOS1* genu, který kóduje GEF. Mutace *SOS1* vedou obvykle k nadměrné aktivaci downstream proteinu, kterým je RAS (Roberts *et al.*, 2006).

Mutace *SOS1* jsou po mutacích *PTPN11* druhou nejčastější příčinou vzniku syndromu Noonanové. Mutace toho genu, jehož funkčním produktem je GEF, jsou identifikovány u 17 % jedinců se syndromem Noonanové (Tartaglia *et al.*, 2007). Mutace genu *PTPN11* jsou detekovány u poloviny jedinců se syndromem Noonanové (Tartaglia *et al.*, 2001). Dalším genem souvisejícím se syndromem Noonanové je *RAF*, který je detekován u 3-17 % jedinců. *KRAS* mutace je identifikována u méně než 5 % jedinců. Mutace genů *NRAS*, *BRAF*, a *MAP2K1* je zachycena u méně než 1 % jedinců (Allanson, 1987).

Costello syndrom je způsoben pouze mutacemi genu *HRAS*.

Kardio-facio-kutánní syndrom je způsoben mutací genů *BRAF*, *MAP2K1*, *MAP2K2* nebo *KRAS*. Nejčastěji jsou evidovány mutace *BRAF*. Vzhledem k malé frekvenci výskytu onemocnění je četnost mutací jednotlivých genů závislá na skupině jedinců, kterou mají jednotlivé studie k dispozici. Frekvence výskytu mutace *BRAF* genu u pacientů s kardio-facio-kutánním syndromem se pohybuje od 37 % (Niihori *et al.*, 2006) do 75 % (Rodriguez-Viciano *et al.*, 2006). *MAP2K1* a *MAP2K2* mutace byly objeveny u 25 % pacientů (Rodriguez-Viciano *et al.*, 2006). *KRAS* mutace se podílejí na vzniku syndromu jen z 5 % (Niihori *et al.*, 2006).

LEOPARD syndrom je nejčastěji způsoben mutací genu *PTPN11* nebo *RAF1*. Mutace *PTPN11* je detekována přibližně u 90 % pacientů s LEOPARD syndromem. Zbytek mutací je nalezen v genu *RAF1*. V současnosti jsou evidovány i mutace v genech *BRAF* a *MAP2K1* a předpokládá se, že existuje ještě jeden kauzální gen (Gelb *et al.*, 2015).

Kompletní vyšetření pacienta, u něhož je podezření na RASopatie, zahrnuje detekci mutací i ve všech výše zmíněných genech. Ve většině případů je mutace objevena v genu *PTPN11*.

RASopatie jsou obvykle způsobeny *de novo* mutací. Pokud je však mutace předávána vertikálně, sledujeme autozomálně dominantní dědičnost. Uvádí se, že 30-70 % jedinců s diagnostikovaným syndromem Noonanové má rodiče vykazujícího symptomy tohoto syndromu (Allanson *et al.* 2016).

Kardio-facio-kutánní syndrom má celosvětově malou četnost výskytu. U většiny diagnostikovaných jedinců je syndrom způsoben *de novo* mutací. Jsou ovšem zaznamenány i případy předávání mutace v rámci několika generací (Rauen *et al.*, 2010). V belgické rodině byl pozorován přenos RASopatií souvisejících s chromozomem 12, tedy genem *PTPN11*, kdy někteří členové byli diagnostikováni syndromem Noonanové a jiní CFC syndromem (Legius *et al.*, 1998).

Costello syndrom je způsoben *de novo* mutací. Rodiče probanda nejsou téměř nikdy nositeli mutace, známy jsou pouze případy somatického mozaicismu u jednoho z rodičů (Gripp *et al.*, 2006).

LEOPARD syndrom je obvykle způsoben *de novo* mutací, ale je znám i přenos syndromu z rodiče na potomka (Digilio *et al.*, 2006).

