

Univerzita Palackého v Olomouci  
Lékařská fakulta

**Korelace fenotypu a genotypu u pacientů s komplexem  
tuberózní sklerózy**

Dizertační práce

**Mgr. Hana Filipová**

**Olomouc 2016**

**Školitel:** doc. RNDr. Radek Vrtěl, Ph.D.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Radka Vrtěla, Ph.D. a že jsem všechny použité literární zdroje uvedla v seznamu literatury.

V Olomouci 15. 6 . 2016

### **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Radku Vrtělovi, Ph.D. a přednostovi Ústavu lékařské genetiky prof. MUDr. Martinu Procházkovi, Ph.D. za jejich odborné vedení, cenné rady a neuvěřitelnou trpělivost. Rovněž děkuji prof. MUDr. Jiřímu Šantavému, CSc. a doc. MUDr. Ishraq Dhaifalah, Ph.D. za umožnění této studie na Ústavu lékařské genetiky ve FN Olomouc. Poděkování patří i doc. Mgr. Radku Vodičkovi, Ph.D. za pomoc při řešení experimentální části dizertační práce, RNDr. Tomáši Fürstovi, Ph.D. za pomoc při statistickém zpracování dat a všem spolupracujícím indikujícím lékařům. Upřímně bych chtěla poděkovat všem lékařům a nelékařům z Ústavu lékařské genetiky za jejich podporu.

## Obsah

<b>1. Úvod.....</b>	<b>7</b>
<b>2. Diagnostika komplexu tuberózní sklerózy (TSC).....</b>	<b>7</b>
2.1. Projevy TSC v centrální nervové soustavě (CNS).....	10
2.1.1 Kortikální dysplazie.....	10
2.1.2 Subependymální noduly .....	11
2.1.3 Subependymální obrovskobuněčný astrocytom.....	11
2.2 Projevy TSC na srdci.....	12
2.3 Kožní projevy TSC.....	13
2.3.1 Hypomelanotické makuly.....	13
2.3.2 Faciální angiofibromy a cefalické fibrózní plaky.....	14
2.3.3 Unguální fibromy.....	14
2.3.4 Kožní léze typu "confetti".....	14
2.3.5 Šagrénové skvrny.....	15
2.4 Plicní projevy TSC.....	15
2.4.1 Lymphangioliomyomatóza.....	15
2.4.2 Multifokální multinodulární hyperplazie pneumocytů (MMPH).....	16
2.4.3 Tumor z jasných buněk plic (CCSTL).....	16
2.5 Oční projevy TSC.....	16
2.5.1 Vícečetné hamartomy sítnice.....	16
2.5.2 Bezbarvá skvrna na sítnici.....	17
2.6 Projevy TSC v dutině ústní.....	17
2.6.1 Intraorální fibromy.....	17
2.6.2 Jamky zubní skloviny.....	18
2.7 Renální projevy TSC.....	18
2.7.1 Angiomyolipomy.....	18
2.7.2 Renální cysty.....	19
2.8 Nerenální hamartomy.....	19
2.9 Doporučená klinická péče o pacienty s TSC.....	20
2.9.1 Doporučená klinická péče pro nově diagnostikovanou nebo suspektní TSC.....	20
2.9.2 Doporučení klinické péče pro pacienty s již diagnostikovanou TSC.....	21

<b>3. TSC geny</b> .....	<b>25</b>
3.1 TSC1 gen a jeho produkt hamartin.....	25
3.2 TSC2 gen a jeho produkt tuberin.....	26
3.3 Biologické funkce hamartinu a tuberinu.....	28
3.4 Ztráta heterozygoty TSC genů.....	29
3.5 Mozaicismus.....	30
<b>4. Cíle dizertační práce</b> .....	<b>32</b>
<b>5. Materiál a metody</b> .....	<b>33</b>
5.1 Přístrojové vybavení.....	33
5.2 Soubor TSC pacientů.....	33
5.3 Metody.....	33
5.3.1 Izolace DNA z leukocytů periferní krve Millerovou metodou.....	33
5.3.2 Izolace DNA z buněk bukalního stěru a močového sedimentu pomocí kitu.....	35
5.3.3 Molekulární analýza TSC genů.....	35
5.3.3.1 Multiplexová ligačně dependentní amplifikace prób (MLPA).....	36
5.3.3.2 Denaturační gradientová gelová elektroforéza.....	38
5.3.3.2.1 Polymerázová řetězová reakce s DGGE primery.....	38
5.3.3.2.2 Kontrolní separace PCR produktů pro DGGE na agarózovém gelu.....	39
5.3.3.2.3 Postup DGGE.....	40
5.3.3.3 Sekvenování Sangerovou metodou.....	42
5.3.3.3.1 PCR se sekvenačními primery.....	42
5.3.3.3.2 Purifikace PCR produktů.....	45
5.3.3.3.3 Sekvenační reakce.....	46
5.3.3.3.4 Purifikace sekvenačních produktů.....	46
5.3.3.3.5 Separace sekvenačních produktů kapilární elektroforézou.....	47
5.3.3.4 Masivní paralelní sekvenování (MPS) - platforma Ion Torrent.....	47
5.3.3.5 Analýza sekvenčních dat.....	48
5.3.3.6 Statistické zpracování dat.....	49
<b>6. Výsledky</b> .....	<b>50</b>
6.1 Výsledky analýzy TSC genů.....	50
6.1.1 Analýza TSC genů probandů.....	50
6.1.2 Souhrnné výsledky analýzy TSC genů ve sledovaném souboru pacientů.....	50
6.2 Výsledky fenotyp/genotypové korelace.....	59
6.2.1 Fenotyp pacienta, věk a forma výskytu TSC ve vztahu k TSC1/TSC2 genu.....	59

6.2.1.1 Porovnání zastoupení klinických nálezů mezi skupinou TSC1/2 pacientů.....	61
6.2.1.2 Závažnost postižení TSC v závislosti na formě výskytu mutované alely.....	65
6.2.1.3 Variabilita klinických projevů TSC mezi nositeli stejné mutace.....	65
6.2.2 Korelace mezi typem mutace a fenotypovým projevem TSC.....	66
6.2.2.1 Mutace způsobující zkrácení proteinu ve vztahu k fenotypu TSC1/2 pacientů.....	67
6.3 Výsledky korelace mezi jednotlivými TSC znaky.....	70
<b>7. Diskuze.....</b>	<b>72</b>
<b>8. Souhrn.....</b>	<b>75</b>
<b>9. Summary.....</b>	<b>76</b>
<b>10. Seznam použitých zkratk.....</b>	<b>77</b>
<b>11. Seznam publikací.....</b>	<b>80</b>
<b>12. Použitá literatura.....</b>	<b>82</b>
<b>13. Seznam příloh.....</b>	<b>92</b>
Příloha 1.....	93
Příloha 2.....	95

## 1. Úvod

Komplex tuberózní sklerózy (TSC) byl původně nazývaný jako Bournevilleův syndrom podle francouzského lékaře, který jej popsal již v roce 1880. Toto onemocnění se vyznačuje autozomálně dominantním typem dědičnosti, lokusovou heterogenitou a extrémní variabilitou klinických projevů. Prevalence TSC je odhadována na 1/6000 – 1/10000 (Vrtel *et al.*, 1996).

Charakteristickým rysem onemocnění je tvorba benigních tumorů (hamartomů) v mnoha tkáních. Nejčastěji bývá zasažena kůže, mozek, srdce a ledviny (Gomez *et al.*, 1999). Přibližně ve dvou třetinách TSC případů se jedná o sporadický výskyt onemocnění (Sancak *et al.*, 2005).

Příčinou tuberózní sklerózy jsou mutace v TSC tumor-supresorovým genech. TSC1 gen (9q34) kóduje protein hamartin (van Slegtenhorst *et al.*, 1997), gen TSC2 (16p13.3) tuberin (European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium, 1993). Produkty obou genů společně vytvářejí komplex, který v rámci mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) signalizace funguje jako negativní regulátor buněčného růstu a proliferace. Jestliže nastane mutace v jednom z TSC genů je tvorba či funkce tohoto komplexu narušena, čímž je mTOR signalizace aberantně konstitutivně aktivována a dochází k vývoji různých hamartomů (Foster *et al.*, 2010). Právě zprostředkování inhibice mTOR je středem zájmu při vývoji strategie léčby TSC asociovaných lézí. (Kingswood *et al.*, 2014; Franz *et al.*, 2012).

## 2. Diagnosika komplexu tuberózní sklerózy

Vzhledem k extrémní variabilitě TSC symptomů, jejichž počet narůstá s přibývajícím věkem pacienta, bylo nutné pro ulehčení diagnostiky onemocnění sestavit diagnostická kritéria.

V roce 1908 byla zavedena tzv. Vogtova triáda symptomů (adenoma sebaceum, mentální retardace a epilepsii) (Gomez *et al.*, 1999). Roach a kol. (1998) vytvořili nová diagnostická kritéria, která zahrnovala 11 majoritních znaků TSC (faciální angiofibromy či fibrózní plaky čela, netraumatické unguální či periunguální fibromy, hypomelanotické makuly, šagrénové skvrny, vícečetné nodulární hamartomy sítnice, kortikální tubery, subependymální noduly, subependymální obrovskobuněčný astrocytom, kardiální rhabdomyom, lymfangiomyomatózu a renální angiomyolipom) a 9 minoritních znaků TSC (mnohočetné náhodně umístěné jamky v zubní sklovině, hamartomatózní rektální polypy, cysty kostí, radiální migrační dráhy bílé hmoty mozku, fibromy dásní, nerenální hamartomy, bezbarvé skvrny na sítnici, kožní léze typu „confetti“ a mnohočetné renální cysty). Zároveň byla předložena pravidla k stanovení 3 typů

TSC diagnóz (definitivní, pravděpodobné a možné). Definitivní diagnóza TSC byla dána přítomností 2 majoritních znaků nebo 1 majoritního a zároveň 2 minoritních znaků. Pro pravděpodobnou diagnózu TSC musel pacient vykazovat 1 majoritní a 1 minoritní znak. Jestliže byl vyšetřovaný nositelem pouze 1 hlavního znak nebo 2 a více minoritních znaků TSC, byl zařazen do kategorie možné TSC.

Diagnostická kritéria revidovaná v roce 2004 vyžadovala pro potvrzení diagnózy, aby TSC asociované léze byly zjištěny ve 2 či více orgánových systémech nebo aby ve stejném orgánu byly přítomny minimálně dva různé typy lézí. Jestliže se cerebrální kortikální dysplazie vyskytovala společně s cerebrálními migrčními drahami bílé hmoty, byly tyto znaky klasifikovány spíše jako jeden symptom TSC. V případě současného výskytu lymphangiomyomatózy a renálních angiomyolipomů bylo třeba před diagnostikováním definitivní TSC prokázat existenci dalších symptomů asociovaných s tuberózní sklerózou. (Roach *et* Sparagana, 2004).

Na základě narůstajícího množství poznatků o TSC, byla v roce 2012 ve Washingtonu uspořádána mezinárodní konsensuální konference, jejímž cílem bylo aktualizovat diagnostická kritéria tuberózní sklerózy stanovená v roce 1998. Byla přehodnocena prevalence a specifita dosud známých markerů asociovaných s TSC (Northrup *et* Kreuger, 2013a) a zároveň formulována doporučení pro klinickou péči o pacienty s TSC (Northrup *et* Krueger, 2013b). Výsledná diagnostická kritéria TSC jsou shrnuta v tab. 1.

V důsledku technického pokroku a progresivního vývoje nových strategií je molekulární analýza genů dnes široce dostupná, a proto analýza TSC1 a TSC2 genu byla začleněna do nových diagnostických kritérií TSC. Další zásadní změnou oproti původním kritériím je redukce kategorií TSC diagnóz. Z dřívějších 3 kategorií zůstaly zachovány pouze 2 (definitivní a možná). Definitivní diagnóza TSC je dána přítomností 2 majoritních znaků nebo 1 majoritního znaku v kombinaci s 2 a více znaky minoritními. O možné diagnóze TCS lze uvažovat v případě výskytu 1 majoritního znaku či při současném výskytu 2 a více minoritních znaků. Rovněž došlo k úpravě ve výčtu minoritních znaků TSC. Hamartomatózní rektální polypy a cysty kostí byly pro svoji nedostatečnou specifitu k TSC odebrány z tohoto seznamu. Cerebrální radiální migrační dráhy bílé hmoty byly přesunuty z minoritních znaků do majoritních, kde společně s kortikálními tubery reprezentují položku "kortikální dysplazie".

Vedle dědičných forem TSC existuje i nedědičná frustní forma TSC. Například pacienti s izolovaným obrovskobuněčným astrocytomem a bez jakýchkoliv jiných příznaků TSC jsou obvykle považováni za frustní formu (Ichikawa *et al.*, 2005). Případy sporadické LAM, ať už s přítomností angiomyolipomů ledvin či nikoliv (Bisceglia *et al.*, 2010), či výskyt pouze jednoho



angiomyolipomu jsou některými autory řazeny rovněž do této kategorie TSC.

**Tab. 1: Diagnostická kritéria pro TSC revidovaná v roce 2012**

<b>A. Genetická diagnostická kritéria</b>
Pro stanovení definitivní diagnózy TSC je nutný nálezný patogenní mutace v TSC1 nebo TSC2 genu v normální tkáni. Za patogenní mutace se považují sekvenční varianty, které jednoznačně narušují funkci produktů TSC genů (např. posunové mutace, nesmyslné mutace) nebo v případě rozsáhlých delecí neumožňují syntézu proteinu. Také se může jednat o záměnové mutace, jejichž patologický vliv na funkci proteinu byl prokázán při funkční analýze (viz. záznamy v databázích LOVD TSC1, LOVD TSC2) a v (Hoogeveen-Westerveld <i>et al.</i> , 2012; 2013). Varianty s nejasným významem na funkci proteinu, nespĺňují podmínky pro stanovení definitivní diagnózy TSC. Přestože u 10 % - 25 % pacientů s TSC se nepodaří žádnou mutaci detekovat, nelze tuberózní sklerózu u těchto jedinců vyloučit.
<b>B. Klinická diagnostická kritéria</b>
Majoritní znaky 1. Hypomelanotické skvrny (3 a více, alespoň 5 mm v průměru) 2. Angiofibromy (3 a více) či fibrózní plaky čela 3. Unguální fibromy (2 a více) 4. Šagrénová skvrna 5. Vícečetné sítnicové hamartomy 6. Kortikální dysplazie 7. Subependymální noduly (SEN) 8. Subependymální obrovskobuněčný astrocytom (SEGA) 9. Srdeční rhabdomyom 10. Lymfangioleiomyomatóza (LAM)† 11. Angiomyolipomy (2 a více) (AML)†  Minoritní znaky 1. Kožní léze typu "confetti" 2. Jamky zubní skloviny (3 a více) 3. Intraorální fibromy (2 a více) 4. Bezbarvá skvrna na sítnici 5. Vícečetné renální cysty 6. Nerenální hamartomy

† Pokud dojde k současnému výskytu lymfangioleiomyomatózy a angiomyolipomů a nejsou přítomny další znaky TSC, nelze diagnostikovat definitivní TSC.

Převzato a upraveno dle: (Northrup *et al.*, 2013a).

## 2.1. Projevy TSC v centrální nervové soustavě (CNS)

Intrakraniální léze (kortikální tubery, SEN, SEGA) představují hlavní diagnostické znaky TSC, které je možné detekovat již v prenatálním období. Ukázkovým příkladem je kazuistika monozygotických dvojčat, kdy ve 22. týdnu těhotenství při rutinním ultrasonografickém vyšetření byl zaznamenán útvar v oblasti pravého čelního laloku u jednoho z plodů. MRI mozku plodu nález léze potvrdila a zároveň odhalila u druhého plodu vícečetné SEN, které připomínaly SEGA. Gravidita byla ukončena ve 23. týdnu a nálezy byly rovněž prokázány při pitevním vyšetření plodu (Prabowo *et al.*, 2013).

Postižení CNS se podílí na mortalitě v TSC populaci. V souboru 40 zemřelých pacientů v souvislosti s TSC byly tumory mozku příčinou úmrtí u 10 osob (25 %) (Shepherd *et al.*, 1991).

### 2.1.1. Kortikální dysplazie

Kortikální tubery jsou přítomny přibližně u 90 % TSC pacientů, přičemž není neobvyklý jejich společný výskyt s abnormalitami bílé hmoty (např. s radiálními migračními liniemi) mozku. Výše zmíněné typy kortikálních dysplazií jsou obvykle spjaty s epilepsií a poruchami učení (Northrup *et Kreuger*, 2013a). Prevalence epilepsie u TSC osob dosahuje až 85 % a u téměř poloviny pacientů se vyskytuje mentální postižení či různé neuropsychiatrické poruchy včetně poruch autistického spektra (Curatolo *et al.*, 2015).

Kortikální a kortiko-subkortikální tubery jsou glyoneuronálním typem lézí, přičemž přibližně polovina identifikovaných tuberů se vyskytuje v kalcifikované formě (Grajkowska *et al.*, 2010). Charakteristickým rysem kortikálních tuberů je značně narušená laminace kortexu a přítomnost abnormálních buněčných typů, zejména dysmorfických neuronů a obrovských buněk (Mühlebner *et al.*, 2016).

Nejčastěji se tubery nachází v čelních a temenních lalocích, s nižší frekvencí postihují týlní a spánkové laloky a nejméně často jsou lokalizovány v mozečku (Ridler *et al.*, 2004).

Gallagher a kol. (2010) rozdělily kortikální tubery na 3 typy na základě různé intenzity signálu jejich subkortikální komponenty – bílé hmoty pozorované při MR mozku 35 TSC pacientů s epilepsií. Kortikální tubery typu A se vyznačovaly isointenzivním signálem v T1 zobrazení a slabě hyperintenzivním signálem v T2-vážených obrazech a v sekvenci potlačující selektivně signál tekutiny (FLAIR – fluid attenuated inversion recovery). Tubery typu B měly subkortikální hypointenzivní signál v T1 zobrazení a homogenně hyperintenzivní signál v T2-váženém režimu a v FLAIR sekvenci. Tubery typu C se prezentovaly hypointenzivně v T1 obrazu,

hyperintenzivní signál vydávaly v T2-váženém zobrazení a v sekvenci FLAIR se jevíly heterogenně, kdy středová oblast měla sníženou intenzitu signálu a okraje naopak zvýšenou. U 29 % sledovaných pacientů se vyskytovaly 2 typy tuberů a 71 % jedinců bylo nositeli všech 3 typů tuberů. Nicméně, u každého pacienta byl dominantní pouze 1 typ. Jedinci s převládajícími tubery typu A měli mírnější neurologické projevy onemocnění než pacienti s typem B a C. Vyšší četnost epileptických záchvatů, přítomnost poruch autistického spektra a častější nálezy dalších abnormalit mozku (např. SEGA) jsou více pravděpodobné u pacientů, u nichž je dominujícím typem tuberu typ C.

U pacientů s mutacemi v genu TSC2 byly zaznamenány výrazně vyšší počty tuberů než v asociaci s TSC1 mutacemi (Bolton *et al.*, 2015; Dabora *et al.*, 2001).

### 2.1.2 Subependymální noduly

SEN jsou obvykle malé, asymptomatické, případně i kalcifikované intrakraniální léze, které se nacházejí pod ependymem ve stěnách laterálních komor až u 90 % TSC pacientů. Velikost těchto lézí zůstává ve většině případů téměř neměnná a po podání kontrastní látky při MRI vyšetření nedochází k jejich sycení (Roth *et al.*, 2013).

Většina autorů se domnívá, že růstem SEN se vyvíjí SEGA, avšak Katz a kol. (2012) na základě sledování lokalizace a případného růstu 496 intrakraniálních lézí od 103 TSC pacientů, tento názor zpochybňuje. Podél oblasti kaudotalamického zářezu lokalizovali 157 lézí. Zbývajících 339 lézí (SEN) bylo umístěno různě ve stěnách postranních komor, ale vždy byla jejich pozice spjata s průběhem ocasatého jádra (*nucleus caudatus*). Potenciál k růstu byl prokázán pouze u lézí z oblasti kaudotalamického zářezu a ty byly považovány za SEGA.

### 2.1.3 Subependymální obrovskobuněčný astrocytom

Namísto označení zkratkou SEGA je některými autory preferováno označení: subependymální obrovskobuněčný tumor (SGCT). SEGA je glioneuronální typ nádoru mozku, který se nejčastěji vyvíjí (jednostranně či oboustranně) v prvních dvou dekádách života u 10 - 15 % osob s TSC (Jozwiak *et al.*, 2013). Ještě vyšší prevalence (20%) SEGA byla pozorována ve skupině 214 TSC pacientů (Adriaensen *et al.*, 2009).

U pacientů s prokázanými mutacemi v genu TSC2 se SEGA vyvíjí v mladším věku než u jedinců s mutacemi v genu TSC1 (Kotulska *et al.*, 2014).

V souladu s diagnostickými kritérii TSC je za SEGA považována taková léze, jejíž velikost v jakémkoliv směru přesahuje 1 cm, a která se nachází v oblasti kaudotalamického zářezu. Rovněž i subependymální léze lokalizované mimo tuto oblast, u nichž (bez ohledu na počáteční velikost) je sériovým zobrazováním prokázán růst, jsou definovány jako SEGA. Při aplikaci kontrastní látky se útvary SEGA obvykle výrazně sytí. Ovšem i léze, které nejeví známky sycení, ale postupným sledováním je zaznamenán jejich růst, jsou uznávány za SEGAs. Často bývají tyto tumory kalcifikované (Elousrouti *et al.*, 2016).

SEGA roste obvykle pomalu a jen vzácně se projeví agresivně (např. invazí do mozkového parenchymu či v asociaci s peritumorálním edémem) (Campen *et Porter*, 2005).

Vzhledem k typické lokalizaci SEGA v blízkosti *foramen Monroi*, může dojít v důsledku růstu léze k obsrukci cirkulace likvoru a k následnému vzniku hydrocefalu a nitrolební hypertenze. Příčinou rozvoje hydrocefalu u pacientů se SEGA může být i intratumorální krvácení (Ogiwara *et Morota*, 2013). Neobvyklé umístění obrovskobuněčného astrocytomu – v epifýze bylo zjištěno u 3letého chlapce s TSC (Dashti *et al.*, 2005).

V souvislosti s prováděnými resekce SEGA, jsou tyto léze daleko lépe (např. imunohistochemicky) prozkoumány než SEN, které vzhledem ke své obvyklé asymptomaticnosti nevyžadují chirurgické odstranění, a proto je jejich analýza omezena pouze na vzorky z autopsií (Katz *et al.*, 2012).