Ve vyšetřované skupině pacientů byla nalezena jen jedna kauzální mutace způsobující RASopatie, a to u pacienta s označením DD10. Byla nalezena mutace genu *PTPN11* c.785 T>G (p.Leu262Arg). Tato konkrétní mutace již byla identifikována jako missense mutace zapříčínující vznik syndromu Noonanové. Tato pacientka má ve svých šesti letech výšku 99 cm, krátký krk, široký hrudník s krátkým segmentem. U pacientky byla již provedena cytogenetická vyšetření, která určila, že pacientčin karyotyp je standardní. Zároveň byl vyšetřen i gen *SHOX*, jehož mutace zapříčínuje krátký vzrůst. Po těchto vyšetřeních byla pacientka vyšetřena s podezřením na RASopatie. Diagnóza byla potvrzena nalezením kauzální mutace.

Léčba pacientů s RASopatií není v současné době možná. Většinou se přistupuje k symptomatické léčbě a pravidelným preventivním prohlídkám postiženého jedince.

Pro určení diagnózy ostatních pacientů se berou v úvahu syndromy s podobným fenotypovým projevem.

Podobný fenotypový projev jako syndrom Noonanové, na který byli testováni všichni pacienti, mají i ostatní syndromy, které jsou společně se syndromem Noonanové řazeny mezi RASopatie. U jednoho pacienta byl vyšetřen i *HRAS* gen, kvůli podezření na přítomnost Costello syndromu. Syndrom Noonanové a Costello syndrom mají podobný fenotypový projev, který je jasněji rozlišitelný s přibývajícím věkem jedinců (Kripp *et al.*, 2012).

CFC má společný projev se syndromem Noonanové. Ovšem jedinci se CFC syndromem mají obvykle nižší intelektuální schopnosti a hrubější rysy v obličeji.

Nejobtížnější je odlišit syndrom Noonanové od LEOPARD syndromu. Diagnóza může být v tomto případě určena díky přítomnosti mnohačetných lentig a jiných dvou projevů typických pro LEOPARD syndrom (Veron *et al.*, 1976). Při absenci lentig jsou nutné tři typické projevy a blízký příbuzný s potvrzenou diagnózou LEOPARD syndromu.

Při diagnostice přichází v úvahu i „Noonan-like syndrome with loose anagen hair“. Tento syndrom je způsoben mutacemi genu *SHOC2*, jehož produktem je modulátor RAS/MAPK signální kaskády (Cordeddu *et al.*, 2009). Patogenetické varianty *SHOC2* vedou u pozorovaných jedinců k typickým projevům syndromu Noonanové.

Při hledání diagnózy se může přistoupit i ke genetickému testování *CBL* genu. Heterozygotní missense mutace tohoto genu mohou zapříčinit změnu signalizace RAS. Výsledným projevem je fenotyp shodný, nebo podobný syndromu Noonanové (Martinelli *et al.*, 2010).

Diferenciální diagnostika RASopatií od Turnerova syndromu je prováděna pomocí cytogenetického ověření přítomnosti X chromozomu (Allanson *et al.*, 2015).

Podobný projev, který je pozorován u RASopatií, mají i jedinci s Williamsovým syndromem. Jedinci s Williamsovým syndromem se stejně jako ti s RASopatií vyznačují opožděným vývojem, nízkým vzrůstem, malformacemi v obličeji a vrozenými srdečními vadami. Onemocnění je ale způsobeno delecí elastin genu (*ELN*), kterou lze detekovat pomocí fluorescenční in situ hybridizace (Morris, 1999).

## 7 Závěr

Tato práce se zabývá shrnutím nejnovějších poznatků o RASopatiích, které vznikají mutacemi v genech *PTPN11*, *SOS1*, *KRAS*, *NRAS*, *HRAS*, *BRAF* a *MAP2K1* a *MAPK2K2*. Tyto syndromy jsou ve většině případů způsobeny *de novo* mutací. Mutace jsou autozomálně dominantní, a v některých případech jsou identifikováni rodiče nesoucí danou mutaci. Jsou zaznamenáváni zejména u jedinců se syndromem Noonanové, a to u 30-70 % probandů. U ostatních RASopatií jsou identifikováni příbuzní nesoucí mutaci jen výjimečně. Diagnóza je komplikovaná zejména kvůli genetické heterogenitě a fenotypové variabilitě.

Tato práce se soustředila především na gen *SOS1*. Pro kompletní vyšetření RASopatií bylo na pracovišti zavedeno testování tohoto genu, jehož mutace jsou detekovány jako kauzální mutace pro vznik syndromu Noonanové.

Po zavedení byl vybrán soubor pěti pacientů, u kterých se kvůli fenotypovým projevům usuzovalo na RASopatii. Po kompletním vyšetření bylo zjištěno, že pouze u jednoho pacienta byla nalezena kauzální mutace genu *PTPN11* c.785 T>G (p.Leu262Arg). Tato mutace je již evidována v databázi ve spojitosti s projevem syndromu Noonanové.

Při diferenciálně diagnostické úvaze je třeba u těchto pacientů brát v úvahu onemocnění s podobným fenotypovým projevem.

Na závěr nelze opomenout, že somatické mutace v analyzovaných genech mají obvykle aktivační charakter a jsou asociovány s nádorovými onemocněními.



## 8 Seznam použité literatury

- Achiron, Reuwen, *et al.* "Noonan syndrome: a cryptic condition in early gestation." *American journal of medical genetics* 92.3 (2000): 159-165.
- Aksamitiene, Edita, Anatoly Kiyatkin, and Boris N. Kholodenko. "Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance." *Biochemical Society Transactions* 40.1 (2012): 139-146.
- Allanson, Judith E. "Noonan syndrome." *Journal of medical genetics* 24.1 (1987): 9.
- Aoki, Yoko, *et al.* "Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome." *Nature genetics* 37.10 (2005): 1038-1040.
- Armour, Christine M., and Judith E. Allanson. "Further delineation of cardio-facio-cutaneous syndrome: clinical features of 38 individuals with proven mutations." *Journal of medical genetics* 45.4 (2008): 249-254.
- Axelrad, Marni E., *et al.* "Neurocognitive, adaptive, and behavioral functioning of individuals with Costello syndrome: a review." *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. Vol. 157. No. 2. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2011.
- Baldassarre, G., *et al.* "Prenatal features of Noonan syndrome: prevalence and prognostic value." *Prenatal diagnosis* 31.10 (2011): 949-954.
- Boriack-Sjodin, P. Ann, *et al.* "The structural basis of the activation of Ras by Sos." *Nature* 394.6691 (1998): 337-343.
- Bos, Johannes L. "Ras oncogenes in human cancer: a review." *Cancer research* 49.17 (1989): 4682-4689.
- Buday, László, and Julian Downward. "Many faces of Ras activation." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 1786.2 (2008): 178-187.
- Carta, Claudio, *et al.* "Germline missense mutations affecting KRAS isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype." *The American Journal of Human Genetics* 79.1 (2006): 129-135.
- Cirstea, Ion C., *et al.* "A restricted spectrum of NRAS mutations causes Noonan syndrome." *Nature genetics* 42.1 (2010): 27-29.