## 2.2 Projevy TSC na srdci

Rhabdomyomy představují intramurální i intrakavitární tumory, častěji postihující srdeční komory nežli síně, přičemž preferují levou stranu srdce před pravou (Gomez *et al.*, 1999).

Srdeční rhabdomyom/y reprezentují majoritní znak TSC a lze je ultrasonograficky prokázat od 20. týdne gravidity (Hinton *et al.*, 2014). Obvykle jsou tyto intrakardiální útvary zjištěny při rutinním ultrazvuku plodu a jejich objev vyvolává první podezření na TSC. Pro upřesnění nálezu a pro odhalení případných komplikací je velmi užitečná fetální echokardiografie, neboť umožňuje posoudit vliv hmoty rhabdomyomu/ů na funkci srdečních komor, na průtok krve či na vznik arytmií (Gusman *et al.*, 2012). Při ultrazvuku srdce plodu se rhabdomyom jeví jako homogenní, kompaktní, echogenní masa (Yinon *et al.*, 2010).

Srdeční rhabdomyomy jsou hormon-dependentní tumory, jejichž velikost se pohybuje od několika milimetrů po několik centimetrů. Rozlišení rhabdomyomu od jiných srdečních nádorů může být obtížné v situaci, kdy je na srdci nalezen pouze jeden útvar, či se nádory objevují na neobvyklých místech. Až v 90 % případů se vyskytují jako vícečetné a právě většina

z těchto případů je asociovaná s TSC (Hinton *et al.*, 2014). Důkazem vysokého výskytu TSC v souvislosti se srdečními rhabdomyomy je i studie 40 plodů, které vykazovaly jeden či více srdečních tumorů. Z nich 33 (75 %) mělo rhabdomyomy, 3 gravidity byly ukončeny, ve 4 případech došlo k úmrtí při porodu a 26 (79 %) přežilo. Celkem u 95 % z živě narozených s rhabdomyomy nebyly přítomny žádné srdeční symptomy a u 88% z nich byla stanovena diagnóza TSC (Yinon *et al.*, 2010).

Kromě gestačního věku v době stanovení diagnózy má právě umístění a velikost rhabdomyomu, počet útvarů a progresse tumoru zásadní vliv na perinatální výsledky. V některých případech může být výskyt rhabdomyomu spojen s hydropsem plodu, intrauterinní smrtí plodu či s náhlým úmrtím kojenců (Colosi *et al.*, 2013).

Většina rhabdomyomů je asymptomatická a spontánně regreduje během prvních let života. K chirurgickému řešení se přistupuje u hemodynamicky významných rhabdomyomů. U novorozence s vícečetnými rhabdomyomy, u něhož z důvodu nezralosti a nízké porodní váhy nebylo možné provést operaci (Mohamed *et al.*, 2014) a u 3 novorozenců (dva s hemodynamicky významnými rhabdomyomy a jeden s rozsáhlým SEGA) byla s úspěchem popsána farmakologická strategie léčby, kdy k zmenšení tumorů došlo po aplikacích everolimu (Goyer *et al.*, 2015).

## **2.3 Kožní projevy TSC**

### **2.3.1 Hypomelanotické makuly**

Jestliže jsou na pokožce objeveny minimálně 3 depigmentovaná místa a to alespoň 5 mm v průměru, lze považovat hypomelanotické makuly za hlavní klinický znak TSC. Rovněž i ohraničená ložiska bílých vlasů (*poliosis*) by měla být zahrnuta do celkového počtu nalezených hypomelanotických makulů (Northrup *et* Krueger, 2013a).

Skvrny mohou být polygonální či tvarem připomínají lístek jasanového listu a jsou dobře detekovatelné pomocí Woodova světla (Gomez *et al.*, 1999). Více než 90 % TSC pacientů jsou nositeli těchto depigmentací. Dokladem, že hypomelanotické skvrny patří mezi rané znaky TSC, je studie 106 osob TSC pacientů s 97,2% záchytem těchto depigmentací pokožky, které u 66 dětí byly zpozorovány již po porodu a u 20 dětí se objevily během prvních měsíců života. (Jozwiak *et al.*, 1998).

### 2.3.2 Faciální angiofibromy a cefalické fibrózní plaky

Faciální angiofibromy (dříve známé pod termínem *adenoma sebaceum*) a fibrózní plaky na kůži hlavy (dříve užíván termín fibrózní plaky čela) jsou součástí kategorie majoritních diagnostických znaků TSC, přičemž platí, že faciální angiofibromy musí být nalezeny alespoň 3 (Northrup *et* Krueger, 2013a).

Jozwiak a kol. (1998) zdokumentovali 74,5% záchyt faciálních angiofibromů a 18,3% výskyt fibrózních plaků čela v souboru 106 dětí s tuberózní sklerózou.

### 2.3.3 Unguální fibromy

Unguální či periunguální fibromy zvané též Koenenovy tumory představují benigní tumory, které vyrůstají z nehtového lůžka. Barva nodulů často odpovídá barvě kůže, popřípadě jsou načervenalé a jejich léčba je problematická, neboť velmi často dochází k jejich opětovnému vývoji (Hake, 2010). Tyto fibromy jsou častěji přítomny u adolescentů či dospělých než u mladších dětí (Roach *et* Sparagana, 2004).

Vzrůstající frekvenci záchytu unguálních či periunguálních fibromů vzhledem k stoupajícímu věku TSC pacientů dokazují následující studie. Ve skupině 106 dětí byly periunguální fibromy nalezeny pouze u 15 % jedinců (Jozwiak *et al.*, 1998). V jiném souboru, který zahrnoval jak děti, tak dospělé, byly unguální fibromy patrné u 24 % z 298 vyšetřených osob (Au *et al.*, 2007).

V souboru 79 dospělých žen byly unguální fibromy pozorovány u 80 % pacientek, přičemž nález periunguálních fibromů převažoval nad záchytem subunguálních fibromů. Prsty na nohou byly periunguálními fibromy postiženy častěji než prsty na ruce a malíček představoval prst s nejvyšší frekvencí výskytu periunguálních fibromů (Aldrich *et al.*, 2010).

### 2.3.4 Kožní léze typu "confetti"

Kožní léze typu "confetti" je drobná (1-3 mm velká) skvrna depigmentace s mnohočetným výskytem zejména v oblasti ramenou a nohou. Tyto léze zastupují minoritní znak TSC, avšak u dospělých osob může být jejich diagnostika zkomplikována, neboť podobné skvrny mohou být důsledkem chronické expozice slunečních paprsků (Northrup *et* Krueger, 2013a).

Nízký výskyt (2,8%) tohoto typu depigmentace byl prokázán ve skupině 106 dětí s TSC (Jozwiak *et al.*, 1998). Naopak ve smíšené skupině dětí a dospělých (88 osob) prevalence dosahovala 58 % (Au *et al.*, 2007).

### **2.3.5 Šagrénové skvrny**

Šagrénové skvrny či plaky jsou hnědé, růžové či nažloutlé plochy pokožky, které jsou nejčastěji lokalizované v dolní části zad či na boční straně trupu. Tyto skvrny mohou být mírně vyvýšeny nad úroveň okolní pokožky či svým povrchem mohou připomínat kůru pomeranče. Jejich velikost se pohybuje od několika milimetrů k 10 a více centimetrům a obvykle se začínají objevovat v první dekádě života, avšak u malých dětí (kojenců) jsou velmi vzácné (Gomez *et al.*, 1999).

V rámci dětské TSC populace (106 osob) byl shledán 48% výskyt šagrénových skvrn (Jozwiak *et al.*, 1998).

## **2.4 Plicní projevy TSC**

### **2.4.1 Lymphangiomiomatóza**

LAM je vzácné progresivní plicní onemocnění postihující zejména ženy v reprodukčním věku. LAM se může prezentovat jako sporadická forma nebo v asociaci s TSC (De Rosa, 2009). Charakteristickým znakem LAM je neoplastický růst atypických buněk (tzv. LAM buněk připomínajících buňky hladkého svalstva), který vede k narušení struktury plicního parenchymu a k následnému vzniku cyst (Krymskaya, 2014).

Kromě dušnosti a spontánního pneumotoraxu, což jsou nejčastější projevy LAM (Ryu *et al.*, 2006), lze u pacientů s LAM zaznamenat i chylothorax, hemoptýzu či ascites (Glasgow *et al.*, 2010).

Zatímco Moss s kolegy (2001) zjistili LAM (s 34% prevalencí) výhradně u TSC pacientek, Miyake a kol. (2005) potvrdili přítomnost LAM i u muže s TSC. V jiné studii zahrnující 186 TSC pacientů byly tenkostěnné cysty typické pro LAM zobrazeny prostřednictvím počítačové tomografie (CT) dokonce u 13 % (z 91) mužů a u 42 % (z 95) žen. Více závažné nálezy byly u žen, neboť v jejich plicní tkáni byly nalézány cysty ve větším počtu a velikosti než u vyšetřovaných mužů (Adriaensen *et al.*, 2011).

Riziko vzniku LAM stoupá s věkem. Zatímco u 21letých žen byla hlášena 27% prevalence LAM, u 40ti letých žen již dosahovala 81 %. Rovněž byl zjištěn i nezanedbatelný podíl (téměř 13 %) úmrtí zapříčiněný LAM (Cudzilo *et al.*, 2013).

#### **2.4.2 Multifokální multinodulární hyperplazie pneumocytů (MMPH)**

MMPH je dalším typem hamartomu vyskytujícího se u pacientů s TSC. Existují kazuistiky, kdy v plicích pacienta byla prokázána pouze MMPH, (Yamanaka *et al.*, 2000) tak i případy současného výskytu LAM a MMPH. Z histologického pohledu se u MMPH jedná o proliferaci pneumocytů typu II. Pomocí imunohistochemického barvení buněk mikronodulů byla zjištěna pozitivita např. pro keratin, epiteliální membránový protein, povrchový apoprotein a negativita pro desmin, aktin hladkého svalstva, pro estrogenový a progesteronový receptor, tuberin a HMB-45 (monoklonální protilátka specifická pro lidský melanom). Naopak v LAM buňkách byla imunoreaktivita výše jmenovaných buněčných komponent přesně opačná. (Maruyama *et al.*, 2001).

#### **2.4.3 Tumor z jasných buněk plic (CCSTL)**

Světlobuněčný tumor plic je vzácný benigní nádor, jehož buňky obsahují v cytoplasmě velké množství glykogenu, a proto je rovněž znám pod názvem „sugar tumor“ (Kim *et al.*, 2008). Flieder s Travisem (1997) v plicích 32leté ženy s tuberózní sklerózou zjistily LAM, MMPH a i CCSTL, který byl imunoreaktivní pro HMB-45 and neraktivní pro cytokeratin.

Na základě ne zcela jasné souvislosti MMPH a CCSTL s TSC, nebyly tyto plicní nálezy začleněny do diagnostických kritérií TSC (Northrup *et Krueger*, 2013a).

### **2.5 Oční projevy TSC**

#### **2.5.1 Vícečetné hamartomy sítnice**

Astrocytické hamartomy sítnice často popisovány jako retinální astrocytomy mohou zaujímat podobu od průhledných nekalcifikovaných lézí, k mnohočetné nodulární formě, k útvarům připomínajícím plod moruše a s možnou přítomností kalcifikace. Mohou nastat jak unilaterálně, tak bilaterálně. Obvykle nemají negativní vliv na zrak. K problémům dochází v případech, kdy



léze zasáhly makulu a v důsledku progresivní degenerace sítnice může dojít k ztrátě zraku. (Lonngi *et al.*, 2013).

Nález více než jednoho hamartomu sítnice je považován za hlavní diagnostický znak tuberózní sklerózy a jeví se jako vhodný marker zejména u malých dětí, u nichž se zatím jiné projevy TSC neobjevily. Z histologického hlediska tyto retinální léze vykazují podobnost k intrakraniálním tuberům nalézáných u TSC osob (Northrup *et Krueger*, 2013a).

### **2.5.2 Bezbarvá skvrna na sítnici**

Achromatické skvrny představují oblasti hypopigmentace retiny a náleží do kategorie minoritních znaků TSC (Northrup *et Krueger*, 2013a). Místa chorioretinální hypopigmentace byla objevena u 39 ze 100 vyšetřovaných TSC pacientů. Ve stejně velkém kontrolním souboru byly achromatické skvrny nalezeny pouze u 6 osob. (Rowley *et al.*, 2001)

Aronow a kol. (2012) zjistili 34,1% prevalenci TSC asociovaných očních nálezů (astrocytických hamartomů či bezbarvých skvrn na sítnici) v souboru 907 pacientů z TSC Aliance. Velmi podobnou prevalenci (36,1%) zaznamenaly i v souboru 132 TSC osob pocházejících z TSC programu Clevelandské kliniky, kde mnohočetný nález astrocytických hamartomů představoval 40 % a oboustranně postihl oči u 43 % osob. Achromatické skvrny sítnice byly zjištěny ve 12 % případů (z toho 40 % s bilaterálním postižením, 50 % s mnohočetným nálezem). V obou souborech byl nález na sítnici více spjat s mutacemi v genu TSC2 genu než v TSC1 genu. Zároveň bylo shledáno, že u TSC pacientů s nalezenou retinální lézí je pravděpodobnější souběžný výskyt SEGA, AML, kognitivních poruch a epilepsie než u osob s negativním očním nálezem.

## **2.6 Projevy TSC v dutině ústní**

### **2.6.1 Intraorální fibromy**

Nález minimálně 2 intraorálních fibromů reprezentuje minoritní diagnostický znak TSC (Northrup *et Krueger*, 2013a). V souboru 131 TSC osob byl zdokumentován 36% záchyt orálních fibromů (Webb *et al.*, 1996).

Vzhledem k častějšímu výskytu orálních fibromů v dospělé TSC populaci než u dětí s tuberózní sklerózou, mohou v důsledku rozdílného zastoupení různých věkových kategorií ve vyšetřovaných souborech nastat výrazné rozdíly v záchytu. Důkazem je např. studie 58

dospělých jedinců s 69% výskytem intraorálních fibromů, přičemž nejčastěji (u 52 %) se jednalo o gingivální fibromy. Mimo dásně byly fibromy lokalizovány i na bukální a retní sliznici, na uzdičce horního rtu, na patře i na jazyku (Sparling *et al.*, 2007).

### **2.6.2 Jamky zubní skloviny**

Objevení nejméně 3 náhodně rozmístěných jamek v zubní sklovině splňuje podmínky pro minoritní znak TSC (Northrup *et* Krueger, 2013a). Jamky v zubní sklovině se u pacientů s TSC vyskytují extrémně často. V souboru 58 TSC pacientů jich 97 % vykazovalo mnohočetné jamky zubní skloviny (Sparling *et al.*, 2007). V další skupině 50 TSC pacientů byly jamky v zubní sklovině nalezeny dokonce u všech sledovaných osob, zatímco v kontrolním souboru 250 jedinců byla záchytnost pouze 7% (Mlynarczyk, 1991).

## **2.7 Renální projevy TSC**

Renální onemocnění představuje nejčastější příčinu smrti související s TSC. Z 40 TSC asociovaných úmrtí jich 11 (28 %) bylo způsobeno poškozením ledvin. (Shepherd *et al.*, 1991). Typickým projevem TSC v ledvinách jsou AML a cysty. Karcinom ledvin se u TSC pacientů vyskytuje vzácně - (2% – 4% záchyt) (Yang *et al.*, 2014).

### **2.7.1 Angiomyolipomy**

Angiomyolipomy jsou nalézány až u 80 % pacientů. Často jsou postiženy obě ledviny či v rámci jedné ledviny jsou patrné vícečetné AML. Tyto obvykle benigní tumory jsou složeny z buněk hladkého svalstva, tuku a abnormálních krevních cév. U nádorů větších než 4 cm je vyšší pravděpodobnost případných zdravotních komplikací než u menších lézí (Roach *et* Sparagana, 2004).

K životu ohrožujícím komplikacím v souvislosti s AML patří krvácení, jehož riziko se zvyšuje s velikostí a prokrvením AML. Navíc tlak hmoty léze může působit bolest a poškodit funkci ledvin znesnadněním odtoku moči a/nebo narušením okolního renálního parenchymu (Rakowski *et al.*, 2006).

## 2.7.2 Renální cysty

Samostatně se vyskytující či mnohočetné renální cysty mají u TSC pacientů obvykle podobu malých, většinou asymptomatických lézí (Rakowski *et al.*, 2006). Prevalence renálních cyst v TSC populaci je přibližně 30% (O'Callaghan *et al.*, 2004).

Raný nástup závažného poškození ledvin renálními cystami lze pozorovat u pacientů, u nichž delece TSC2 genu byly natolik rozsáhlé, že zasáhly i do oblasti sousedního genu PKD1 a způsobily tzv. syndrom přiléhajících genů TSC2/PKD1. Gen autozomálně dominantního onemocnění polycystických ledvin typu 1 (PKD1 gen) svým koncem sousedí s koncem genu TSC2. Na rozdíl od cyst nalezených v souvislosti s poškozením TSC2 genu, mohou cysty v asociaci TSC2/PKD1 syndromu vést k hypertenzi či k renálnímu selhání (Laass *et al.*, 2004).

Byl zaznamenán i případ plodu, u něhož ve 20. týdnu těhotenství byla ultrasonograficky zachycena renální cysta a útvar na srdci. Pítva plodu prokázala srdeční rhabdomyom a polycystickou nemoc ledvin. Vzhledem k tomu, že i matka plodu vykazovala jak znaky TSC, tak znaky autozomálně dominantního onemocnění polycystických ledvin bylo vysloveno podezření na syndrom přilehlých genů TSC2/PKD1. Molekulární analýza genů, která tento mechanismus mohla potvrdit, ovšem nebyla provedena (Zhang *et al.*, 2008).

Back a kol. (2015) sledovali průměrně po dobu 9 let a 8 měsíců 7 dětských pacientů s geneticky potvrzenou TSC2/PKD1 formou tuberózní sklerózy či s vysokým podezřením na tuto diagnózu. U všech pacientů zaznamenali zvětšené ledviny s mnohočetným nálezem cyst. Ve 12 ze 14 zobrazovaných ledvin byl parenchym z 50 % a více nahrazen cystami (pozorováno více než 15 cyst), což způsobilo značné kortikální ztenčení. Rozměr nejrozsáhlejší cysty v každé ledvině se pohyboval v rozmezí 2,4 cm až 9,3 cm. Zároveň byly ve 13 ze 14 ledvin odhaleny angiomyolipomy. Sonografické nálezy prokázaly určitý vzor onemocnění ledvin u TSC2/PKD1, který je odlišitelný od vzoru dokumentující případy klasické TSC. Časné odlišení TSC a TSC2/PKD1 formy je důležité pro posouzení prognózy a stanovení léčby pacienta.

## 2.8 Nerenální hamartomy

Nerenální hamartomy náleží do skupiny minoritních znaků TSC. Postižení gastrointestinálního traktu je u TSC vzácné. Existují případy TSC pacientů s nálezem kolorektálních hamartomatózních polypů (Santos *et al.*, 2015).

Jaterní léze (angiomyolipom, cysty a další benigní útvary) byly popsány u 30 % z 205 TSC pacientů, přičemž ve všech případech byly asymptomatické. (Black *et al.*, 2012). Jaterní

angiomyolipomy jsou dle diagnostických kritérií řazeny do skupiny „angiomyolipomy“, jenž je součástí majoritních znaků TSC (Northrup *et* Krueger, 2013a).

Léze štítné žlázy mohou být rovněž součástí klinického spektra TSC, což dokazuje studie 93 osob s definitivní diagnózou TSC, kdy 19 jedinců (20,4 %) mělo abnormalitu (zejména nodulární lézy/e) ve tkáni štítné žlázy. V jednom případě byl odhalen papilární karcinom (Auladell *et al.*, 2015).

Za velmi vzácný nález u TSC pacienta lze považovat adenom přštítných tělísek (Shinzato *et* Ikehara, 2015), neuroendokrinní nádor slinivky (Francalanci *et al.*, 2003, Cansu *et al.*, 2014) či tumor hypofýzy (Nandagopal *et al.*, 2007).

## **2.9 Doporučená klinická péče o pacienty s TSC**

V následujících dvou subkapitolách je uveden seznam doporučené klinické péče pro pacienty s nově diagnostikovanou či suspektní TSC a pro pacienty s již diagnostikovanou (definitivní či možnou) TSC, který byl sestaven v rámci mezinárodní konsensuální konference uspořádané v roce 2012 ve Washingtonu (Northrup *et* Kreuger, 2013b).

### **2.9.1 Doporučená klinická péče pro nově diagnostikovanou nebo suspektní TSC**

#### Genetika:

- Získat třígenerační rodinnou anamnézu pro posouzení rizika TSC u dalších osob.
- Nabídnout genetické testování pro rodinné poradenství nebo pro případy, kdy je podezření na diagnózu TSC, které nemůže být klinicky potvrzeno.

#### Mozek:

- Provedením magnetické rezonance (MRI) mozku posoudit přítomnost tuberů, SEN, defektů buněčné migrace a SEGA.
- Vyhodnotit neuropsychiatrické poruchy související s TSC.
- Vzdělávat rodiče jak rozpoznat u dítěte infantilní křeče, dokonce, i když v době stanovení diagnózy k žádným nedošlo.
- Opatřit rutinní elektroencefalogram (EEG). Pokud je abnormální a zvláště když jsou přítomny také rysy neuropsychiatrických poruch, tak následně za účelem posouzení subklinické záchvatové aktivity provést 24hodinový video/EEG monitoring.

### Ledviny:

- Provedením MRI břicha posoudit přítomnost angiomyolipomů a renálních cyst.
- Zjistit případnou hypertenzi přesným změřením krevního tlaku.
- Vyhodnotit funkci ledvin stanovením glomerulární filtrace.

### Plíce:

- Provést základní funkční vyšetření plic (funkční vyšetření plic a 6minutový test chůzí) a výpočetní tomografii s vysokým rozlišením (HRCT) hrudníku i u asymptomatických osob, u pacientů s rizikem vzniku LAM – zpravidla u 18 a víceletých žen. Dospělí symptomatictí muži by měli testy rovněž podstoupit.
- Informovat o rizicích kouření a užívání estrogenu u dospívajících a dospělých žen.

### Kůže:

- Provést důkladné klinické dermatologické vyšetření.

### Zuby:

- Provést důkladné klinické stomatologické vyšetření.

### Srdce:

- V případě prenatálně zjištěných rhabdomyomů pomocí ultrazvuku, je vhodné zvážit využití fetální echokardiografie k detekci jedinců s vysokým rizikem srdečního selhání po porodu.
- Zajistit echokardiogram u dětských pacientů, zejména v případě mladších tří let.
- Zajistit elektrokardiogram (EKG) u osob všech věkových kategorií a posoudit tak případné poruchy vedení vzruchu.

### Oči:

- Provést kompletní oftalmologické vyšetření, včetně fundoskopie pro posouzení lézí sítnice a deficitů zorného pole.

## **2.9.2 Doporučení klinické péče pro pacienty s již diagnostikovanou TSC**

### Genetika:

- Nabídnout genetické testování a rodinné poradenství, pokud už nebylo provedeno dříve, u jedinců v reprodukčním věku nebo nově plánujících graviditu.

## Mozek:

- Za účelem sledování nového výskytu SEGA provádět MRI mozku každého 1-3 roku u asymptomatických pacientů s TSC mladších 25 let. Častěji by MRI měli podstoupit pacienti s rozsáhlým či rostoucím SEGA, nebo se SEGA způsobující zvětšení komor, přestože jsou stále bez příznaků. Zároveň by pacienti a jejich rodiny měly být poučeni o možnosti nových symptomů. Pacienti s asymptomatickým SEGA v dětství by měli být nadále pravidelně sledováni i jako dospělí pro zjištění, že nedochází k růstu SEGA.
- Chirurgická resekce by měla být prováděna u akutně symptomatického SEGA. Odklon toku mozkomíšní tekutiny (shuntem) může být nezbytný. U rostoucího, ale jinak asymptomatického SEGA může být provedena chirurgická resekce či lze použít farmakologickou léčbu inhibitory komplexu mTOR. Do rozhodovacího procesu o volbě léčby by mělo být zahrnuto riziko komplikací, nepříznivé účinky, náklady, délka léčby a možný vliv na TSC asociované komorbidity.
- Provést alespoň jednou za rok screening TSC asociovaných neuropsychiatrických poruch. Komplexně zhodnotit TSC asociované poruchy v klíčových vývojových obdobích: školka (3.-6. rok) škola (6.-9. rok), (12.-16. rok), raná dospělost (18.-25. rok) a dále dle potřeby. Zvolená strategie hodnocení TSC souvisejících neuropsychiatrických poruch by měla být přizpůsobena profilu pacienta a měla by být provedena osvědčenými postupy pro jednotlivé poruchy (např. poruchy autistického spektra, porucha pozornosti s hyperaktivitou, úzkostná porucha). Zvážit potřebu individuálního vzdělávacího programu. Náhlá změna v chování by měla být podmětem pro lékařské vyšetření, pro odhalení potenciální příčiny (např. SEGA, onemocnění ledvin).
- Provést rutinní EEG u osob se známou nebo suspektní záchvatovou aktivitou. Frekvence provádění EEG by měla být přizpůsobena klinické potřebě a nikoliv v určeném intervalu. Prodloužený video/EEG monitoring (24hodinový či delší) je vhodný, když je výskyt záchvatů nejasný, dochází ke změně chování, k nevysvětlitelnému spánku či k jiné změně v kognitivních nebo neurologických funkcích.
- Vigabatrin je doporučená terapie pro infantilní spasmusy. Adrenokortikotropní hormon lze použít, pokud je léčba vigabatrinem neúspěšná. Antikonvulsivní léčba jiných typů záchvatů

u TSC je obecně dodržována jako u ostatních epilepsií. Epileptochirurgie by měla být zvážena u farmakorezistentních TSC pacientů. Zvláštní pozornost by měla být věnována mladším dětem, u nichž dochází k neurologickým regresím, a proto je vhodné jejich léčbu soustředit do center pro léčbu epilepsie a se zkušenostmi s TSC.

#### Ledviny:

- Po celý život pacienta provádět v intervalu 1-3 roky MRI břicha za účelem posouzení progresu renálních AML a cystické nemoci ledvin.
- Minimálně každoročně posoudit funkci ledvin (včetně stanovení glomerulární filtrace) a změřit krevní tlak.
- První volbou terapie je u krvácejících AML provedení embolizace spolu s léčbou kortikosteroidy. Je vhodné se vyhnout nefrektomii. Pro asymptomatický, rostoucí AML (měřící více než 3 cm v průměru) je doporučována léčba inhibítorem mTOR. Selektivní embolizace nebo ledviny šetřící resekce jsou přijatelnou terapií druhé volby.

#### Plíce:

- Při každé návštěvě provést screening na příznaky LAM, včetně dušnosti a dušnosti po námaze. Osobám ohrožených LAM poskytnout poradenství ohledně rizik kouření a užívání estrogenerů.
- Provést HRCT každých 5-10 let u asymptomatických pacientů s rizikem LAM, jejichž výchozí HRCT neprokázalo žádné plicní cysty. Jedinci s HRCT detekovanými plicními cystami podstoupí jednou za rok funkční vyšetření plic (funkční plicní testy, test 6minutové chůze) a interval provedení HRCT je u nich snížen na každých 2-3 let.
- mTOR inhibitory mohou být použity k léčbě pacientů se středně závažnou až těžce závažnou LAM nebo s rychlou progresí. Pacienti s LAM jsou kandidáty pro transplantaci plic. TSC komorbidity mohou ovlivnit transplantaci.

#### Kůže:

- Každoročně provést důkladné klinické dermatologické vyšetření.

- U rychle se měnících, neestetických či symptomatických TSC asociovaných kožních lézí je možné zvolit různý přístup, např. chirurgické vyříznutí, použití laseru či využití mTOR inhibice.

#### Zuby:

- Provést důkladné stomatologické vyšetření minimálně každých 6 měsíců a panoramatický rentgenový snímek od 7 let věku.
- Symptomatické či neestetické dentální léze, ústní fibromy a léze čelisti by měly být chirurgicky odstraněny (vyříznutím či kyretáží).

#### Srdce:

- Získat echokardiogram u asymptomatických dětských pacientů každého 1-3 roku do regrese srdečních rhabdomyomů. Častěji je diagnostické posuzování nutné u symptomatických pacientů.
- Získat elektrokardiogram každých 3-5 let od asymptomatických pacientů všech věkových skupin za účelem monitorování poruch vedení vzruchu. Častější a pokročilejší diagnostické zhodnocení může být vyžadováno u symptomatických pacientů.

#### Oči:

- Provést roční oftalmologické zhodnocení pacientů s již dříve identifikovanými očními lézemi nebo se suspektními příznaky při základním vyšetření. Častější hodnocení, včetně nemocných léčených vigabatrinem se nedoporučuje, pokud nevyvstanou nové klinické problémy.



### 3. TSC geny

S tuberózní sklerózou jsou asociovány 2 tumor supresorové geny - gen TSC1 a gen TSC2. Přibližně dvě třetiny TSC případů jsou způsobeny *de novo* mutacemi. Zatímco v rámci sporadických případů jsou mutace v genu TSC2 nalézány častěji než v genu TSC1 (Sancak *et al.*, 2005), tak ve familiárních případech je poměr odhalených mutací v genu TSC1 a TSC2 vyvážený (Jones *et al.*, 1999).

Doposud nebylo v TSC genech objeveno „horké“ mutační místo.

#### 3.1 Gen TSC1 a jeho produkt hamartin

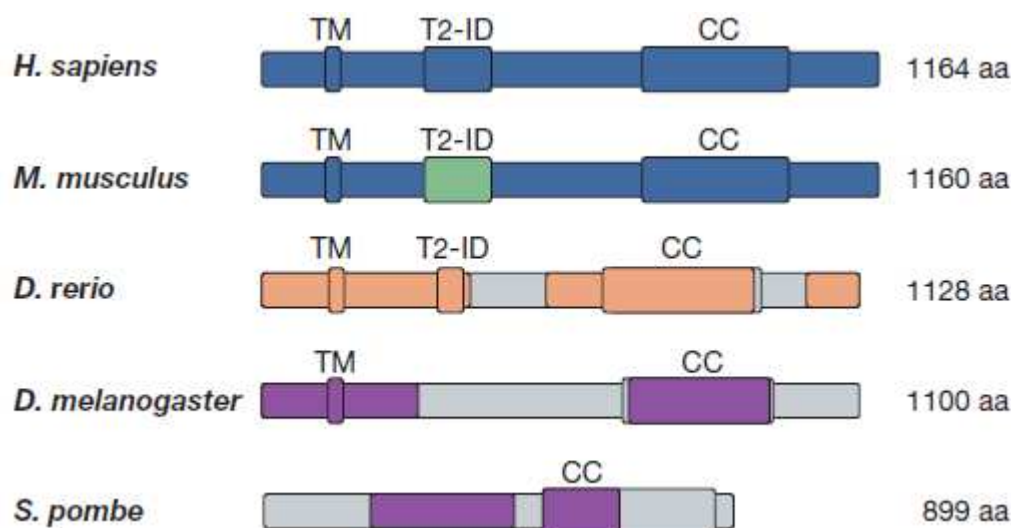
Přibližně 50 kb dlouhý TSC1 gen byl identifikován v roce 1997 na 9. chromozomu (9q34). Je složený z 23 exonů, přičemž první dva exony jsou nekódující (van Slegtenhorst *et al.*, 1997). Dle v současnosti používané referenční genomické sekvence NG\_012386.1 je rozsah genu přes 60 kb a délka jeho transkriptu (NM\_000368.4) je přibližně 8,6 kb.

Produktem genu TSC1 je hamartin – protein s hydrofilní povahou, složený z 1164 aminokyselin a s molekulovou hmotností 130 kDa. Ve struktuře hamartinu byla predikována jedna transmembránová doména zahrnující aminokyselinové zbytky 127 – 144 a  $\alpha$ -helikální doména složená z aminokyselin 730 – 996 (Gomez *et al.*, 1999). Asociaci s produktem genu TSC2 (s tuberinem) zajišťuje oblast tvořená aminokyselinovými zbytky 302 – 430, která představuje vazebnou (interakční) doménu (Hodges *et al.*, 2001). Následující obrázek (obr. 1) znázorňuje umístění jednotlivých domén, přičemž barevně je vyjádřena míra identity (konzervovanost) aminokyselinových zbytků mezi hamartinem různých živočišných druhů a lidským hamartinem.

Další důležitý region představují aminokyseliny v pozicích 881 – 1084, které slouží k interakci hamartinu s ezrin-radixin-moesin (ERM) proteiny, jež asociují s aktinem. Pokud je funkčnost hamartinu narušena, buňky s fokální adhezí ztrácí schopnost adherovat k buněčnému substrátu (Lamb *et al.*, 2000).

Dle záznamů v LOVD TSC1 bylo dosud (červen 2016) v genu TSC1 identifikováno přibližně 850 jedinečných sekvenčních variant. Nejčastějším typem mutací postihující gen TSC1 jsou nesmyslné či posunové mutace, které způsobují zkrácení délky genového produktu. (Hung *et al.*, 2006, Jones *et al.*, 1999, Dabora *et al.*, 2001). Rozsáhlé přestavby, in frame delece a záměnové mutace se vyskytují v genu TSC1 ojedinele (Sancak *et al.*, 2005). Ani setřihové mutace nebývají často detekovány (Sancak *et al.*, 2005, Dabora *et al.*, 2001).

**Obr. 1: Evoluční konzervovanost hamartinu**



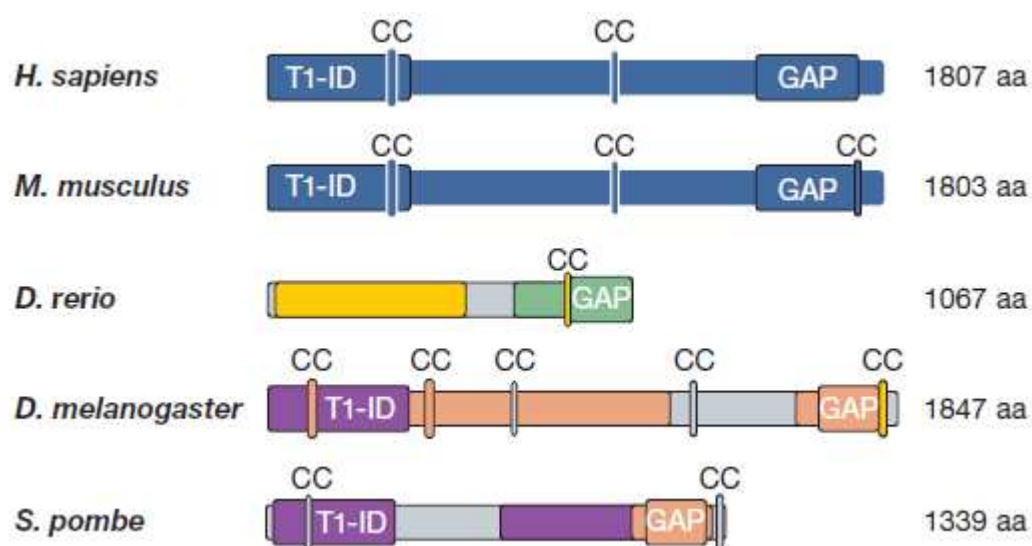
Modrá barva – aminokyseliny jsou z 80 % a více % identické k lidskému hamartinu, zelená barva: 65% -79% identita, světle hnědá: 35% - 49% identita, fialová barva: 20%-34% identita, šedá barva: nebyl zjištěn signifikantní homolog k hamartinu, aa – aminokyseliny. CC -  $\alpha$ -helikální doména, T2-ID – TSC2 interakční doména, TM – transmembránová doména.

Převzato a upraveno: (Neuman *et Henske*, 2011)

### 3.2 Gen TSC2 a jeho produkt hamartin

V roce 1993 byl pozičním klonováním identifikován gen TSC2 na 16. chromozomu (16p13.3). V přibližně 43 kb dlouhé sekvenci genu TSC2 bylo odhaleno 41 kódujících exonů, které dávají vzniknout TSC2 transkriptu o velikosti 5,5 kb, jehož produktem je protein tuberin (198 kDa) nacházející se v buňkách mnoha tkání a orgánů (např. v mozku, ledvinách, v pokožce, játrech, lymfocytech či v srdci) (European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium., 1993). Jelikož cDNA klon využitý při identifikaci TSC2 genu nezahrnoval sekvenci exonu 31, neboť ten byl alternativním sestřihem odstraněn, byla stanovena kratší délka výsledného transkriptu (Gomez *et al.*, 1999). Dalším z exonů, který podléhá alternativnímu sestřihu je exon 25 a první kodón exonu 26 (Xu *et al.*, 1995). Dle aktuálních referenčních sekvencí získaných z NCBI (Národního centra pro biotechnologické informace) je gen TSC2 dlouhý přibližně 46,8 kb (NG\_005895.1) a skládá se ze 42 exonů, přičemž exon 1 je nekódující. TSC2 transkript (NM\_000548.3, nová verze NM\_000548.4) dosahuje velikosti přibližně 5,7 kb. Vzniklý tuberin je složený z 1807 aminokyselinových zbytků a je vysoce evolučně konzervovaný mezi obratlovci (např. zejména u primátů a hlodavců). Míra konzervovanosti tuberinu mezi některými živočišnými druhy je znázorněna na obr. 2.

**Obr. 2: Evoluční konzervovanost tuberinu**



Modrá barva – aminokyseliny jsou z 80 % a více % identické k lidskému tuberinu, zelená barva: 65% -79% identita, žlutá barva 50% - 64 % identita, světle hnědá: 35% - 49% identita, fialová barva: 20%-34% identita, šedá barva: nebyl zjištěn signifikantní homolog k tuberinu, aa – aminokyseliny. CC -  $\alpha$ -helikální domény, T1-ID – TSC1 interakční doména, GAP doména.

Převzato a upraveno: (Neuman *et Henske*, 2011).

Ve struktuře tuberinu bylo predikováno celkem 7 funkčních domén. Jejich pozice ve směru od N-konce tuberinu k jeho C-konci byla následující: doména leucinového zipu (tvořená aminokyselinami 81 – 98), dvě  $\alpha$ -helikálních domény (oblast aminokyselinových zbytků 346 – 371 a 1008 – 1021), první transkripční aktivační doména (aminokyseliny 1163 – 1259) následovaná významnou GAP (GTPáza-aktivační protein) doménou (region aminokyselin 1517 – 1674), za ní umístěná druhá transkripční aktivační doména (aminokyseliny 1690 – 1744) a téměř u C-konce tuberinu reprezentovaly aminokyseliny 1740 – 1755 kalmodulin vazebnou doménu (Krymskaya, 2003).

Dosud (červen 2016) je v LOVD TSC2 zaznamenáno přes 2 400 unikátních sekvenčních variant. Kazuální mutace jsou přitom detekovány jak v oblasti funkčních domén, tak i mezi nimi. Často identifikovanými mutacemi jsou posunové mutace způsobené malými inzercemi/delecemi a nesmyslné mutace. Vyjímecný není ani záchyt sestřihových mutací či rozsáhlých přestaveb ve struktuře TSC2 genu. Rovněž i in-frame delece jsou součástí spektra odhalených mutací (Sancak *et al.*, 2005; Dabora *et al.*, 2001).

### 3.3 Biologické funkce produktů TSC genů

Produkt genu TSC1 s produktem genu TSC2 v buňce vytváří komplex (van Slegtenhorst *et al.*, 1998). Třetí nedávno objevenou podjednotkou tohoto TSC1/TSC2 komplexu je produkt genu TBC1D7 (TBC1 domain family, member 7), přičemž hamartin se váže k tuberinu i TBC1D7 a oba stabilizuje. Z výsledků sekvenční analýzy TBC1D7 genu provedené u TSC pacientů vyplývá, že tento gen pravděpodobně nepředstavuje případný TSC3 gen. Komplex TSC-TBC prostřednictvím Rheb-mTORC1 signalizace funguje jako negativní regulátor buněčného růstu a proliferace (Dibble *et al.*, 2012).

Protein Rheb (Ras homolog enriched in brain) je součástí superrodiny Ras proteinů - G-proteinů, které vykazují vysokou míru konzervovanosti od kvasinek k savcům. Přestože tyto proteiny disponují vlastní GTPázovou (guanointrifosfátázovou) aktivitou, k její akceleraci vyžadují stimulaci GTPázovými aktivačními proteiny (Parmar *et Tamano*, 2010).

Inoki a kol. (2003a) odhalili, že za převedení aktivní GTP-Rheb (guanointrifosfát-Rheb) do neaktivní GDP-Rheb (guanoindifosfát-Rheb) formy je v rámci komplexu TSC1/TSC2 odpovědný tuberin, neboť ve své struktuře má začleněnou GAP-doménu.

Rheb-GTP je aktivátorem mTORC1 (Long *et al.*, 2005). Tento komplex se skládá z 5 komponent a je citlivý k rapamycinu. Katalytickou podjednotku komplexu představuje serin/treoninová kináza mTOR, další podjednotkou je raptor (regulatory-associated protein of mTOR), PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40 kDa) mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein8) a daptor (DEP-domain-containing mTOR-interacting protein) (Peterson *et al.*, 2009).

Aktivní mTORC1 přímo fosforyluje p70 ribozomální protein-S6-kinázu (p70S6K známou také jako S6K1) a 4E eukaryotický iniciační faktor translace (4E-BP1). Následně dochází k stimulaci růstu a proliferace buněk, neboť aktivace p70S6K vyvolá zvýšenou biogenezi ribozomů a fosforylace 4E-BP1 způsobí zrušení vazby mezi translačním iniciačním faktorem eIF4E a jeho inhibítorem (4E-BP1). Poté prostřednictvím eIF4E dochází ke zvýšení 5'cap-dependentní mRNA (mediátorová ribonukleová kyselina) translace (Astrinidis *et Henske*, 2005).

Aktivita TSC komplexu a následné spuštění mTOR signální kaskády je regulováno pomocí fosforylace serinů (S) či threoninů (T) v tuberinu a hamartinu různými proteinkinázami v závislosti na hladině kyslíku a energetickém stavu buňky (na množství živin, na přítomnosti růstových faktorů).

Za nepříznivých podmínek pro růst dochází v buňce proteinkinázou AMPK (proteinkináza aktivovaná adenosinmonofostátem) přímou fosforylací T1227 a S1345 k aktivaci tuberinu, což v důsledku útlumu mTOR signalizace vede k inhibici růstu buněk a translace, a tedy k prodloužení přežívání buněk. Buňky jsou za této situace chráněny před apoptózou indukovanou energetickou deprivací (Inoki *et al.*, 2003b).

Kromě nedostatku energie způsobí inhibici mTORC1 dráhy i hypoxie, která indukuje expresi REDD1 genu, jehož produkt (RTP801 zvaný též REDD1 – protein regulated in development and DNA damage responses 1) stimuluje funkci hamartin/tuberinového komplexu (Sofer *et al.*, 2005).

Naopak v přítomnosti růstových faktorů je v buňce aktivována fosfatidyl-inositol-3-kinázová dráha (PI3K), jejíž součástí je i aktivace proteinkinázy Akt. V důsledku inhibiční fosforylace tuberinu prostřednictvím aktivní Akt je utlumena GTPázová aktivita tuberinu k Rheb, a proto se množství aktivní formy Rheb zvyšuje a dochází k stimulaci mTORC1 signální kaskády (Astrinidis *et Henske*, 2005).

V případě spuštění MAPK (mitogeny aktivované proteinkinázové) dráhy, je inhibiční fosforylace hamartin/tuberinového komplexu zprostředkována kinázami ERK1/2 (kinázy regulované extracelulárním signálem) (Ma *et al.*, 2005) a RSK1 (ERK-aktivovaná p90 ribozomální S6 kináza) (Krymskaya, 2008).

### **3.4 Ztráta heterozygosity (LOH) TSC genů**

Ztráta heterozygosity byla pozorována v celé řadě TSC asociovaných lézí, což svědčí o správnosti zařazení TSC genů mezi tumor supresorové geny. Zatímco u AML ledvin je LOH poměrně častá, v intrakraniálních lézích k ní dochází velmi vzácně. Důkazem je studie LOH chromozomálních oblastí 16p16 a 9q34 provedená u 87 lézí 47 TSC pacientů. Žádný z 11 analyzovaných SEGA nevykazoval LOH v TSC1 chromozomální oblasti a pouze v jediném SEGA byla odhalena LOH v 16p13 regionu. Zcela negativní výsledek LOH analýzy byl shledán u všech (14) vyšetřovaných kortikálních tuberů a kožních lézí (dvou angiofibromů a jedné šagrénové skvrny). V rámci testování 6 kardiálních rhabdomyomů nebyla prokázána LOH 9q34 regionu a pouze ve dvou případech byla detekována LOH TSC2 chromozomální oblasti. Z 53 angiomyolipomů jich 49 bylo informativních na jeden či více markerů pro oblast 9q34 a 16p13. Z těchto 49 ledvinových lézí 28 AML (57 %) mělo 16p13 LOH a u 4 AML (8 %) byla prokázána LOH TSC1 chromozomálního regionu. Výsledky této analýzy naznačují, že léze na mozkou vznikají odlišnými mechanismy než TSC poškození ledvin a srdce (Henske *et al.*, 1996).