- Coppin, Brian D., and I. Karen Temple. "Multiple lentiginos syndrome (LEOPARD syndrome or progressive cardiomyopathic lentiginosis)." *Journal of medical genetics* 34.7 (1997): 582-586.
- Cordeddu, Viviana, *et al.* "Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair." *Nature genetics* 41.9 (2009): 1022-1026.
- Costello, J. M. "NEW SYNDROME." *NEW ZEALAND MEDICAL JOURNAL*. Vol. 74. No. 475. PO BOX 156, WELLINGTON, NEW ZEALAND: NEW ZEALAND MED ASSN, 1971.
- Dentici, Maria Lisa, *et al.* "Spectrum of MEK1 and MEK2 gene mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome and genotype-phenotype correlations." *European Journal of Human Genetics* 17.6 (2009): 733-740
- Digilio, Maria Cristina, and B. Marino. "Clinical manifestations of Noonan syndrome." *Images Paediatr Cardiol* 7 (2001): 19-30.
- Digilio, M. Cristina, *et al.* "LEOPARD syndrome: clinical diagnosis in the first year of life." *American journal of medical genetics Part A* 140.7 (2006): 740-746.
- Dougherty, Michele K., *et al.* "Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation." *Molecular cell* 17.2 (2005): 215-224.
- Friday, Bret B., and Alex A. Adjei. "Advances in targeting the Ras/Raf/MEK/Erk mitogen-activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy." *Clinical Cancer Research* 14.2 (2008): 342-346.
- Gelb, Bruce D., and Marco Tartaglia. "Noonan syndrome and related disorders: dysregulated RAS-mitogen activated protein kinase signal transduction." *Human molecular genetics* 15.suppl 2 (2006): R220-R226.
- Gelb, Bruce D., and Marco Tartaglia. "Noonan Syndrome with Multiple Lentiginos." (2015).
- Goodwin, Alice F., *et al.* "Craniofacial and dental development in cardio-facio-cutaneous syndrome: the importance of Ras signaling homeostasis." *Clinical genetics* 83.6 (2013): 539-544.

- Gopalbhai, Kailesh, *et al.* "Negative regulation of MAPKK by phosphorylation of a conserved serine residue equivalent to Ser212 of MEK1." *Journal of Biological Chemistry* 278.10 (2003): 8118-8125.
- Gorlin, Robert J., Ray C. Anderson, and Michael Blaw. "Multiple lentigenes syndrome: complex comprising multiple lentigenes, electrocardiographic conduction abnormalities, ocular hypertelorism, pulmonary stenosis, abnormalities of genitalia, retardation of growth, sensorineural deafness, and autosomal dominant hereditary pattern." *American journal of diseases of children* 117.6 (1969): 652-662.
- Gripp, Karen W., and Angela E. Lin. "Costello syndrome." (2012).
- Hennekam, Raoul. "Costello syndrome: an overview." *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. Vol. 117. No. 1. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2003. Hof, Peter, *et al.* "Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2." *Cell* 92.4 (1998): 441-450.
- Chong, Hui, Jeeyong Lee, and Kun Liang Guan. "Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation." *The EMBO journal* 20.14 (2001): 3716-3727
- Chong, Hui, Haris G. Vikis, and Kun-Liang Guan. "Mechanisms of regulating the Raf kinase family." *Cellular signalling* 15.5 (2003): 463-469.
- Jamieson, C. Ruth, *et al.* "Mapping a gene for Noonan syndrome to the long arm of chromosome 12." *Nature genetics* 8.4 (1994): 357-360.
- Jongmans, Marjolijn, *et al.* "Genotypic and phenotypic characterization of Noonan syndrome: new data and review of the literature." *American journal of medical genetics Part A* 134.2 (2005): 165-170.
- Kosaki, Kenjiro, *et al.* "PTPN11 (protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor-type 11) mutations in seven Japanese patients with Noonan syndrome." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87.8 (2002): 3529-3533.
- Kratz, Christian P., Charlotte M. Niemeyer, and Martin Zenker. "An unexpected new role of mutant Ras: perturbation of human embryonic development." *Journal of Molecular Medicine* 85.3 (2007): 227-235.