Vzhledem k podobné renální a plicní manifestaci TSC a LAM byl další výzkum zaměřen na LOH analýzu u 13 vzorků AML pocházejících od pacientek se sporadickou formou LAM. Zatímco LOH TSC2 byla zaznamenána u 7 (54 %) AML, TSC1 LOH nebyla pozorována u žádného AML. Jelikož TSC2 LOH byla rovněž zjištěna i ve 4 lymfatických uzlinách od ženy s retroperitoneální LAM, je pravděpodobné, že gen TSC2 se podílí i na patogenezi sporadické LAM (Smolarek *et al.*, 1998).

Yu a kol. (2001) předpokládali, že plicní LAM by mohla být důsledkem migrace abnormálních buněk hladkého svalstva z AML do plic. Podkladem pro tuto hypotézu byly výsledky porovnání LOH analýz 2 pacientů se sporadickou LAM, u nichž již dříve byly nalezeny TSC2 mutace a prokázána LOH. Prostřednictvím rozšířené sady mikrosatelitních markerů byly prokázány totožné LOH TSC2 profily mezi AML a plicními LAM buňkami.

### 3.5 Mozaicismus

Jedinci reprezentující případy somatického mozaicismu s nízkou frekvencí výskytu mutované alely mohou mít pouze mírný TSC fenotyp (Verhoef *et al.*, 1999) nebo bez detailního klinického vyšetření mohou být mylně považováni za zdravé, či skutečně nevykazují znaky související s TSC.

Vzhledem k autozomálně dominantnímu typu dědičnosti onemocnění existuje 50% riziko pro potomky a to jak pro případy, kdy se příčinná mutace vyskytuje v ne-mozaikovém heterozygotním stavu, tak i pro případy somatických mozaik, u nichž je mutovaná alela s různou frekvencí zastoupena v DNA vzorcích pocházejících z rozličných biologických materiálů (např. krev, močový sediment, bukalní stěr, vlasové kořínky, ejakulát).

Masivní paralelní sekvenování (MPS) se jeví jako velmi užitečné při odhalování mutací ve formě mozaik, což dokládá následující studie. Tyburczy a kol. (2015) metodou MPS vyšetřovali DNA vzorky izolované z krve, slin či angiofibromů u 53 TSC pacientů, u nichž konvenčními technikami nebyla identifikována žádná mutace. U 45 (85 %) jedinců odhalily mutaci v jednom z TSC genů. Značná část detekovaných mutací (26 ze 45; 58 %) bylo ve formě mozaiky, přičemž frekvence mutované alely se pohybovala v rozsahu 0,21 % - 34 %. U 17 osob byla frekvence mutované alely pod 5 %, v 5 případech dokonce pod 1 %. U dvou jedinců byla mutace prokazatelná pouze ve vzorku z kožního tumoru. Významný podíl z celkově nalezených mutací (18 ze 45; 40 %) se nacházel v intronových oblastech. Na základě těchto výsledků se autoři domnívají, že zastoupení mutací ve formě mozaik je vyšší než se usuzuje, zdůrazňují

významnost plného pokrytí lokusu genu TSC1 a TSC2 a zároveň doporučují NGS i pro analýzu DNA z tumorů asociovaných s TSC.

Vyjádření míry rizika TSC pro dalšího potomka komplikuje gonadální mozaicismus. Zejména situace, kdy se rodičům, kteří nevykazují symptomy TSC, narodí dítě s tuberózní sklerózou a následně i další potomek nebo některý z dalších potomků je postižen TSC, svědčí pro možnost gonadálního mozaicismu u jednoho z rodičů.

Výskyt gonadálního mozaicismu je dle literatury vzácný, přibližně 2% (Verhoef *et al.*, 1999). Vyšší záchyt (5%) gonadálního mozaicismu popisuje studie 120 TSC rodin, kde se na podkladě klinického zhodnocení rodinných příslušníků gonadální mozaicismus očekával u 7 rodin (7/120; 6 %). Z těchto 7 rodin se podařilo detekovat příčinnou mutaci u 6 rodin, přičemž mozaika zárodečné linie byla u 5 rodin zastoupena mutací v genu TSC2 a v jedné rodině mutací genu TSC1. Riziko rekurence TSC je individuální pro každou rodinu, neboť závisí na množství mutovaných buněk v zárodečné linii rodiče s mozaicismem (Rose *et al.*, 1999).

Proto je vhodné v případech, kdy u probanda (dítěte) je již identifikovaná mutace a rodiče jsou asymptomatictí a cílené genetické testování jejich vzorku DNA izolované z krve bylo negativní, nabídnout této rodině pro další těhotenství možnost prenatální diagnostiky.

#### **4. Cíle dizertační práce**

1. Provést analýzu TSC genů ve vybraném souboru pacientů
2. Provést fenotyp/genotypovou studii v souboru TSC pacientů



## **5. Materiál a metodika**

### **5.1 Přístrojové vybavení**

Fluorometer: Qubit® 2.0 (Invitrogen)

Genetické analyzátoři: 3130 Applied Biosystems, ABI PRISM 310 Applied Biosystems

Sekvenátor nové generace: Ion Torrent™ Personal Genome Machine® (PGM) System

Termocyclery řady C1000 (Bio-Rad)

UV-Vis spectrophotometer: NanoDrop 2000c (Thermo Scientific)

### **5.2 Soubor TSC pacientů**

Analyzovaný soubor tvořilo 118 pacientů, přičemž probandů bylo 99 a 19 případů reprezentovalo tuberózní sklerózou postižené rodinné příslušníky některých probandů. Vzorky deoxyribonukleové kyseliny (DNA), periferní krev a výjimečně bukalní stěr či moč pacientů pocházely z genetických (popřípadě neurologických) pracovišť z různých míst České republiky. Údaje o klinickém obrazu pacienta byly zaznamenány indikujícím lékařem do registračního formuláře, jenž je součástí přílohy (příloha 1). Do studie byli zahrnuti i jedinci, u nichž byl znám pouze 1 klinický údaj. Dle diagnostických kritérií všichni pacienti (kromě jednoho) splňovali podmínky pro stanovení definitivní (95 osob) nebo možné (22 osob) diagnózy TSC. Pacient, který nespĺňoval podmínky pro stanovení diagnózy tuberózní sklerózy byl příslušníkem 4členné rodiny a do souboru byl zařazen za účelem sledování intrafamiální variability onemocnění. Věkový rozptyl v souboru: 2 dny – 65 let.

### **5.3 Metody**

#### **5.3.1 Izolace DNA z leukocytů periferní krve Millerovou metodou**

1. 10 ml periferní krve smísit s 300 µl EDTA (pH = 8,0).
2. Krev přelit do kyvety (50 ml zkumavka), přidat 30 ml lyzačního pufru (LB) a nechat lyzovat na ledě 45 min.
3. Krev centrifugovat 20 minut při 2200 rpm.
4. Odstranit supernatant.

5. Přidat 10 ml LB pufru, sediment důkladně protřepat s LB pufrem a centrifugovat 10 min při 2200 rpm.
6. Slít supernatant, pelet lehce opláchnout LB pufrem.
7. K sedimentu přidat 3 ml NLB (Nucei lysisbuffer), promíchat a kvantitativně přenést do 10ml zkumavky.
8. Přidat 50  $\mu$ l proteinázy K (20  $\mu$ g/ $\mu$ l), 150  $\mu$ l 20% SDS a důkladně protřepat.
9. Ponechat inkubovat přes noc v termostatu při teplotě 37 °C.
10. Přidat 1000  $\mu$ l NaCl (6 mol/l), 15 s protřepat.
11. Centrifugovat při 4000 rpm 15 min.
12. Supernatant slít do 10ml zkumavky, centrifugovat při 4000 rpm 15 min, tento bod postupu opakovat dokud není supernatant čirý.
13. Supernatant slít do 15ml zkumavky, zalít 100% ethanolem a ponechat vysrážet DNA.
14. „Medůzku“ DNA přenést do mikrozkušavky s 70% ethanolem, protřepat a centrifugovat při 8000 rpm 5 min.
15. Opatrně slít ethanol a mikrozkušavku ponechat volně vyschnout.
16. DNA rozpustit v 500  $\mu$ l TE pufru.

Složení roztoků:

Lyzační pufr (LB):

- 8,825 g 155 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- 1,001 g 10 mM  $\text{KHCO}_3$
- 0,372 g 1 mM EDTA nebo 2 ml 0,5 M EDTA

Přidáním cca 800  $\mu$ l konc. NaOH upravit pH na 7,3 – 7,4 a doplnit destilovanou  $\text{H}_2\text{O}$  do 1 l.

Nucei lysisbuffer (NLB):

- 23,376 g 400 mM NaCl
- 1,211 g 10 mM Tris-HCl
- 0,745 g 2 mM EDTA

Upravit pH na hodnoty 7,3 – 7,4 a doplnit roztok destilovanou vodou do 1 l.

TE pufr:

- 2,5 ml 7,5 M Tris
- 0,5 ml 0,5 M EDTA

Doplnit destilovanou vodou do 250 ml.

### 5.3.2 Izolace DNA z buněk bukálního stěru a močového sedimentu pomocí kitu

Použitý kit: QIAamp DNA Mini (QIAGEN)

1. A) V případě bukálního stěru provést důkladné promytí odběrového kartáčku v 500  $\mu$ l deionizované vody v 1,5 ml mikrozkuhavce a pokračovat bodem 2.
1. B) V případě vzorku moče napipetovat 1ml moče z odběrové zkumavky do 1,5 ml mikrozkuhavky.
2. Mikrozkuhavku s roztokem centrifugovat 5 min/13 000 g. (pozn: pro získání dostatečně velkého peletu, je možné krok 1 a 2 provést opakovaně)
3. Slít supernatant, přidat 180  $\mu$ l ATL pufru + 20  $\mu$ l proteinasy K, protřepat.
4. Inkubovat na vodní lázni při 56°C 1 – 3 hod, v průběhu vortexovat a kontrolovat zda je materiál zcela zlyzován.
5. Po úplné lýze buněk přidat 200  $\mu$ l AL pufru, protřepat a inkubovat při 70°C 10 min.
6. Přidat 210  $\mu$ l 96% ethanolu, protřepat.
7. Přenést na kolonku pomocí pipety.
8. Centrifugovat 1 min/8 000 g.
9. Kolonku přenést do čisté zkumavky, na kolonku přidat 500  $\mu$ l AW1 pufru
10. Centrifugovat 1min/8 000 g.
11. Kolonku přenést do čisté zkumavky, na kolonku přidat 500  $\mu$ l AW2 pufru
12. Centrifugovat 3 min/13 000 g.
13. Kolonku přenést do čisté zkumavky a prázdnou centrifugovat 30s/ 8 000 g
14. Kolonku přenést do čisté označené mikrozkuhavky, přidat 100  $\mu$ l AE pufru
15. (vytemperovaného na 70°C).
17. Inkubovat 1 min při pokojové teplotě.
18. Centrifugovat 1 min/8 000 g.
19. Přenést filtrát zpět na kolonku pomocí pipety, uzavřít zkumavku.
20. Inkubovat na termobloku při 70°C/5 min.
21. Centrifugovat 5 min/13 000 g.
22. Odstranit kolonku a mikrozkuhavku s DNA uzavřít.

### 5.3.3 Molekulární analýza TSC genů

V první fázi byla analýza TSC genů zaměřena na zjištění případných delecí/duplikací pomocí časově nenáročné (2denní) metody MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification).

Jestliže výsledek této techniky byl negativní, byly následně využity různé strategie vhodné pro detekci mutací malého rozsahu. U části pacientů byla analýza TSC genů provedena kombinací skenovací techniky denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE) a následného sekvenování vytipovaného aberantního fragmentu (exonu) Sangerovou metodou. U většiny pacientů byla pro odhalení mutace zvolena strategie přímého Sangerova sekvenování obou genů. U minoritní části vyšetřovaných TSC osob byla mutace zjištěna technikou masivního paralelního sekvenování (MPS) prostřednictvím platformy Ion Torrent.

### **5.3.3.1 Multiplexová ligačně dependentní amplifikace prób (MLPA)**

Zachycení rozsáhlých přestaveb TSC genů umožnila metoda MLPA. K analýze TSC1 genu byl využit probemix P124-C1-0112. Pro gen TSC2 bylo použito několik různých směsí sond. Avšak TSC2 probemixy (P046-B3-0111, P046-C1-1011, P046-C1-0315) se mezi sebou lišily. Verze B3 oproti verzím C1 postrádala sondy pro 9 exonů TSC2 genu a mezi verzemi C1 byla odlišnost v číslování exonů. Za účelem sjednocení výsledků byly všechny nálezy confirmovány pomocí probemixu P046-C1 Lot 0315 (verze 12; 26. 11. 2015). Provedení metody bylo v souladu s protokolem firmy MRC-Holland.

#### Denaturace DNA:

1. Napipetovat 5  $\mu$ l DNA vzorků (50-250ng/reakce) do označených 0,2 ml mikrozkušavek (pro metodu MLPA byla DNA vzorků TSC pacientů ředěna na koncentraci 20 ng/ $\mu$ l). Do zkumavky „blank“ napipetovat 5  $\mu$ l TE pufru.
2. Uložit zkumavky se vzorky do termocycleru a spustit níže popsany program.
3. Denaturovat vzorky DNA 5 minut při 98°C a následně ochladit na 25°C. Po ochlazení mohou být zkumavky vyjmuty z termocycleru.

#### Hybridizační reakce:

1. Před použitím důkladně promíchat MLPA pufr a MLPA probemix.
2. Připravit si hybridizační master mix obsahující pro každou reakci: 1,5  $\mu$ l MLPA pufru
3. a 1,5  $\mu$ l a probemixu. Smíchat dobře hybridizační master mix pipetováním či vortexováním.
4. Po DNA denaturaci, přidat 3  $\mu$ l směsi hybridizačního master mixu do každé zkumavky se vzorkem. Dobře promíchat pipetováním nahoru a dolů.
5. Pokračovat v termocykleru programem: inkubace 1 minutu při 95 ° C a poté 16 až 20 hodin
6. při 60 ° C.

### Ligační reakce:

1. Před použitím pečlivě promíchat dva ligační pufry.
2. Připravit Ligáza-65 master mix. Pro každou reakci Ligáza-65 master mix obsahuje: 25 µl dH<sub>2</sub>O, 3 µl Ligačního pufry A + 3 µl Ligačního pufry B. Poté přidat 1 µl enzymu, Ligázy-65. Dobře promíchat pipetováním jemně nahoru a dolů. Nikdy nevortexovat roztoky s enzymy.
3. Pokračovat v programu v termocykleru. Při zastavení (pauze) programu při 54 °C, přidat 32 µl připravené směsi (Ligáza-65 master mix) do každé zkumavky. Jemně promíchat pipetováním nahoru a dolů.
4. Pokračovat v termocykleru v programu: 15 minut inkubace při 54 °C (pro ligaci), následuje 5 minut při teplotě 98° C (inaktivace Ligázy-65 teplem) a poté pauza při teplotě 20 °C. V tomto okamžiku je možné odstranit zkumavky z termocykleru. V případě, že se nepokračuje hned v PCR reakci, je možné produkty ligační reakce skladovat při pokojové teplotě po dobu několika hodin, nebo při 4 °C po dobu jednoho týdne.

### Polymerázová řetězová reakce (PCR):

1. Před použitím pečlivě promíchat SALSA PCR primer mix a zahřát SALSA Polymerázu po dobu 10 sekund v ruce pro snížení její viskozity
2. Připravit polymerázový master mix, který pro každou reakci obsahuje: 7,5 µl dH<sub>2</sub>O, 2 µl SALSA PCR primer mixu a 0,5 µl SALSA polymerázy. Nevortexovat, dobře promíchat pipetováním nahoru a dolů. Skladovat na ledě až do použití.
3. Při pokojové teplotě přidat do každé zkumavky 10 µl polymerázové směsi. Jemně promíchat pipetováním nahoru a dolů a spustit program v termocykleru zahrnující 35 cyklů: 30 sekund 95 °C, 30 sekund 60 °C; 60 sekund 72 °C. Závěrem reakce je 20 min inkubace při 72 °C a následovaná pauzou při 15 °C.
4. Po PCR reakci, neotevírat zkumavky v místnosti s termocyklerem, aby se zabránilo kontaminaci.
5. PCR produkty lze skladovat při teplotě 4 °C po dobu jednoho týdne. Pro delší dobu skladování je vhodná teplota mezi -25 °C a -15 °C. Vzhledem k použití fluorescenční barvy, která je citlivá na světlo, je doporučováno skladovat PCR produkty zabalené v alobalu.

### Příprava vzorků a separace kapilární elektroforézou:

V případě použití genetického analyzátoru ABI Prism 310 jednotlivé vzorky pro separaci obsahovaly: 10 µl HiDi formamidu; 0,4 µl velikostního standardu (TAMRA 500) a 0,8 µl PCR

reakce. Denaturace byla provedena při 95 °C v trvání 3 minut. K nástřiku vzorku docházelo za podmínek: 6 kV po dobu 15 s nebo při 8 kV v trvání 8,5 s (v návodu je doporučováno 1,6 kV po dobu 15 s). Vlastní separace probíhala v polymeru POP4 při 15 kV, 60°C a po dobu 28 minut. Pokud byl k separaci fragmentů využit genetický analyzátor 3130, směs pro separaci byla složena z: 10 µl HiDi formamidu; 0,4 µl velikostního standardu (LIZ 500) a 0,8 µl PCR reakce. Denaturace byla opět 3 minuty při 95 °C. K separaci docházelo v polymeru POP7 za doporučených podmínek: nasátí vzorku při 1,6 kV po dobu 15 s a vlastní separace při POP4 při 15 kV, 60°C a po dobu 30 minut.

#### Analýza MLPA dat:

U analyzátoru ABI Prism 310 snímání a digitalizaci hrubých dat fluorescence zajišťoval software ABI PRISM 310 Data Collection. K analýze výstupních dat byl využíván software 310 GeneScan (Applied Biosystems). U genetického analyzátoru 3130 byl za snímání a digitalizaci hrubých dat fluorescence odpovědný software Data Collection (Applied Biosystems) a k analýze dat byl využit software GeneMapper (Applied Biosystems). Pro vyhodnocování MLPA dat byl rovněž používán i program Coffalyser.

### **5.3.3.2 Denaturační gradientová gelová elektroforéza**

#### **5.3.3.2.1 Polymerázová řetězová reakce s DGGE primery**

V rámci genu TSC1 byly amplifikovány všechny kódující exony, kromě exonu 21. U genu TSC2 bylo amplifikováno celkem 32 exonů. Nevyšetřeno bylo těchto 10 exonů TSC2 genu: 1, 2, 9, 11, 14, 19, 25, 29, 33, 41). V závislosti na amplifikaci konkrétního exonu byla využita reakční směs (15,4 µl) s dimetylsulfoxidem (DMSO) či bez DMSO.

Složení PCR směsi s DMSO:

- 7,5 µl Combi PPP Master Mixu (Top-Bio)
- 4,6 µl PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio)
- 1,5 µl DMSO
- 0,4 µl 10 pmol primeru r a 0,4 µl 10 pmol primeru f

(TSC2 primery: 4r/f, 5 r/f, 7 r/f, 8 r/f, 10 r/f, 13 r/f, 17 r/f; 18 r/f, 21,1 r/f; 21,3 r/f; 22 r/f, 23 r/f; 26,2; 27 r/f, 28 r/f, 30 r/f, 31 r/f, 32 r/f, 34 r/f, 35 r/f, 36 r/f ,37 r/f, 39-40 r/f a TSC1 primery: 3,3

r/f, 5,1 r/f, 5,2 r/f, 6 r/f, 7 r/f, 8 r/f, 9,2 r/f, 11 r/f, 15,1 r/f, 15,3 r/f, 16 r/f, 17 r/f, 19 r/f, 20 r/f, 22 r/f, 23,2 r/f).

- 1 µl DNA (100 ng)

Složení PCR směsi bez DMSO:

- 7,5 µl Combi PPP Master Mixu (Top-Bio)
- 6,1 µl PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio)
  - 0,4 µl 10 pmol primeru r a 0,4 µl 10 pmol primeru f (TSC2 primery: 3 r/f, 6 r/f, 11 r/f, 12 r/f, 15 r/f, 16 r/f, 20 r/f, 21,2 r/f, 24 r/f, 26,1 r/f; 38 r/f, 42 r/f a TSC1 primery: 3,1 r/f, 3,2 r/f, 9,1 r/f, 10 r/f, 12 r/f, 13 r/f, 14 r/f, 15,2 r/f, 23,1 r/f, 23,3 r/f).
- 1 µl DNA (100 ng)

Program pro amplifikaci exonů TSC2 genu a exonů (15,1; 23,2; 18; 3,3; 16; 11; 23,1; 23,3; 15,2; 10; 3,1; 9,1; 12; 3,2; 14) TSC1 genu :

- Počáteční denaturace 5 min při 96 °C
  - Denaturace 30 s při 94 °C
  - *Annealing* 30 s při 63 °C
  - Prodlužování primerů (extenze) 45 s při 72 °C
  - Denaturace 30 s při 92 °C
  - *Annealing* 30 s při 63 °C
  - Prodlužování primerů (extenze) 45 s při 72 °C
  - Konečná extenze 10 min při 72 °C
  - Denaturace 10 min při 95 °C
  - Hybridizace vláken 45 min při 63 °C
  - Chlazení na 10 °C po neomezenou dobu
- } 10 cyklů
- } 28 cyklů

Amplifikační program pro ostatní exony TSC1 genu byl shodný s programem pro TSC2 gen, pouze fáze při 63 °C byly nahrazeny teplotou 58 °C.

### 5.3.3.2.2 Kontrolní separace PCR produktů pro DGGE na agarózovém gelu

Pro potvrzení přítomnosti jednotlivých amplikonů bylo 5 µl PCR reakce napipetováno do jamky 1,5% agarózového gelu v TBE pufru. Separace probíhala 25 min při 98 V. Vizualizace DNA

byla zprostředkována interkalací Ethidium bromidu (obsažen v gelu: 5  $\mu$ l EtBr (10 mg/ml) na 100 ml gelu) do DNA fragmentu, který po aplikaci UV záření vydává žluto-oranžovou barvu.