- Legius, Eric, *et al.* "Fine mapping of Noonan/cardio-facio cutaneous syndrome in a large family." *European Journal of Human Genetics* 6.1 (1998).
- Li, Weidong, *et al.* "The HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin reverses the learning and attention deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1." *Current Biology* 15.21 (2005): 1961-1967.
- Lin, Angela E., *et al.* "Further delineation of cardiac abnormalities in Costello syndrome." *American journal of medical genetics* 111.2 (2002): 115-129.
- Margarit, S. Mariana, *et al.* "Structural evidence for feedback activation by Ras· GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS." *Cell* 112.5 (2003): 685-695.
- Martinelli, Simone, *et al.* "Heterozygous germline mutations in the CBL tumor-suppressor gene cause a Noonan syndrome-like phenotype." *The American Journal of Human Genetics* 87.2 (2010): 250-257.
- Messiaen, Ludwine, *et al.* "Clinical and mutational spectrum of neurofibromatosis type 1-like syndrome." *Jama* 302.19 (2009): 2111-2118.
- Mor, Adam, and Mark R. Philips. "Compartmentalized ras/mapk signaling." *Annu. Rev. Immunol.* 24 (2006): 771-800.
- Morris, Colleen A. "Williams syndrome." *Management of genetic syndromes* (1999) .
- Morrison, Deborah K., and Richard E. Cutler. "The complexity of Raf-1 regulation." *Current opinion in cell biology* 9.2 (1997): 174-179.
- Musante, Luciana, *et al.* "Spectrum of mutations in PTPN11 and genotype-phenotype correlation in 96 patients with Noonan syndrome and five patients with cardio-facio-cutaneous syndrome." *European journal of human genetics* 11.2 (2003): 201-206.
- Niihori, Tetsuya, *et al.* "Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome." *Nature genetics* 38.3 (2006): 294-296.
- Noordam, C., *et al.* "Long-term GH treatment improves adult height in children with Noonan syndrome with and without mutations in protein tyrosine phosphatase, non-receptor-type 11." *European Journal of Endocrinology* 159.3 (2008): 203-208.

- Pandit, Bhaswati, *et al.* "Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy." *Nature genetics* 39.8 (2007): 1007-1012.
- Pálová "Neurofibromatóza typu 1 – najčastejšia dedičná predispozícia k malignitám" *in Vitro Onkológia* (2016).
- Pierpont, Mary Ella M., *et al.* "Cardio-facio-cutaneous syndrome: clinical features, diagnosis, and management guidelines." *Pediatrics* 134.4 (2014): e1149-e1162.
- Rajalingam, Krishnaraj, *et al.* "Ras oncogenes and their downstream targets." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1773.8 (2007): 1177-1195.
- Rauen, Katherine A. "HRAS and the Costello syndrome." *Clinical genetics* 71.2 (2007): 101-108.
- Rauen, Katherine A., *et al.* "Molecular and functional analysis of a novel MEK2 mutation in cardio-facio-cutaneous syndrome: Transmission through four generations." *American Journal of Medical Genetics Part A* 152.4 (2010): 807-814.
- Rauen, Katherine A. "Cardiofaciocutaneous syndrome." (2012).
- Rauen, Katherine A. "The RASopathies." *Annual review of genomics and human genetics* 14 (2013): 355.
- Roberts, Amy, *et al.* "The cardiofaciocutaneous syndrome." *Journal of medical genetics* 43.11 (2006): 833-842.
- Reynolds, James F., *et al.* "New multiple congenital anomalies/mental retardation syndrome with cardio-facio-cutaneous involvement—the CFC syndrome." *American journal of medical genetics* 25.3 (1986): 413-427.
- Rodriguez-Viciana, Pablo, *et al.* "Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome." *Science* 311.5765 (2006): 1287-1290.
- Sarkozy, Anna, *et al.* "Germline BRAF mutations in Noonan, LEOPARD and cardiofaciocutaneous syndromes: molecular diversity and associated phenotypic spectrum." *Human mutation* 30.4 (2009): 695.