Složení TBE pufu (0,5x)

- 27 g Tris-(hydroxymetyl)-aminometanu
- 13,75 g kyseliny borité
- 1 ml 0,5 M EDTA
- 5 l destilované vody

### 5.3.3.2.3 Postup DGGE

Pro vyhledávání sekvenčních změn v genu TSC2, byly k separaci amplifikovaných úseků DNA využívány celkem 4 různé (20% - 65%, 30% - 70%, 40% - 80% a 45% - 75%) denaturační gradienty polyakrylamidového gelu. Pro separaci fragmentů TSC1 genu byly používány gradienty 10% - 55% a 20%-65%.

1. Příprava gelu byla prováděna smísením 0% a 80% denaturačního roztoku v poměrech, jež jsou uvedeny v tab. 3.
2. Přidat 22  $\mu$ l N,N,N',N'-tetramethyldiaminu (TEMED), který funguje jako katalyzátor kopolymerace akrylamidu s N,N'-metylenbisakrylamidem a po přidavku 157  $\mu$ l iniciátoru radikálové polymerace - persíranu amonného (APS) k připraveným roztokům o vyžadované koncentraci denaturačních látek, roztoky prostřednictvím směšovací soustavy velmi rychle promíchat a aplikovat do prostoru mezi elektroforetická skla
3. Hřebínek pro 20 jamek z gelu odstranit po 30 minutách trvající polymeraci a jamky pomocí injekční stříkačky promýt TAE pufrem.
4. Gel i se skly vsadit do elektroforetické komory naplněné TAE pufrem a následně napipetovat 10  $\mu$ l jednotlivých PCR produktů do gelových jamek a zahřát TAE pufu v elektroforetické komoře na 60 °C.
5. Podmínky separace 88 V/1600 Wh. Po ukončení separace gel oddělit od skel a ponechat 25 minut v roztoku destilované vody s EtBr (25  $\mu$ l EtBr (10 mg/ml) na 500 ml destilované vody). Posléze gel několikrát opláchnout destilovanou vodou a umístěn na UV transluminátor, čímž byla zajištěna vizualizace EtBr interkalovaného v separovaných fragmentech.
6. Počet a umístění fragmentů v gelu zdokumentovat digitálním fotoaparátem.



Složení používaných roztoků při DGGE:

TAE pufr (50x):

- 242 g Tris-(hydroxymetyl)-aminometanu
- 57,1 ml kyseliny octové
- 18,7 g EDTA

Doplnit do 1 l destilovanou vodou a upravit pH koncentrovanou HCl na hodnotu 8,0.

40% akrylamid/bisakrylamid (37,5 : 1):

- 38,93 g akrylamidu
- 1,07 g bisakrylamidu
- 60 ml destilované vody

0% denaturační roztok:

- 180 ml 40% akrylamidu/bisakrylamidu (37,5 : 1)
- 8 ml 50x TAE pufru

Doplnit destilovanou vodou do 800 ml.

80% denaturační roztok:

- 268,8 g močoviny
- 8 ml 50x TAE pufru
- 256 ml formamidu
- 180 ml 40% akrylamidu/bisakrylamidu (37,5 : 1)

Doplnit destilovanou vodou do 800 ml.

APS:

Připraveno rozpuštěním 10 g APS ve 100 ml destilované vody.

TEMED:

Komerčně dodaný

**Tab. 3: Objemové poměry 0% a 80% denaturačního roztoku při přípravě gradientů**

Denaturační gradient	% denaturantu	Objem [ml] 0% denaturačního roztoku	Objem [ml] 80% denaturačního roztoku
10%-55%	10	22,8	3,2
	55	8,2	17,8
20% - 65%	20	19,5	6,5
	65	4,9	21,1
30% - 70%	30	16,2	9,8
	70	3,1	22,9
40% - 80%	40	13,0	13,0
	80	0	26,0
45% - 75%	45	11,4	14,6
	75	1,6	24,4

### 5.3.3.3 Sekvenování Sangerovou metodou

#### 5.3.3.3.1 PCR se sekvenačními primery

Amplifikovány byly všechny kódující exony TSC1 a TSC2 genu. Seznam sekvencí použitých TSC1 a TSC2 primerů je uveden v tab. 4 a tab. 5. Teploty *annealingu* ( $T_a$ ) pro jednotlivé primery jsou zapsány v tab. 6. Pro všechny exony TSC1 genu a všechny exony (kromě 15. a 42. exonu) TSC2 genu byla použita reakční směs s obsahem DMSO. Exon 15 a 42 genu TSC2 byl amplifikován prostřednictvím reakční směsi bez DMSO.

Složení PCR směsi s DMSO (15  $\mu$ l) :

- 7,5  $\mu$ l Combi PPP Master Mixu (Top-Bio)
- 4,2  $\mu$ l PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio)
- 1,5  $\mu$ l DMSO
- 0,4  $\mu$ l 10 pmol TSC2 primeru r a 0,4  $\mu$ l 10 pmol TSC2 primeru f
- 1  $\mu$ l DNA (50 ng)

Složení PCR směsi bez DMSO (15  $\mu$ l) :

- 7,5  $\mu$ l Combi PPP Master Mixu (Top-Bio)
- 5,7  $\mu$ l PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio)
- 0,4  $\mu$ l 10 pmol TSC2 primeru r a 0,4  $\mu$ l 10 pmol TSC2 primeru f
- 1  $\mu$ l DNA (50 ng)

Amplifikační podmínky:

- Počáteční denaturace 3 min při 94 °C
  - Denaturace 1 min při 94 °C
  - *Annealing* 1 min 30 s při jedné z  $T_a$  (tab.?)
  - Prodlužování primerů (extenze) 2 min při 72 °C
  - Konečná extenze 7 min při 72 °C
  - Chlazení na 10 °C po neomezenou dobu
- } 34 cyklů

Pro potvrzení, že PCR proběhla úspěšně bylo 5  $\mu$ l PCR produktu separováno na 1,5% agarózovém gelu. Separační podmínky: 25 minut při 98 V. Vizualizace kombinací EtBr a UV.

**Tab. 4: Přehled sekvencí primerů TSC1 genu**

Primer	Sekvence f primeru ( 5' - 3' )	Primer	Sekvence r primeru ( 5' - 3' )
3/M-F	ATTGCATTGAACACGTGCAT	3/M-R	GCCAACCTGGTAAGCAAAAA
4/M-F	GCTGCACAAAACCTTAGAATAG	4/M-R	TGGGTCCTACAAAGTAATTTTT
5/M-F	ATCTGCATGACCCTTGCTTT	5/M-R	CCATACTTGCATGGACAAGG
6/M-F	GTTGGGGCTCAGTGTTCTGT	6/M-R	GCACCCAAGATATTCCCTCA
7/M-F	TGAGGTGGGAATATACATAGA	7/M-R	GTGGCGAGGAAGAAAAGTGA
8/M-F	TGTTCTCAAGGTTCCATCTGTG	8/M-R	ATTAGTCCTCCGCCTGTGAA
9/M-F	AACCATTTTAAACAGGGAAGG	9/M-R	GGGAAAATCCCTAGGAACTGA
10/M-F	AACCAGAATAACCTAAAACCACAC	10/M-R	TCCTGAAATGAGCAGTGTGAA
11/M-F	TGCAACTTGTTTCTTGATACGC	11/M-R	CAACAGCAAGTGGTCCCTTAG
12/M-F	CTGGGGCTTTCAGAATGTGT	12/M-R	CACACCTTGAGAGCAGCTTG
13/M-F	AACATCCCAACAATTTGAGAA	13/M-R	TGTTTAGGCCTCAGTATTTTG
14/M-F	CAGCCTTCTCTGTTCCAGCAT	14/M-R	TACCTGGCATAGGTCCCAGA
15V-F	TCTCCTCTCTCTGAGTGACAC	15V-R	AAGAAGTCTGGCATTCCC
15A-F	CCTCCCAAAGTTCTGGCATT	15A-R	CAGTCTGTCCAGCACTTCCA
15B-F	CCAAAGCAAGCCTTTACTCC	15B-R	AGAGAACCAGCTGCCTCAAG
16/M-F	CCTCCATTGTGTCCAGTGT	16/M-R	TTGAGATCCTTTAGCCAAGCA
17/M-F	GCTGGGAGTCAAGTGGTCAT	17/M-R	AGTGGGAAGGACTGGGAACT
18/M-F	TGACCTAAGGCCAAGTAAGAC	18/M-R	AAAGCTGAACAAGTCAAGGAC
19/M-F	AGGGCCCAAGAAAGTAGAGC	19/M-R	TGTTGGGAACCCATGACAC
20/M-F	GAACCCATGGGACTGGTTTA	20/M-R	ACCACGGAGTAGTGGGACTG
21/M-F	TGCCTTCTCAGTCCTTCTTACA	21/M-R	GCCTCATACTGCTCTCTGC
22/M-F	CTCACCTGGCCAAGAAAGAC	22/M-R	GTGGGTCTCTGACACGGAGT
23/M-F	GAGAGTGGGCTAGCGGAGTT	23/M-R	CAATGCCAGATCCAAAAACC

**Tab. 5: Přehled sekvencí primerů TSC2 genu**

<b>Primer</b>	<b>Sekvence f primeru (5' - 3')</b>	<b>Primer</b>	<b>Sekvence r primeru (5' - 3')</b>
2f	GGAAAGGTTATGCCACCAGA	2r	CAGCATTCTGTGTAGACAGT
3f	GCGGCTCGTCAAGTGAATC	3r	AAACCAGATCATCGGCAGTC
4f	AGGTGGGGCTCTCAGTCAC	4r	AACTCACCGAGGCAGGAGT
5f	GCCTCTGTGGGAAGGAGAG	5r	CAGGCCATCCCTGAGAAC
6f	GATCCTAGTGTCCGTGCGTAG	6r	TTTATTCACTGCGGAGCTGAA
7f	AGGCACCTGAGTGCTTGTG	7r	CTTACATGGGGGACTCCTGA
8f	CCCTGTGGCTTGGAGAGA	8r	GTCCCTCAACAGGCCATTGT
9f	GACCTTGGGTGGCTATAGGG	9r	CCCGAGAGGACAAGGACTC
10f	CGCAGGAGTGAACAAGAGTG	10r	GATGGGTGGGCAGGCGTG
11f	GATAAACGTGTGGTGGGCAC	11r	CACGGTTCTGGCAGTCTCTG
12f	GAGAGGATCTGGGGGTGTCT	12r	ACACAGGTGGGAGGAACTG
13f	GCTCTGACAGCAAACCAGCCT	13r	CATCGGGCATCCTGAGAC
14f	GGTCGTCTGGAGAGATGCT	14r	TGCCTTCCTTGCTACTTGGC
15f	CGGGTGCTTGTGCTCTCT	15r	TCAGGACACAAATCCAGCAG
16f	TTGTGGTAGAAAGTGTTCACG	16r	CATCCATCCCTCCACAAGAG
17f	GGGTTTGAAGTTCGTGTGTT	17r	CACAGTGGGTGCAGAGGAG
18-19f	AGGGGAAGGCTCAGCTC	18-19r	TTTCTGAGTGCCTGTGGTG
20f	TGAGAACAGGGCTCCATAGC	20r	GCTGAGTTTGAGGGAAATGG
21f	ACTCCCACCACTCCGAAAG	21r	CTAGAAGCACCAGGGAATCG
22f	AGTCTGCTCGGGTAGCTCAG	22r	CTCAAGGAGGAGCGTTCAC
23-24f	CCTTCTCTCCTCTGCAGCAC	23-24r	CTCCACCTGCCTGTCCTCT
25f	CCTAGCCTGCAGCTTGCTC	25r	CACTGACTTGGAGGCACCGT
26f	TCTCTCCATCCTGACCCTGT	26r	ACCTTTCACCCCTCGTC
27f	CCCTGTTGGGGTCTTTCC	27r	CACCCGCTAGGAGGAACTC
28-29f	TCTCCAACCTCACGGCTGTCCC	28-29r	GGCTCGGGCCTTCCTGAACA
30f	TCACTGAGGCCAGCACTGT	30r	ACCCCAAATATCCCAAGAG
31f	ATCGTGGTCCTGAGGATTGT	31r	GGAGAACAATGGTGCTGAGG
32f	CCCTGCCCTCTCTCCTCT	32r	AGGGCAATGGAGGCAGAC
33f	GTCCCTCTGGTCAGGAGAAGG	33r	ACGAGGGATGTGGAAGAACA
34f	TGGGATGGAGGACAGATAGG	34r	GGGCAAGTGAGGCACCAG
35-36f	GGAACCTGGTGCCTCACTT	35-36r	CTCAATGAGCACTTCATGCTG
37f	GCTGGAATGGATGGTCTTGT	37r	ACGCTGTTAGGCTCGGAAC
38f	CAGAGCCCCTGGAGTAATCA	38r	CTCTCCTCCTGCTCCTCGT
39-40f	AAAGTTCAGGGGCAGATGCT	39-40r	GCAATCCACTTGGAGGGGTA
41f	CTGCACGCAAATGTGAGTGGG	41r	CCAGAGGTAGGCTGGGGTTG
42f	CAGCGGGTAGGGAATATGG	42r	CGCTTCTAGAGCCTCGACAC

**Tab. 6: Přehled Ta primerů pro amplifikaci jednotlivých exonů TSC genu**

Ta [°C]	Číslo primeru r/f pro amplifikaci exonů TSC1 genu
61,9	6; 14;15V; 15A; 15B; 17; 21; 22
58,5	8; 11; 12; 13; 16; 19; 20; 23
55,8	3
53,9	4; 5; 7; 9; 10; 18
Ta [°C]	Číslo primeru r/f pro amplifikaci exonů TSC1 genu
64,7	11; 4, 13;15; 25; 28-29; 41; 42
61,9	2; 3; 5; 6; 7; 8; 9; 10;12; 14; 17; 18-19; 20; 22; 26; 21; 23-24; 27; 30; 31; 32; 33; 34;
58,5	35-36; 39-40; 16; 37

### 5.3.3.3.2 Purifikace PCR produktů

#### Purifikace pomocí QIAquick PCR Purification Kitu

Tato metoda přečištění PCR produktů určených k sekvenaci byla v porovnání s další uvedenou purifikační technikou využita podstatně méně často. Provedení bylo zcela dle doporučeného postupu.

1. K 10 µl PCR produktu přidat 50 µl PB pufru, protřepat.
2. Vzorek přenést na QIAquick kolonku umístěnou v 2 ml mikrozkuhavce a centrifugovat při 12 000 rpm 60 s.
3. Obsah mikrozkuhavky vylít a kolonku do ní opět umístit.
4. Do kolonky napipetovat 750 µl PE pufru, centrifugovat při 12 000 rpm 60 s.
5. Obsah mikrozkuhavky vylít, kolonku zpět vložit a opět centrifugovat 60 s při 12 000 rpm.
6. Kolonku přemístit do 1,5 ml mikrozkuhavky, do středu kolonky přidat 50 µl EB pufru
7. a centrifugovat při 12 000 rpm 60 s, poté kolonku odstranit a mikrozkuhavku uzavřít.

#### Purifikace PCR produktů enzymaticky

1. K 5 µl PCR produktu přidat 1 µl termosenzitivní alkalické fosfatázy (Thermo Scientific, Fermentas) o koncentraci 1 U/µl a následně připipetovat 0,5 µl exonukleázy I (Thermo Scientific, Fermentas) o koncentraci 20 U/µl.
2. Roztok jemně promíchat.
3. Inkubovat v termocycleru při 37 °C /15 min a poté deaktivovat enzym při 85°C /15 min.

### 5.3.3.3.3 Sekvenační reakce

Při Sangerovém sekvenování byl používán sekvenační kit ABI PRISM<sup>®</sup> Big Dye<sup>®</sup> Terminator v 3.1, který obsahoval 4 typy různě fluorescenčně značených dideoxynukleotidtrifosfátů (ddNTPs). Pro sekvenaci byly využívány 2 varianty sekvenačních reakcí. Varianta, v níž byl sekvenační kit ředěn sekvenačním pufr (ABI PRISM<sup>®</sup> Big Dye<sup>®</sup> Terminator v 1.1, v 3.1, 5x sekvenační pufr) v poměru 1 : 3 byla postupně nahrazena strategií výraznějšího ředění (256krát sekvenačního kitu).

Varianta I:

Reakční směs pro sekvenaci (10 µl) obsahovala:

- 4 µl 4x zředěného sekvenačního kitu
- 2 µl 10 pmol primeru (v jednotlivých sekvenačních reakcích je vždy pouze jeden primer ze specifického páru)
- 4 µl templátu (jednotlivé přečištěné PCR produkty)

Varianta II:

Reakční směs pro sekvenaci (10 µl) obsahovala:

- 1,5 µl Big Dye<sup>®</sup> Terminator v 1.1, v 3.1, 5x sekvenační pufr (Applied Biosystems)
- 0,969 µl enhancing sekvenační pufr BDX64 (MCLAB)
- 0,031 µl Big Dye<sup>®</sup> Terminator v 3.1 kit (Applied Biosystems)
- 4,5 µl PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio)
- 1 µl 10 pmol primeru (r nebo f primer)
- 2µl templátu (jednotlivé přečištěné PCR produkty)

Podmínky amplifikace:

94,0 °C 2 min (96,0 °C 10 s; 1,0 °C/s – 50,0 °C; 50,0 °C 5 s; 60,0 °C 4 min) <sub>34x</sub> 10,0 °C

### 5.3.3.3.4 Purifikace sekvenačních produktů

K purifikaci sekvenačních produktů byly využity dva různé postupy. Vzhledem k menší pracnosti a nižší časové náročnosti, bylo přečištění pomocí kitu využíváno častěji.

Purifikace sekvenačních produktů pomocí roztoku CH<sub>3</sub>COONa/EDTA:

1. K 10 µl sekvenačního produktu přidat 2 µl roztoku CH<sub>3</sub>COONa/EDTA

2. Přidat 25  $\mu$ l absolutního ethanolu, roztok důkladně promíchat a centrifugovat 30 min při 13 000 rpm.
3. Opatrně odpipetovat supernatant.
4. Přidat 50  $\mu$ l 80% ethanolu a centrifugovat 10 min při 13 000 rpm.
5. Pečlivě odpipetovat supernatant.
6. Opakovat krok 4 a 5.
7. Otevřené mikrozkušavky dát vysoušet do trouby po dobu 10 min při 60 °C.
8. Připipetovat 15  $\mu$ l formamidu, ponechat v klidu alespoň 5 min a poté roztok protřepat.

Příprava roztoku  $\text{CH}_3\text{COONa}$  /EDTA:

Smísením 1,5 M  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (pH > 8) s 0,25 M EDTA v poměru 1:1,3.

#### Purifikace sekvenačních produktů kitem BigDye® XTerminator™

1. K 5  $\mu$ l sekvenačního produktu napipetovat 22,5  $\mu$ l roztoku SAM™ (Applied Biosystems).
2. Pomocí špičky s otvorem o průměru alespoň 1 mm přidat 5  $\mu$ l roztoku BigDye® XTerminator™ (Applied Biosystems).
3. Mikrozkušavky či destičku se vzorky pečlivě uzavřít, umístit na třepačku, zakrýt alobalem a ponechat důkladně míchat 30 min.
4. Centrifugovat destičku či mikrozkušavky 2 min při 1000 xg.

#### **5.3.3.3.5 Separace sekvenačních produktů kapilární elektroforézou**

1. Přečištěné sekvenační produkty napipetovat po 10 10  $\mu$ l do destičky.
2. Jestliže byly produkty sekvenační reakce přečišťovány pomocí roztoku  $\text{CH}_3\text{COONa}$ /EDTA, je nutné je před vlastní separací denaturovat 3 min při 95 °C a následně ochladit na ledu. Pokud byly přečišťovány prostřednictvím kitu BigDye® XTerminator™ denaturace vzorků se neprovádí.
3. Umístit destičku do genetického analyzátoru 3130 (Applied Biosystems) a spustit separaci při podmínkách: nástřik vzorku 30 s, 2 kV a vlastní separace 60 °C; 13,2 kV; 33 min.

#### **5.3.3.4 Masivní paralelní sekvenování (MPS) - platforma Ion Torrent**

Knihovna byla navržena doc. Mgr. Radkem Vodičkou, Ph.D a aplikačními specialisty prostřednictvím programu AmpliSeq Designer (ThermoFisher Scientific) tak, že 3x primer pool

zajistil plné pokrytí všech 23 exonů TSC1 a 42 exonů TSC2 genu a rovněž oblastí intron/exonového rozhraní.

Postup MPS – Ion Torrent byl proveden zcela v souladu s doporučenými postupy. Přednostně byly používány zkrácené verze postupu. K případnému upřesnění informací sloužily detailní verze postupů.

Použité protokoly:

1. Ion AmpliSeq™ Library Preparation (Pub. no. MAN0006735) a zkrácená verze postupu MAN0007524, Rev. 3). S ohledem na počet páru primerů/pool (49-96) byl při amplifikaci nastaven počet cyklů na 19.
2. Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit (Pub. no. MAN0010902) a jeho zkrácená verze (Cat. no. A27739, Pub. no. MAN0010903, Rev. A.0).
3. Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit (Cat. no. A25592, Pub. no. MAN0009816, Rev. C.0).

Použitý přístroj: Ion PGM™ system

Nález mutace metodou MPS byl vždy potvrzen Sangerovým sekvenováním.

### 5.3.3.5 Analýza sekvenčních dat

Při Sangerově metodě sekvenování s využitím genetického analyzátoru 3130 byl za tvorbu hrubých dat zodpovědný software Data Collection (Applied Biosystems). Výstupní sekvenční data byla analyzována pomocí softwaru Gen Scan Analysis a SeqScanner. V rámci strategie MPS-Ion Torrent byly získaná data hodnocena prostřednictvím několika softwarů: Ion Reporter™, Integrative Genomics Viewer - Illumina (IGV), Illumina Variant Studio a NextGENe.

Při sekvenační analýze byly využívány NCBI referenční sekvence: genomická sekvence TSC1 genu NG\_012386.1 a sekvence pro jeho transkript NM\_000368.4, pro gen TSC2 genomická sekvence NG\_005895.1 a pro jeho transkript NM\_000548.3. Na základě povah zachycených sekvenčních variant, údajů v TSC1/TSC2 LOVD (Leiden open variantion database) bylo rozhodnuto, zda se jedná o mutace. U záměnových variant nejasného významu se patogenicita posuzovala pomocí predikčních programů SIFT a PolyPhen2 a dále bylo cíleným genetickým testováním rodinných příslušníků pacienta sledováno, zda varianta koreluje s výskytem onemocnění v rodině, a že není přítomna u zdravých jedinců.

Konfirmace identifikovaných mutací byla prováděna Sangerovým sekvenováním na DNA vzorcích z nezávislého odběru. Pokud se identifikovaná mutace vyskytovala ve formě mozaiky ve vzorku DNA izolované z krve a pacient byl ochotný poskytnout další vzorky biologického



materiálu (např. bukalní stěr, moč), byla pro potvrzení nálezu provedená cílená sekvenční analýza i u těchto vzorků.

### **5.3.3.6 Statistické zpracování dat**

Pro statistické posouzení rozdílů v četnosti záchytu sledovaných TSC znaků onemocnění mezi pacienty s mutacemi TSC1 a TSC2 genu bylo pracováno s údaji: přítomen znak, nepřítomen znak a není k dispozici údaj o vyšetření daného orgánu či tkáně. Statisticky významný rozdíl byl vyjádřen hodnotou  $p < 0,05$ , hodnota  $p$  kolem 0,1 byla v takto malých skupinách TSC pacientů považována za efekt na hraně významnosti.

Jelikož nejvyšší různorodost TSC projevů je spjata s CNS a kůží, byly pro tyto tkáně sestaveny i souhrnné ukazatele postižení, které představovaly prostý součet počtů různých postižení v dané tkáni. Ve tkáních, kde se TSC může manifestovat 2 odlišnými znaky (v ledvinách, sítnici a v ústní dutině) souhrnný indikátor postižení vyjadřoval pouze záchyt jakéhokoliv TSC znaku v příslušném orgánu. Při tvorbě souhrnných indikátorů postižení tkání se vycházelo pouze z údajů o přítomnosti či nepřítomnosti znaku, přičemž u pacientů s chybějícími údaji o klinickém stavu TSC asociované tkáně se předpokládalo, že postižení není přítomno.

Pro posouzení vzájemného vztahu mezi konkrétními TSC znaky byla využita neparametrická Spearmanova korelace.

## 6. Výsledky

### 6.1 Výsledky analýzy TSC genů

#### 6.1.1 Analýza TSC genů probandů

Ve skupině 99 probandů bylo identifikováno přibližně 3krát více mutací v genu TSC2 (75 mutací) než v genu TSC1 (24 mutací). Sporadický výskyt zastupovalo 40 osob, 17 jedinců představovalo familiární formu výskytu a u 42 postižených nebylo možno tento údaj stanovit.

Téměř každý proband byl nositelem jiné mutace, pouze 6 různých mutací se vyskytovalo u více probandů. Opakovaně byly mezi nepříbuznými jedinci zachyceny tyto TSC2 mutace: c.1832G>A u dvou probandů, c.5227C>T u tří, c.5024C>T u dvou, c.1372C>T u dvou, delece 1. až 16. exonu u dvou a delece celého TSC2 genu u tří probandů.

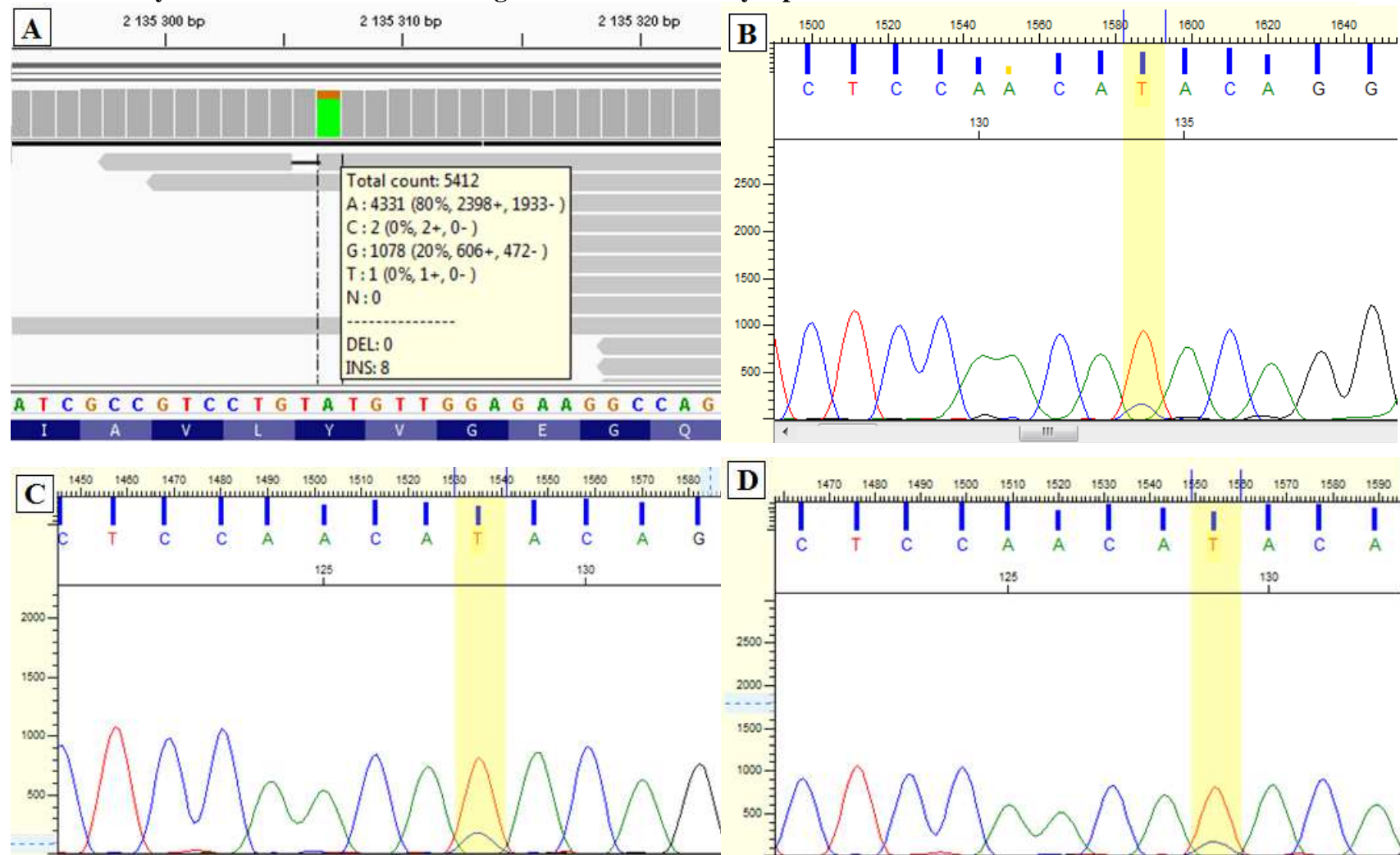
U 4 pacientů (vzorky 244/10, 1800/13, 1275/10, D28/14) byla odhalená mutace ve formě mozaiky. Zastoupení mutované alely v DNA vzorcích izolovaných z periferní krve u výše zmíněných vzorků bylo přibližně 15% – 25%, 20%, 20% - 30%; 30%. Nález TSC2 mutace v různých tkáních pacienta 1800/13 je zaznamenáno na obr. 3.

Syndrom přilehlých genů (TSC2/PKD1) byl zjištěn u 4 probandů. Delece TSC2 genu zasahující do terminální oblasti sousedního genu PKD1 je ukázána na obr. 4. a obr. 5. Spektrum mutací nalezených v TSC1 a v TSC2 genech ve skupině probandů je zachyceno v grafu 1 a grafu 2.

#### 6.1.2 Souhrnné výsledky analýzy TSC genů ve sledovaném souboru pacientů

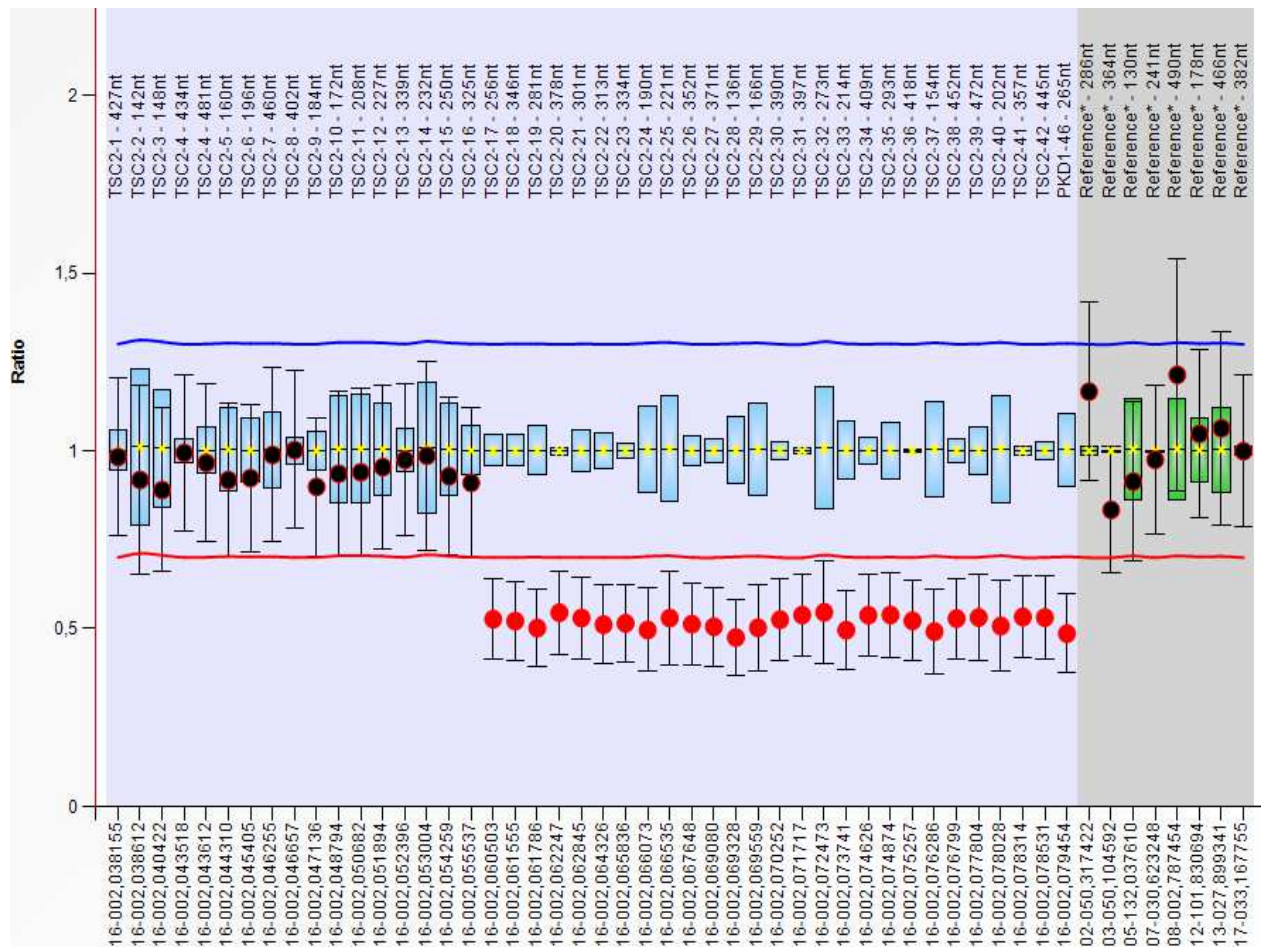
Zastoupení jednotlivých typů mutací v celém souboru pacientů (118 osob) je znázorněno v grafu 3. Zatímco v genu TSC2 byla nalezena pestrá škála typů mutací, v genu TSC1 převládaly nesmyslné mutace. Rozsáhlé a in frame delece nebyly v genu TSC1 vůbec zastoupeny. Přehled nalezených mutací, včetně informace o záznamu v databázi (LOVD TSC1/TSC2) je uveden v souhrnné tabulce (tab. 7). Tato tabulka kromě popisu mutací probandů již obsahuje i seznam a výsledky cílené analýzy TSC genů u 19 rodinných příslušníků některých probandů, kteří byly zahrnuti do studie fenotyp/genotypové korelace. Celkem bylo zjištěno 87 mutací v genu TSC2 a 31 mutací v genu TSC1. Poměr zachycených mutací TSC2:TSC1 byl 2,8:1. Šest případů delecí postihujících TSC2 gen a zároveň PKD1 gen jsou započítány k TSC2 mutacím. Mezi odhalenými mutacemi bylo 27 sekvenčních variant, jež dosud (květen 2016) nebyly popsány v LOVD TSC1/TSC2. Přestože nebyla provedena funkční analýza, lze na základě povah (vlivu na proteinovou strukturu) jednotlivých variant předpokládat, že se pravděpodobně jedná o kauzální mutace.

**Obr. 3: Záchyt mutace c.4646A>G v TSC2 genu ve formě mozaiky u pacienta 1800/13**



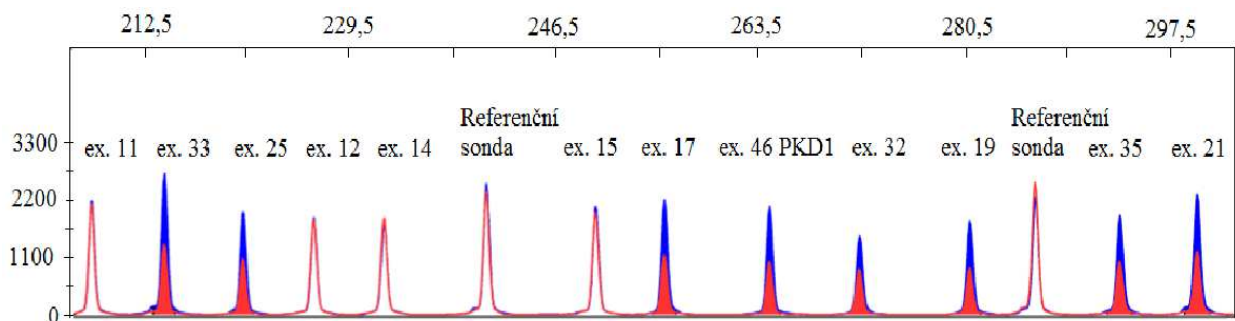
**A:** 20% záchyt mutované alely pomocí MPS-Ion Torrent ve vzorku DNA izolované z periferní krve, hodnoceno softwarem IGV,  
**B:** Přibližně 20% záchyt mutované alely prostřednictvím Sangerova sekvenování (r – řetězec) v DNA izolované z krve.  
 Přibližně 25% výskyt mutované alely Sangerovým sekvenováním (r – řetězec) v DNA z buněk močového sedimentu (C) a buklálního stěru (D).

**Obr. 4: Delece 17. až 42. exonu TSC2 genu a 46. exonu PKD1 genu u pacienta D1439/14**



Použitý MLPA TSC2 probemix: P046-C1 (lot 0315), použitý software: Coffalyser

**Obr. 5: Část výsledného MLPA elektroforetogramu zachycující rozsáhlou delecí TSC2/PKD1 genu u pacienta D1439/14**

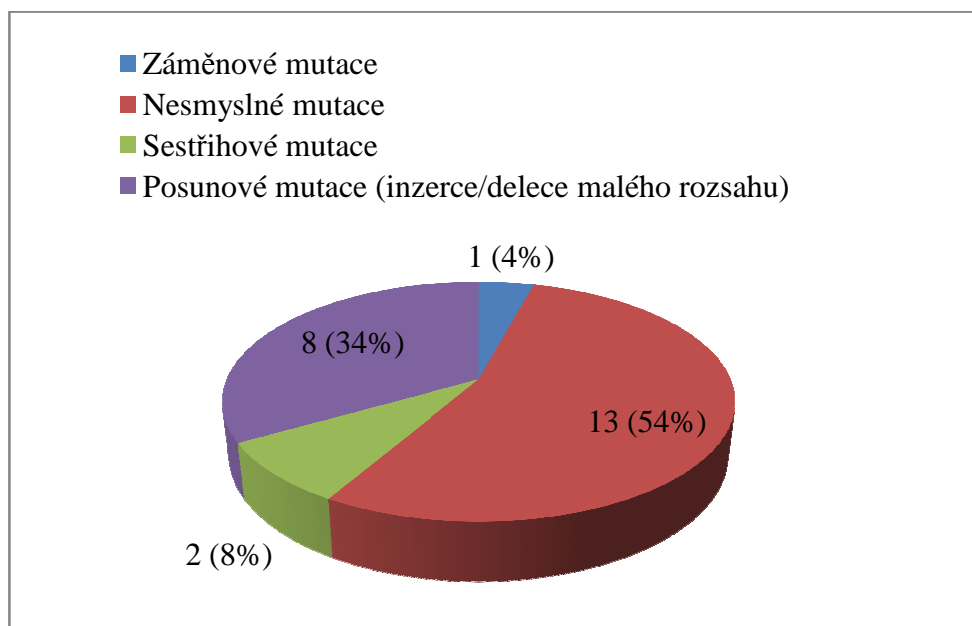


Modrý signál fluorescence: vzorek DNA negativní kontroly.

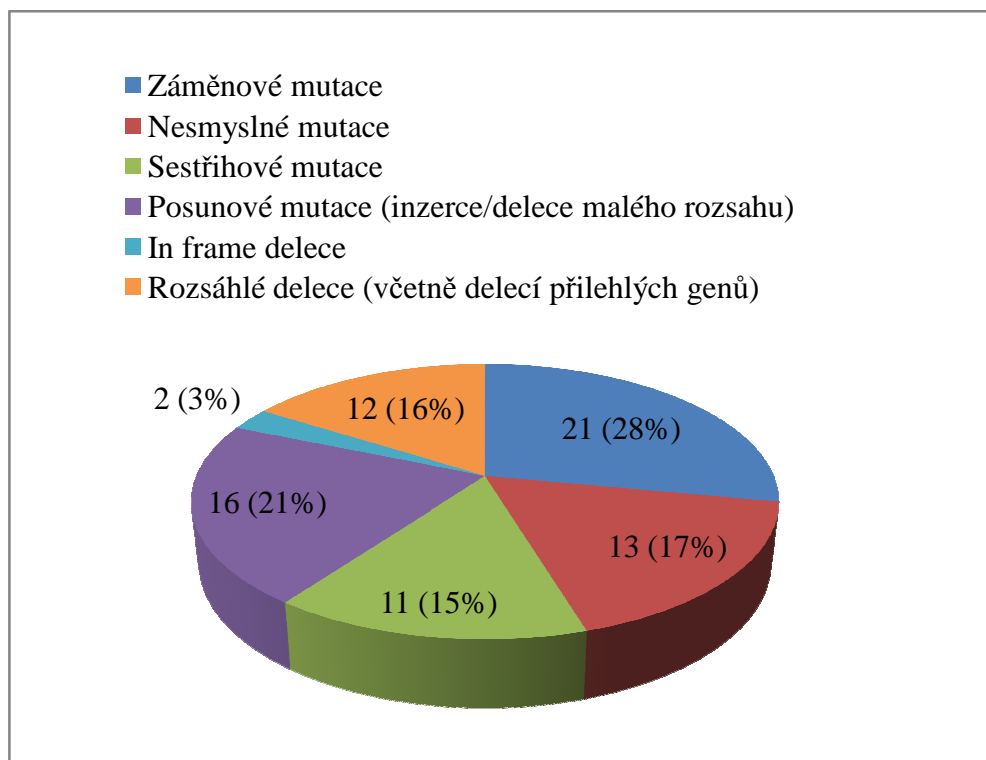
Červený signál fluorescence: vzorek DNA pacienta D1439/14.

Deletované exony: 33, 25, 17, 32, 19, 35, 21 TSC2 genu a exon 46 PKD1 genu.