- Sarkozy, Anna, Maria Cristina Digilio, and Bruno Dallapiccola. "Leopard syndrome." *Orphanet journal of rare diseases* 3.1 (2008): 1-8.
- Sarkozy, A., *et al.* "Clinical and molecular analysis of 30 patients with multiple lentiginos LEOPARD syndrome." *Journal of medical genetics* 41.5 (2004): e68-e68.
- Schuhmacher, Alberto J., *et al.* "A mouse model for Costello syndrome reveals an AngII-mediated hypertensive condition." *The Journal of clinical investigation* 118.6 (2008): 2169-2179.
- Sharland, M., *et al.* "A clinical study of Noonan syndrome." *Archives of disease in childhood* 67.2 (1992): 178-183.
- Shaw, Adam C., *et al.* "The natural history of Noonan syndrome: a long-term follow-up study." *Archives of disease in childhood* 92.2 (2007): 128-132.
- Sondermann, Holger, *et al.* "Structural analysis of autoinhibition in the Ras activator Son of sevenless." *Cell* 119.3 (2004): 393-405.
- Sondermann, Holger, *et al.* "Tandem histone folds in the structure of the N-terminal segment of the Ras activator Son of Sevenless." *Structure* 11.12 (2003): 1583-1593.
- Sprang, Stephen R. "G protein mechanisms: insights from structural analysis." *Annual review of biochemistry* 66.1 (1997): 639-678.
- Tartaglia, Marco, *et al.* "Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome." *Nature genetics* 39.1 (2007): 75-79.
- Tartaglia, Marco, *et al.* "PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity." *The American Journal of Human Genetics* 70.6 (2002): 1555-1563.
- Tartaglia, M., Niemeyer, C. M., Fragale, A., Song, X., Buechner, J., Jung, A., Hahlen, K., Hasle, H., Licht, J. D., Gelb, B. D. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nature Genet.* 34: 148-150, 2003.

- Tidyman, William E., and Katherine A. Rauen. "The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation." *Current opinion in genetics & development* 19.3 (2009): 230-236.
- Voron, David A., Hayes H. Hatfield, and Ronald K. Kalkhoff. "Multiple lentiginos syndrome: case report and review of the literature." *The American journal of medicine* 60.3 (1976): 447-456.
- Wellbrock, Claudia, Maria Karasarides, and Richard Marais. "The RAF protein kinase centre stage." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5.11 (2004): 875-885.
- Ye, Jian, *et al.* "Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction." *BMC bioinformatics* 13.1 (2012): 1.
- Yoon, Grace, *et al.* "Neurological complications of cardio-facio-cutaneous syndrome." *Developmental Medicine & Child Neurology* 49.12 (2007): 894-899.
- Zheng, Chao-Feng, and Kun-Liang Guan. "Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues." *The EMBO Journal* 13.5 (1994): 1123.
- Zhu, Jun, *et al.* "Identification of Raf-1 S471 as a novel phosphorylation site critical for Raf-1 and B-Raf kinase activities and for MEK binding." *Molecular biology of the cell* 16.10 (2005): 4733-4744.

## 9 Seznam použitých zkratek:

ACE	Angiotenzin-konvertázy (angiotensin-converting-enzyme)
Arg	Arginin
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Párů bází
BRAF	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
CBL	Cbl proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase
CFC	Cardio-facio-cutaneous
CRD	Cystein rich domain
DH	Dbl homology
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ddNTP	Dideoxynukleotidtrifosfát
dNTP	Deoxynukleotid trifosfát
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
ELN	Elastin
ex	Exon
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase
F	Forward
GEF	Guanosin exchange factor
GTP	Guanosintrifosfát
GDP	Guanosindifosfát
<i>HRAS</i>	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
<i>KRAS</i>	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Leu	Leucin
<i>MAP2K1</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase 1
<i>MAP2K2</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase 2



MEK	Mitogen-activated protein kinase
<i>NF1</i>	Neurofibromin 1
<i>NRAS</i>	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
N-SH2	<i>Src-homology 2 domain</i>
PCR	Polymerátová řetězová reakce
PH	Pleckstrin
PTP	Protein tyrosine phosphatase DOMAIN
PTPN11	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
R	Reverse
<i>RAF</i>	Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
RAF1	Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase
<i>RAS</i>	Rat sarcoma viral oncogene homolog
RAS/MAPK	Rat sarcoma viral oncogene homolog/mitogen-activated protein kinase
Rem	Ras exchange motif
RBD	RAS binding domain
<i>SHOC 2</i>	SHOC2 leucine-rich repeat scaffold protein
<i>SHOX</i>	Short stature homeobox
SH2 doména	Src Homology 2
SHP -2	Protein tyrosine phosphatase
<i>SOS1</i>	<i>Son of sevenless homolog 1</i>
SPRED	Sprouty related, EVH1 domain containing 1
TBE	Pufr s obsahem Tris, kyseliny boritá a EDTA