**Graf 1: Spektrum mutací TSC1 genu nalezených ve skupině probandů**



**Graf 2: Spektrum mutací TSC2 genu nalezených ve skupině probandů**



**Tab. 7: Nalezené mutace ve vyšetřovaném souboru TSC pacientů (118 osob)**

Číslo vzorku pacienta	Nalezená mutace, zápis dle kódující DNA (TSC1 NM_000368.4, TSC2 NM_000548.3)	Vliv mutace na protein	Zasažený gen	Zasažený exon	Zápis v LOVD TSC1/TSC2
13/09	c.1832G>A	p.Arg611Gln	TSC2	17	ano
130/09	delece exonu 36 (c.4570-?_4662+?del)	p.?	TSC2	36	ne
347/09	c.600-2A>T	vliv na sestřih	TSC2	7	ne
408/09	c.3401del	p.Gly1134Alafs*57	TSC2	29	ano
598/09	c.989dup	p.Ser331Glufs*10	TSC1	10	ano
659/09	c.1832G>A	p.Arg611Gln	TSC2	17	ano
1231/09	c.1760_1761del	p.Tyr587*	TSC2	17	ano
1435/09	c.4758_4759insG	p.Cys1587Valfs*16	TSC2	37	ne
244/10	c.715del	p.Asp239Thrfs*12	TSC1	8	ne
312/10	c.962delC	p.Pro321Hisfs*42	TSC2	10	ne
438/10	c.665T>A	p.Leu222Gln	TSC2	8	ne
501/07-RP	c.665T>A,	p.Leu222Gln	TSC2	8	ne
1800/13	c.4646A>G	p.Tyr1549Cys	TSC2	36	ano
755/10	c.5227C>T	p.Arg1743Trp	TSC2	41	ano
789/10	c.4378_4394dup (c.4394_4395ins17)	p.Asp1465Glufs*17	TSC2	34	ne
850/10	c.4375C>T	p.Arg1459*	TSC2	34	ano
866/10	c.4421dupG (c.4421_4422insG)	p.Val1475Serfs*49	TSC2	34	ne
938/10	c.2837+1G>T	vliv na sestřih	TSC2	25	ano
1033/10	c.2328C>G	p.Tyr776*	TSC2	21	ne
1077/10	c.5227C>T	p.Arg1743Trp	TSC2	41	ano
1124/10	c.4842_4844del	p.Ile1614del	TSC2	37	ano
1246/10	c.733C>T	p.Arg245*	TSC1	8	ano
1274/10	c.2251C>T	p.Arg751*	TSC2	21	ano
1275/10-RP	c.2251C>T	p.Arg751*	TSC2	21	ano
1460/10	c.2560del	p.Val854Phefs*24	TSC1	20	ne

**Pokračování tab. 7: Nalezené mutace ve vyšetřovaném souboru TSC pacientů**

Číslo vzorku pacienta	Nalezená mutace, zápis dle kódující DNA (TSC1 NM_000368.4, TSC2 NM_000548.3)	Vliv mutace na protein	Zasažený gen	Zasažený exon	Zápis v LOVD TSC1/TSC2
83/11	c.2074C>T	p.Arg692*	TSC1	17	ano
265/11	c.1888_1891del	p.Lys630Glnfs*22	TSC1	15	ano
266/11	delece 1. až 15. exonu (c.-29-?_1599+?del)	p.?	TSC2	1 až 15	ano
267/11	c.5180_5189del	p.His1727Profs*96	TSC2	41	ne
295/11	c.1708_1709del	p.Arg570Glyfs*17	TSC1	15	ano
527/11	c.5228G>A	p.Arg1743Gln	TSC2	41	ano
586/11-RP	c.-29-?_*102+?del (s přesahem do PKD1)	p.?	TSC2/PKD1	1 až 42	ano
435/03	c.-29-?_*102+?del (s přesahem do PKD1)	p.?	TSC2/PKD1	1 až 42	ano
699/11	c.913+1G>A	vliv na sestřih	TSC1	9	ano
900/11	c.488C>A	p.Ser163*	TSC1	6	ne
1173/11-RP	c.488C>A	p.Ser163*	TSC1	6	ne
1174/11-RP	c.488C>A	p.Ser163*	TSC1	6	ne
596/11-RP	c.488C>A	p.Ser163*	TSC1	6	ne
702/11	c.3203C>T	p.Thr1068Ile	TSC2	28	ano
746/11	c.211-1G>T	vliv na sestřih	TSC1	5	ano
837/11	c.647T>C	p.Phe216Ser	TSC1	7	ano
896/11	c.2724del	p.Phe908Leufs*40	TSC2	24	ne
903/11	c.-29-?_*102+?del (s přesahem do PKD1)	p.?	TSC2/PKD1	1 až 42	ano
465/08	delece exonu 3 (c.139-?_225+?del)	p.?	TSC2	3	ano
1018/11	c.2356C>T	p.Arg786*	TSC1	18	ano
1067/11	delece 1. až 4. exonu (c.-29-?_336+?del)	p.?	TSC2	1 až 4	ano
1314/11	c.4929C>G	p.Asn1643Lys	TSC2	38	ano
1384/11	c.2713C>T	p.Arg905Trp	TSC2	24	ano
1400/11	c.1460delC	p.Ser487Leufs*45	TSC1	15	ne

**Pokračování tab. 7: Nalezené mutace ve vyšetřovaném souboru TSC pacientů**

<b>Číslo vzorku pacienta</b>	<b>Nalezená mutace, zápis dle kódující DNA (TSC1 NM_000368.4, TSC2 NM_000548.3)</b>	<b>Vliv mutace na protein</b>	<b>Zasažený gen</b>	<b>Zasažený exon</b>	<b>Zápis v LOVD TSC1/TSC2</b>
1651/11-RP	c.2656A>T	p.Lys886*	TSC1	21	ano
1650/11	c.2656A>T	p.Lys886*	TSC1	21	ano
1761/11	c.341dup (c.341_342insC)	p.Ser115Phefs*11	TSC1	5	ne
1858/11	c.4493G>T	p.Ser1498Ile, sesřih?	TSC2	34	ne
1937/11	c.4660C>T	p.Gln1554*	TSC2	36	ano
D26/12	c.4493+1G>C	vliv na sestřih	TSC2	34	ne
D268/12	c.1431_1434del	p.Glu478Lysfs*53	TSC1	14	ano
D660/12-RP	c.1431_1434del	p.Glu478Lysfs*53	TSC1	14	ano
D444/12	c.337-1G>C	vliv na sestřih	TSC2	5	ano
D454/12	c.133_136del	p.Leu45Glu*3	TSC2	2	ano
D583/12	c.1987del	p.Leu663Phefs*35	TSC2	19	ano
D959/12	c.4761C>A	p.Cys1587*	TSC2	37	ano
D969/12	c.5024C>T	p.Pro1675Leu	TSC2	39	ano
D1171/12	c.5227C>T	p.Arg1743Trp	TSC2	41	ano
1105/08-RP	c.1372C>T	p.Arg458*	TSC2	14	ano
D1311/12	c.1372C>T	p.Arg458*	TSC2	14	ano
D1597/12	delece 1. až 9. exonu (c.-29-?_848+?del)	p.?	TSC2	1 až 9	ano
D457/13	c.5024C>T	p.Pro1675Leu	TSC2	39	ano
D499/13	c.2293C>T	p.Gln765*	TSC1	18	ano
D689/13	c.4242dup (c.4242_4243insT)	p.Lys1415*	TSC2	34	ne
D693/13	c.4850-1_4861del	vliv na sestřih	TSC2	38	ne
D749/13	c.4861A>T	p.Ile1621Phe	TSC2	38	ne
D825/13-PR	c.4861A>T	p.Ile1621Phe	TSC2	38	ne
D830/13	c.570C>G	p.Tyr190*	TSC2	6	ano



**Pokračování tab. 7: Nalezené mutace ve vyšetřovaném souboru TSC pacientů**

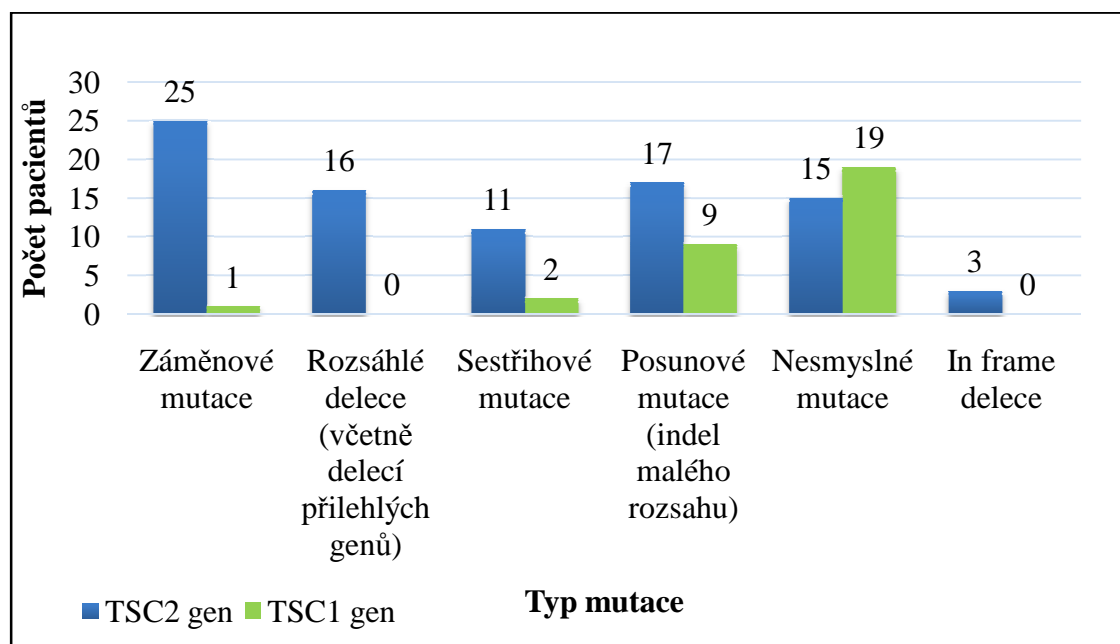
Číslo vzorku pacienta	Nalezená mutace, zápis dle kódující DNA (TSC1 NM_000368.4, TSC2 NM_000548.3)	Vliv mutace na protein	Zasažený gen	Zasažený exon	Zápis v LOVD TSC1/TSC2
D835/13A	c.2283C>A	p.Tyr761*	TSC1	18	ano
D836/13A-RP	c.2283C>A	p.Tyr761*	TSC1	18	ano
D934/13	c.5228_5232dup	p.Arg1745Glyfs*83	TSC2	41	ne
D1226/13	c.2083C>T	p.Gln695*	TSC2	19	ano
D1240/13	delece 1.až 16. exonu (c.-29-?_1716+?del)	p.?	TSC2	1 až 16	ano
D1601/13	c.-29-?_*102+?del (s přesahem do PKD1)	p.?	TSC2/PKD1	1 až 42	ano
D1600/13-RP	c.-29-?_*102+?del (s přesahem do PKD1)	p.?	TSC2/PKD1	1 až 42	ano
D1626/13	c.1027C>T	p.Gln343*	TSC1	10	ano
D1663/13	c.4472_4473del	p.Lys1491Serfs*32	TSC2	34	ano
D1895/13	c.733C>T	p.Arg245*	TSC1	8	ano
D1939/13	c.2743-2A>G	vliv na sestřih	TSC2	25	ano
D2082/13	c.1385G>A	p.Arg462His	TSC2	14	ano
D21/14	c.1487_1488insA	p.Glu498Argfs*3	TSC2	15	ne
D28/14	c.1082T>C	p.Leu361Pro	TSC2	11	ano
D48/14	c.2074G>T	p.Val692Phe	TSC2	19	ne
D49/14-RP	c.2074G>T	p.Val692Phe	TSC2	19	ne
581/06-RP	c.2074G>T	p.Val692Phe	TSC2	19	ne
D329/14	c.4849+1G>A	vliv na sestřih	TSC2	37	ano
D223/14	delece 1. až 16. exonu (c.-29-?_1716+?del)	p.?	TSC2	1 až 16	ano
D225/14-RP	delece 1. až 16. exonu (c.-29-?_1716+?del)	p.?	TSC2	1 až 16	ano
D581/14-RP	delece 1. až 16. exonu (c.-29-?_1716+?del)	p.?	TSC2	1 až 16	ano
D403/14	c.2525del	p.Pro842Hisfs*52	TSC2	22	ano
D406/14	c.3147_3148insAG (c.3146_3147dup)	p.Phe1050Serfs*4	TSC2	28	ne
D655/14	c.1525C>T	p.Arg509*	TSC1	15	ano

**Pokračování tab. 7: Nalezené mutace ve vyšetřovaném souboru TSC pacientů**

Číslo vzorku pacienta	Nalezená mutace, zápis dle kódující DNA (TSC1 NM_000368.4, TSC2 NM_000548.3)	Vliv mutace na protein	Zasažený gen	Zasažený exon	Zápis v LOVD TSC1/TSC2
D827/14	c.5238_5255del	p.His1746_Arg1751del	TSC2	41	ano
D826/14-RP	c.5238_5255del	p.His1746_Arg1751del	TSC2	41	ano
D886/14	c.3598C>T	p.Arg1200Trp	TSC2	30	ano
D941/14	c.5161-1G>A	vliv na sestřih	TSC2	41	ano
D1179/14	c.1831C>T	p.Arg611Trp	TSC2	17	ano
D1439/14	c.1717-?_*102+?del (s přesahem do PKD1)	p.?	TSC2/PKD1	17 až 42	ano
D1677/14	c.1947-1G>A	vliv na sestřih	TSC2	19	ano
D1902/14	c.976-3C>G	vliv na sestřih	TSC2	11	ano
D2033/14	c.4606C>T	p.Gln1536*	TSC2	36	ano
D4/15	delece 3. až 16. exonu (c.139-?_1716+?del)	p.?	TSC2	3 až 16	ne
D571/15	c.4993C>T	p.Gln1665*	TSC2	39	ano
464/08	c.2098-2A>T	vliv na sestřih	TSC2	20	ne
261/99-RP	c.3693_3696del	p.Ser1232Thrfs*92	TSC2	31	ano
262/99	c.3693_3696del	p.Ser1232Thrfs*92	TSC2	31	ano
40/04	c.1498C>T	p.Arg500*	TSC1	15	ano
1126/07	c.2356C>T	p.Arg786*	TSC1	18	ano
695/07	c.1372C>T	p.Arg458*	TSC2	14	ano
D2136/13	c.4603G>T	p.Asp1535Tyr	TSC2	36	ano
4/09	c.5401_5424+*9del,c.5400_5401insAAGT	p.?	TSC2	42	ne
117/98	c.2111_2112del	p.Tyr704*	TSC1	17	ano
115/98-RP	c.2111_2112del	p.Tyr704*	TSC1	17	ano

**Vysvětlivky:** TSC probandi jsou značeni pouze číslem, rodinní příslušníci probandů nesou za číslem vzorku zkratku RP. Pod sebou umístěná políčka s šedým pozadím reprezentují příslušnou rodinu. Oproti původnímu číslování exonů (1 až 41) TSC2 genu (uvedeno v LOVD TSC2), je v této tabulce použito aktuální číslování exonů (1 až 42) TSC2 genu dle referenčních sekvencí (genomické NG\_005895.1, transkriptu NM\_000548.3).

**Graf 3: Zastoupení jednotlivých typů mutací v TSC genech v celém souboru pacientů**



## 6.2 Výsledky fenotyp/genotypové korelace

### 6.2.1 Fenotyp pacienta, věk a forma výskytu TSC ve vztahu k TSC1/TSC2 genu

Na základě vyplněných registračních formulářů indikujícím lékařem pacienta byla vytvořena rozsáhlá tabulka (tab. 2 v příloze 2), v níž jsou uvedeny konkrétní pozitivní a negativní nálezy v TSC asociovaných orgánech a tkáních u 118 osob a zároveň je zmíněno, které oblasti těla nebyly vyšetřeny. Dále je v tabulce zahrnuta informace o věku pacienta v době vyplnění registračního formuláře, zda se jednalo o sporadický či familiární případ, a zda byla stanovená definitivní či možná diagnóza TSC.

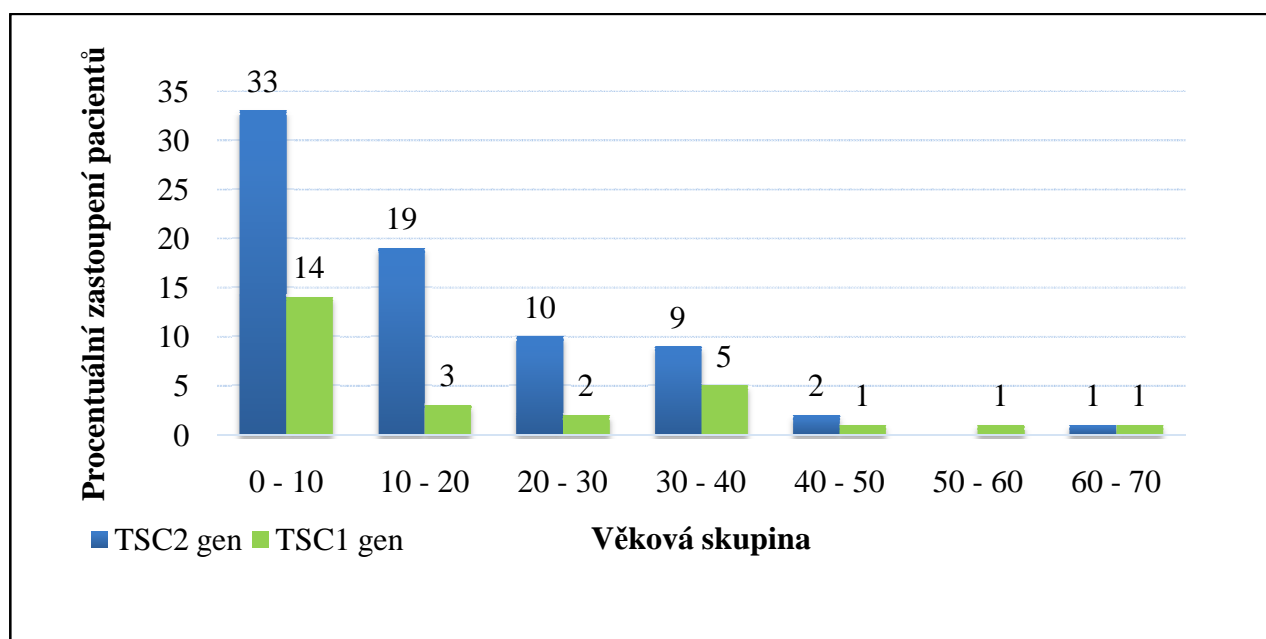
Celkem 117 pacientů splňovalo diagnostická kritéria TSC. Jak u pacientů s TSC1, tak s TSC2 mutacemi byla častěji diagnostikována definitivní TSC. Forma výskytu onemocnění byla stanovena pouze u 76 osob, přičemž poměr zastoupení sporadických ku familiárním případům se mezi skupinou TSC1 a TSC2 výrazně nelišil. V rámci TSC2 skupiny mírně převažovaly *de novo* případy. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce (tab. 8).

**Tab. 8: Stanovená diagnóza a forma výskytu TSC**

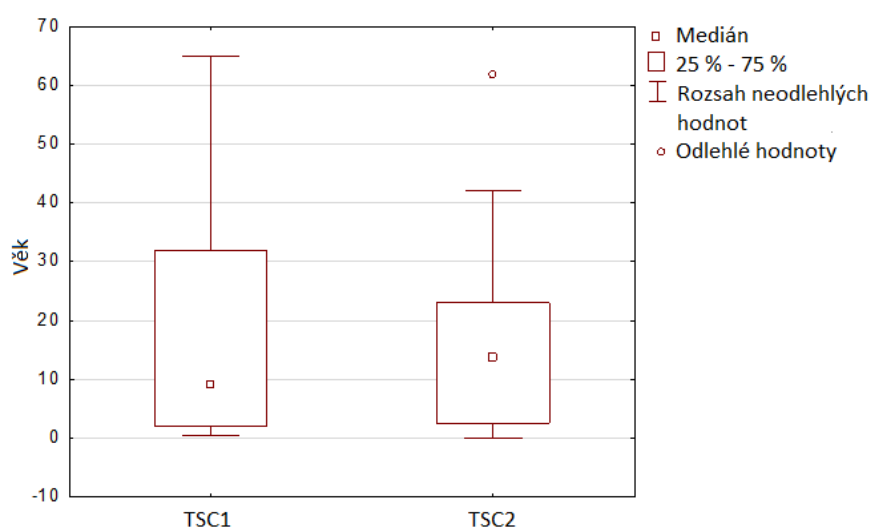
Gen	Forma výskytu TSC		Diagnóza TSC	
	Sporadická	Familiární	Možná	Definitivní
TSC2	32	24	19	68
TSC1	8	12	3	27
Celkem	40	36	22	95

Nejmladší pacient ze sledovaného souboru byl 2 dny starý, nejstaršímu bylo 65 let. Zastoupení věkových skupin u pacientů s TSC1 a TSC2 mutacemi je zobrazeno v grafu 4. Krabicový graf 5 zachycuje statisticky nevýznamný rozdíl ( $p = 0,6686$ ) ve věku mezi jedinci s mutacemi genu TSC1 a nositeli TSC2 mutací. Naopak při porovnání věku v závislosti na formě výskytu onemocnění (graf 6) byl pozorován statisticky významný rozdíl ( $p = 0,0003$ ), neboť pacienti reprezentující sporadickou formu výskytu TSC byly výrazně mladší než familiární případy.

**Graf 4: Věková distribuce pacientů ve vyšetřovaném souboru**



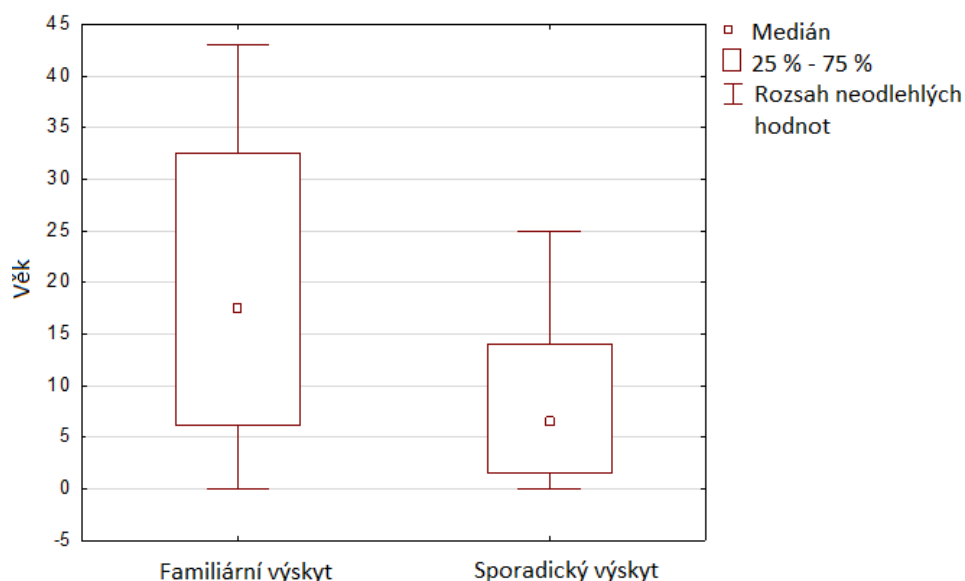
**Graf 5: Věk pacientů vzhledem k zasaženému TSC genu**



Skupina pacientů s TSC1 mutacemi: medián 9,1

Skupina pacientů s TSC2 mutacemi: medián 14

**Graf 6: Věk pacientů vzhledem k formě výskytu TS**



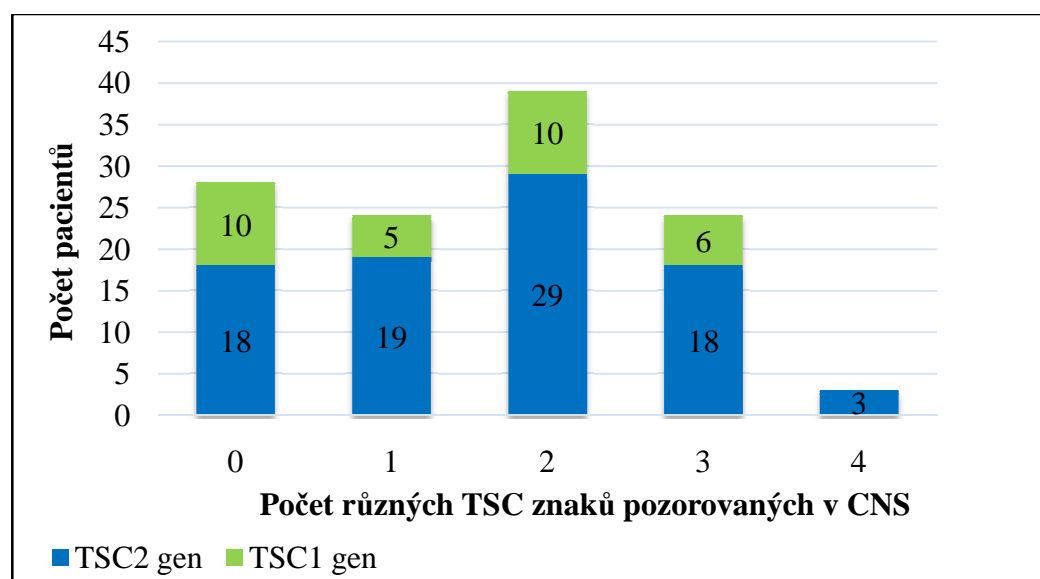
Skupina pacientů s familiární formou výskytu TSC: medián 17,5

Skupina pacientů se sporadickou formou výskytu TSC: medián 6,5

### 6.2.1.1 Porovnání zastoupení klinických nálezů mezi skupinou TSC1/2 pacientů

Posuzována byla přítomnost jednotlivých TSC znaků a u některých tkání byla míra poškození vyjádřena i souhrnným ukazatelem. V případě souhrnného ukazatele postižení CNS (graf 7) byly současně zaznamenány až 4 různé TSC znaky u pacientů s TSC2 mutacemi (kortikální tubery, SEN, SEGA a přidružený projev v podobě kalcifikací).

**Graf 7: Souhrnný ukazatel postižení CNS**

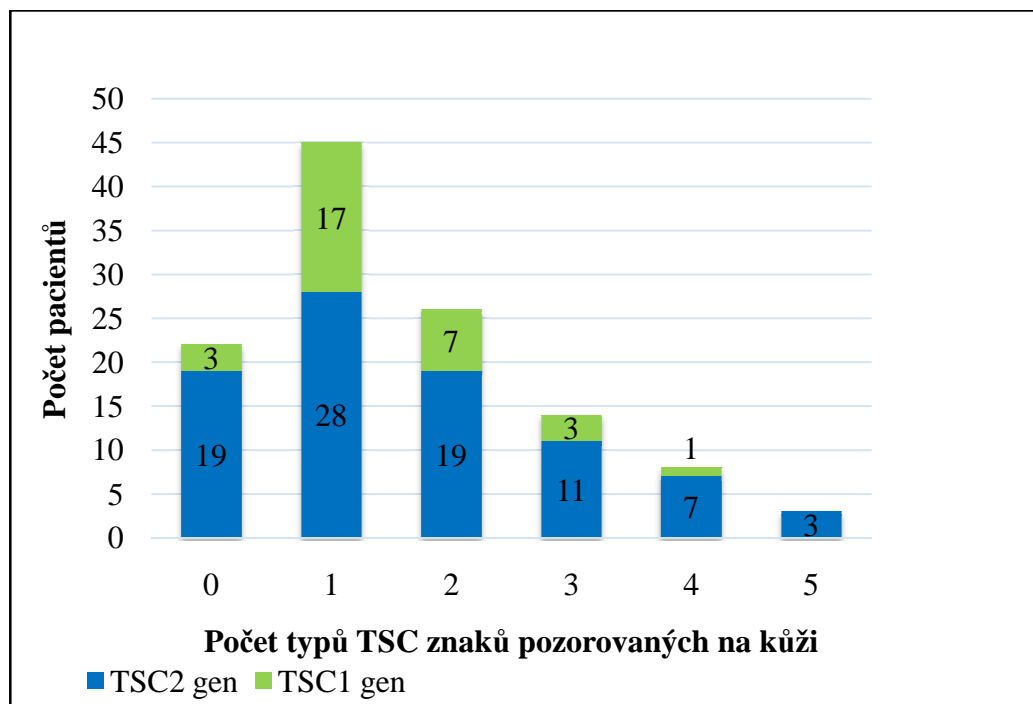


(0) znamená, že žádný TSC znak nebyl pozorován v příslušné tkáni.

U pacientů, kteří neměli provedená vyšetření se předpokládalo, že postižení není přítomno.

Souhrnný ukazatel postižení kůže (graf 8) dokládá, že až pět různých kožních TSC projevů (faciální angiofibromy, hypomelanotické skvrny, fibrózní plaky čela, šagrénové skvrny a unguální fibromy) bylo pozorováno u několika jedinců se zasaženým genem TSC2. Pacienti s TSC1 mutacemi málokdy vykazovali na kůži více než jeden či dva TSC asociované znaky.

**Graf 8: Souhrnný ukazatel postižení kůže**



(0) znamená, že žádný TSC znak nebyl pozorován v příslušné tkáni.

U pacientů, kteří neměli provedená vyšetření se předpokládalo, že postižení není přítomno.

Souhrnný indikátor postižení tkání, ve kterých se TSC může projevit 2 různými znaky (tzn. v ledvinách, sítnici, dutině ústní) vyjadřoval pouze přítomnost jakéhokoliv TSC znaku v příslušném orgánu a jak vyplývá z tab. 9, počet patologických nálezů opět převažoval u TSC2 skupiny pacientů.

**Tab. 9: Souhrnný indikátor postižení sítnice, ledvin a ústní dutiny**

Gen	Souhrnný indikátor postižení tkáně					
	Sítnice_ind. (0)	Sítnice_ind. (1)	Ledviny_ind. (0)	Ledviny_ind. (1)	Ústa_ind. (0)	Ústa_ind. (1)
TSC2	75	12	47	40	80	7
TSC1	30	1	27	4	28	3
Celkem	105	13	74	44	108	10

Indikátory (0): žádný TSC znak nebyl přítomný v příslušné tkáni. U pacientů, kteří neměli provedená vyšetření se předpokládalo, že postižení není přítomno.

Indikátory (1): některý ze dvou (či oba zároveň) TSC znaků typických pro danou tkáň je přítomen.

Celkový záchyt jednotlivých TSC znaků a přidružených projevů onemocnění u vyšetřených pacientů a jejich zastoupení ve skupině pacientů s mutacemi v genu TSC1 a genu TSC2 je shrnut v tab. 10. Hlavní limitací analýzy byly nedostatečné informace o klinickém obrazu některých pacientů, a proto se počty vyšetřených osob pro sledované TSC znaky lišily.

**Tab. 10: Frekvence výskytu TSC znaků a přidružených projevů**

<b>Znaky TSC + přidružené projevy</b>	<b>Celkový záchyt</b>	<b>Záchyt u TSC2 pacientů</b>	<b>Záchyt u TSC1 pacientů</b>
Faciální angiofibromy	55/90 (55,6 %)	44/66 (66,7 %)	11/24 (45,8 %)
Unguální fibromy	17/76 (22,4 %)	13/56 (23,2 %)	4/20 (20,0 %)
Fibrózní plaky čela	19/77 (24,7 %)	17/55 (30,9 %)	2/22 (9,1 %)
Hypomelanotické skvrny	71/94 (75,5 %)	50/67 (74,6 %)	21/27 (77,8 %)
Šagrénová skvrna	24/74 (32,4 %)	18/52 (34,6 %)	6/22 (27,3 %)
Kalcifikace CNS	40/71 (56,4 %)	30/48 (62,5 %)	10/23 (43,5 %)
SEN	63/86 (73,3 %)	48/63 (76,2 %)	15/23 (65,2 %)
SEGA	15/47 (31,9 %)	12/34 (35,3 %)	3/13 (23,1 %)
Kortikální tubery/hamartomy	68/88 (77,3 %)	53/65 (81,5 %)	15/23 (65,2 %)
Depigmentace na sítnici	5/51 (9,8 %)	4/35 (11,4 %)	1/16 (6,3 %)
Fakomy sítnice	10/52 (19,2 %)	10/36 (27,8 %)	0/16 (0 %)
Srdeční rhabdomyom	47/77 (61,0 %)	37/56 (66,1 %)	10/21 (47,6 %)
Angiomyolipomy ledvin	33/67 (49,3 %)	32/49 (65,3 %)	1/18 (5,6 %)
Renální cysty	22/67 (32,8 %)	19/49 (38,8 %)	3/18 (16,7 %)
LAM	3/43 (7,0 %)	3/29 (10,4 %)	0/14 (0 %)
Intraorální fibromy	7/62 (11,3 %)	5/42 (11,9 %)	2/20 (10,0 %)
Jamky zubní skloviny	4/54 (7,4 %)	2/35 (5,7 %)	2/19 (10,5 %)
Epilepsie	75/97 (77,3 %)	52/70 (74,3 %)	23/27 (85,2 %)
Mentální retardace	33/79 (41,8 %)	27/57 (47,4 %)	6/22 (27,3 %)

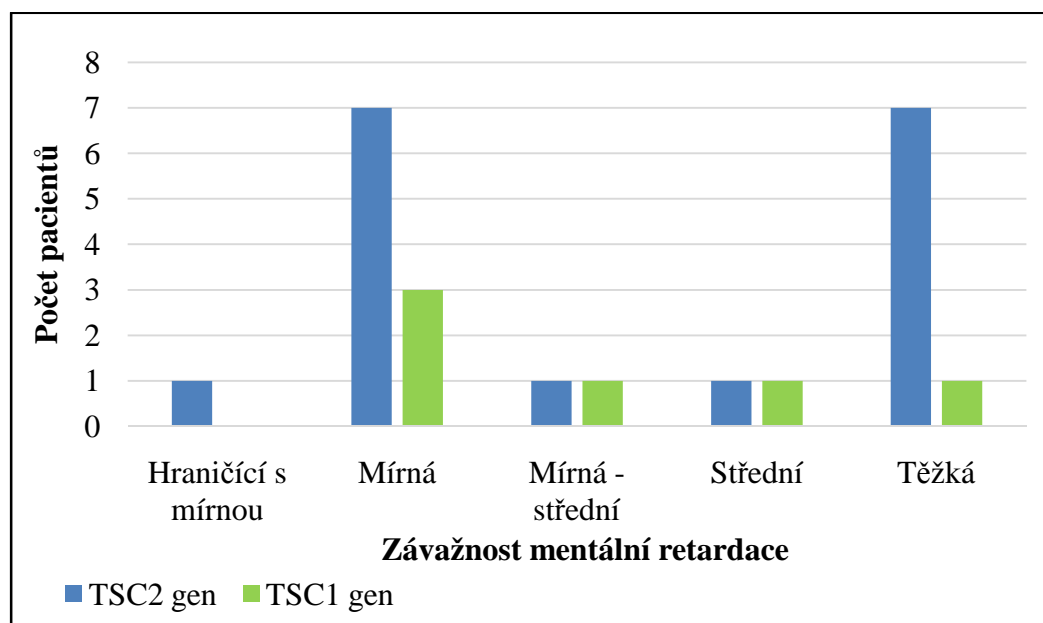
Celkově TSC2 mutace byly spjaty s vyšší četností nálezů TSC znaků u nemocných než TSC1 mutace.

V rámci kožního postižení byl zaznamenán statisticky významný rozdíl u nálezů fibrózních plaků čela mezi jedinci s TSC2 mutacemi a osobami s TSC1 mutacemi.

V případě CNS nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl pro jednotlivé CNS znaky mezi TSC1 a TSC2 skupinou, nicméně pacienti s TSC2 mutacemi měli častěji 2 a více typů postižení mozku oproti jedincům s TSC1 mutacemi (efekt na hraně významnosti). Rovněž efekt na hraně významnosti souvisel s porovnáním prevalence mentální retardace u TSC1 a TSC2 skupiny. Naopak statisticky nevýznamně se jevil rozdíl v záchytu epilepsie.

U 23 z 33 pacientů s mentální retardací byla stanovena její závažnost. Jak je ukázáno v grafu 9, těžká mentální retardace byla diagnostikována téměř výhradně u pacientů s TSC2 mutacemi.

**Graf 9: Závažnost mentální retardace u TSC1 a TSC2 pacientů**



U očních TSC projevů bylo pozorováno, že celkové postižení sítnice (achromatickými skvrnami retiny či hamartomy) je méně časté u nositelů TSC1 mutací. (efekt na hraně významnosti). Konkrétně pro fakomy sítnice byl tento efekt významný ( $p = 0,02$ ).

Efekt na hraně významnosti byl stanoven v důsledku mírně zvýšeného výskytu rhabdomyomu v srdeční tkáni pacientů s TSC2 mutacemi oproti osobám se zasaženým TSC1 genem.

Jednoznačně závažnější postižení ledvin souviselo s TSC2 mutacemi, v případě mnohočetných AML byl efekt velký a statisticky významný ( $p = 0,00005$ ).

Ohledně plicních a intraorálních TSC projevů bylo postižených v obou skupinách velmi málo a tudíž sledování konkrétních trendů/efektů bylo statisticky zavádějící.



### 6.2.1.2 Závažnost postižení TSC v závislosti na formě výskytu mutované alely

Pro prokázání předpokladu, že nositelé mutace ve formě mozaiky mohou mít mírnější fenotypový projev onemocnění než jedinci s „plnou“ formou mutace, svědčil v této studii pouze výsledek porovnání zdravotního stavu 2 členů jedné rodiny. Zatímco u probanda 1274/10 (16 let) s TSC2 mutací c.2251C>T byla prokázána přítomnost mnohočetných renálních AML, hypomelanotických skvrn a faciálních angiofibromů, epilepsie a mentální retardace, u jeho otce 1275/10 (42 let) s 20% - 30% mozaikovou formou mutace se vyskytovaly pouze faciální angiofibromy a subjektivně se cítil zdrav.

Klinické nálezy dalších 3 pacientů s mutacemi ve formě mozaiky nebylo možné s nikým v souboru porovnat, avšak projevy onemocnění zejména u 2 jedinců s TSC2 mutacemi nebyly mírné. Pacientka D1800/13 (35 let) s TSC2 mutací c.4646A>G ve formě 20% - 25% mozaiky vykazovala mnohočetné orgánové postižení (SEN, kortikální tubery, mnohočetné renální AML, LAM, šagrénové a hypomelanotické skvrny). TSC2 mutace c.1082T>C ve formě přibližně 30% mozaiky byla příčinou vzniku rhabdomyomu, SEGA, kortikálních tuberů, AML ledvin, gingiválních fibromů a hypomelanotické skvrny u 8letého pacienta (D28/14). Pacient 244/10 (26 let) představoval jediného zástupce TSC1 mutace v mozaikové formě (15% - 25%) a byl postižen kortikálními tubery, epilepsií a faciálními angiofibromy.

### 6.2.1.3 Variabilita klinických projevů TSC mezi nositeli stejné mutace

Klinické projevy TSC byly variabilní jak mezi členy téže rodiny, tak i mezi nepříbuznými pacienty se stejnou mutací. Detailní statistické zhodnocení, však nebylo možné provést vzhledem k malému počtu nositelů stejné mutace, k jejich rozdílnému věku a počtu podstupených klinických vyšetření. Z 15 rodin v souboru bylo 12 tvořeno pouze 2 členy. Mezi nepříbuznými jedinci bylo nalezeno celkem 6 různých mutací, ale jejich frekvence výskytu v souboru byla rovněž nízká.

Prostřednictvím kompletně vyplněného registračního formuláře bylo možné pozorovat značnou variabilitu TSC znaků u 2 rodinných členů s TSC2 mutací c.5238\_5255del.

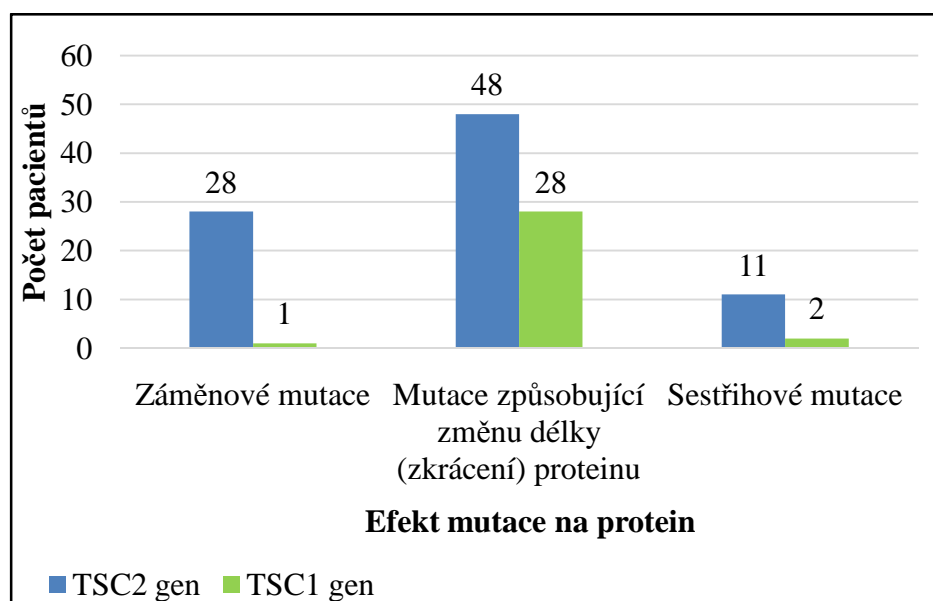
U probanda D827/14 (21 let) byly zjištěny unguální fibromy, fibrózní plaky čela, kortikální tubery, drobné kalcifikace v CNS, vícečetné AML ledvin a epilepsie. Matka tohoto pacienta (D826/14, 41 let) měla rovněž AML a drobné kalcifikace v CNS, dále však vykazovala faciální angiofibromy, depigmentace sítnice, mnohočetné renální cysty a LAM.

Naopak podobně mírný klinický obraz TSC provázaný s pozdějším nástupem projevů byl zaznamenán mezi některými členy jedné 4členné rodiny s TSC1 mutací c.488C>A. Zatímco u probandky 900/11 (8,5 let) se projevila celá řada TSC znaků (hypomelanotické skvrny, SEN, kortikální tubery, kalcifikace v CNS, gingivální fibromy, jamky v zubní sklovině a epilepsie), u její matky 596/11 (32 let) byly prokázány pouze hypomelanotické skvrny, faciální angiofibromy a od 29 let epilepsie. U bratra probandky 1173/11 (11 let) byly prozatím zjištěny rovněž pouze kožní projevy (hypomelanotické a šagrénové skvrny). Další sourozenec 1174/11 probandky (10 měsíců starý) byl jediným členem vyšetřovaného souboru, který nesplňoval diagnostická kritéria TSC, neboť v době vyšetření se jevil zcela bezpříznakově.

### 6.2.2 Korelace mezi typem mutace a fenotypovým projevem TSC

Na základě vlivu mutace na podobu proteinu byly nalezené mutace rozděleny do 3 kategorií. Do první kategorie byly zařazeny mutace způsobující změnu délky proteinu (tzn. posunové mutace zapříčiněné insercemi/delecemi malého rozsahu, nesmyslné mutace či rozsáhlé delece). Všechny tyto změny v sekvenci způsobí zkrácení genového produktu. Pouze u pacienta 4/09 kombinace krátké inserce a delece terminální části 42. exonu s přesahem do netranslatované oblasti TSC2 genu, patrně povede k prodloužení čtecího rámce do původně netranslatovaného regionu TSC2 genu a k možnému prodloužení výsledného proteinu. Druhou kategorii představovaly záměnové mutace a třetí skupinu tvořily sestřihové mutace. Počty pacientů reprezentující jednotlivé kategorie mutací jsou uvedeny v následujícím grafu 10.

**Graf 10: Zastoupení mutací TSC genů v souboru dle efektu na protein**



V rámci 76 pacientů se stanovenou formou výskytu onemocnění byly sestřihové mutace výlučně spjaty s familiárními případy TSC. Záměnové mutace byly podstatně častěji detekovány u *de novo* případů. Počty případů zastupující familiární či sporadickou formu ve vztahu k určitému typu mutace jsou zapsány v tab. 11.

**Tab. 11: Zastoupení typu TSC mutací ve familiárních a sporadických případech výskytu**

Typ mutace	Familiární výskyt	Sporadický výskyt
Záměnové mutace	6	11
Mutace způsobující změnu délky (zkrácení) proteinu	27	25
Sestřihové mutace	7	0
Celkem	40	36

Jelikož všichni TSC1 pacienti (kromě 3) nesli mutaci vedoucí ke zkrácení hamartinu, byla fenotyp/genotypová analýza omezena pouze na skupinu pacientů s TSC2 mutacemi, u nichž byly výše zmíněné 3 kategorie mutací zastoupeny vyšším počtem osob. Avšak žádná statisticky významná korelace mezi příslušnou kategorií mutace a fenotypovými ukazateli nebyla prokázána. Zajímavým poznatkem bylo zjištění, že jediní 3 pacienti postižení LAM byli nositeli záměnových mutací TSC2 genu.

### 6.2.2.1 Mutace způsobující zkrácení proteinu ve vztahu k fenotypu TSC1/2 pacientů

Sekvenční změny vedoucí k předčasnému vzniku stop kodónu byly nejčastějším typem mutace v TSC1 i TSC2 skupině. Předmětem této analýzy bylo zjistit, zdali projev mutací způsobujících zkrácení genového produktu bude rozdílný mezi skupinou TSC1 a TSC2 pacientů.

Výsledky byly podobné jako v případě porovnávání fenotypového projevu mezi TSC1 a TSC2 pacienty v rámci celého vyšetřovaného souboru bez ohledu na typ mutace.

V této studii byl u nositelů TSC2 mutací vedoucích ke zkrácení délky proteinu prokázán vyšší záchyt TSC znaků oproti jedincům s poškozeným TSC1 genem. Zjištěné statisticky významné rozdíly byly následující: TSC2 pacienti byly častěji postiženi faciálními angiofibromy, fibrózními plaky čela a fakomy sítnice a osoby s TSC1 mutacemi měly oproti TSC2 pacientům pouze výjimečně postižené ledviny. Rovněž i v případě poškození CNS a srdce byl viděn trend podporující tvrzení, že gen TSC2 je spjat se závažnějším fenotypem. Data k výše zmíněným výsledkům jsou shrnuta v tab. 12.

**Tab. 12: Porovnání zastoupení některých TSC projevů mezi skupinou TSC1/2 pacientů s mutacemi způsobujícími zkrácení délky proteinu**

Gen	Faciální angiofibromy (0)	Faciální angiofibromy (1)	Celkem
TSC2	10	27	37
TSC1	12	9	21
Celkem	22	36	58
Gen	Fibrózní plaky čela (0)	Fibrózní plaky čela (1)	Celkem
TSC2	20	9	29
TSC1	17	2	19
Celkem	37	11	48
Gen	SEGA (0)	SEGA (1)	Celkem
TSC2	8	7	15
TSC1	9	2	11
Celkem	17	9	26
Gen	Kortikální tubery (0)	Kortikální tubery (1)	Celkem
TSC2	5	25	30
TSC1	7	14	21
Celkem	12	39	51
Gen	Fakomy sítnice (0)	Fakomy sítnice (1)	Celkem
TSC2	12	6	18
TSC1	14	0	14
Celkem	26	6	32
Gen	Rhabdomyom (0)	Rhabdomyom (1)	Celkem
TSC2	8	21	29
TSC1	9	9	18
Celkem	17	30	47
Gen	AML ledvin (0)	AML ledvin (1)	Celkem
TSC2	8	18	26
TSC1	15	1	16
Celkem	23	19	42
Gen	Cysty ledvin (0)	Cysty ledvin (1)	Celkem
TSC2	14	13	27
TSC1	14	2	16
Celkem	28	15	43

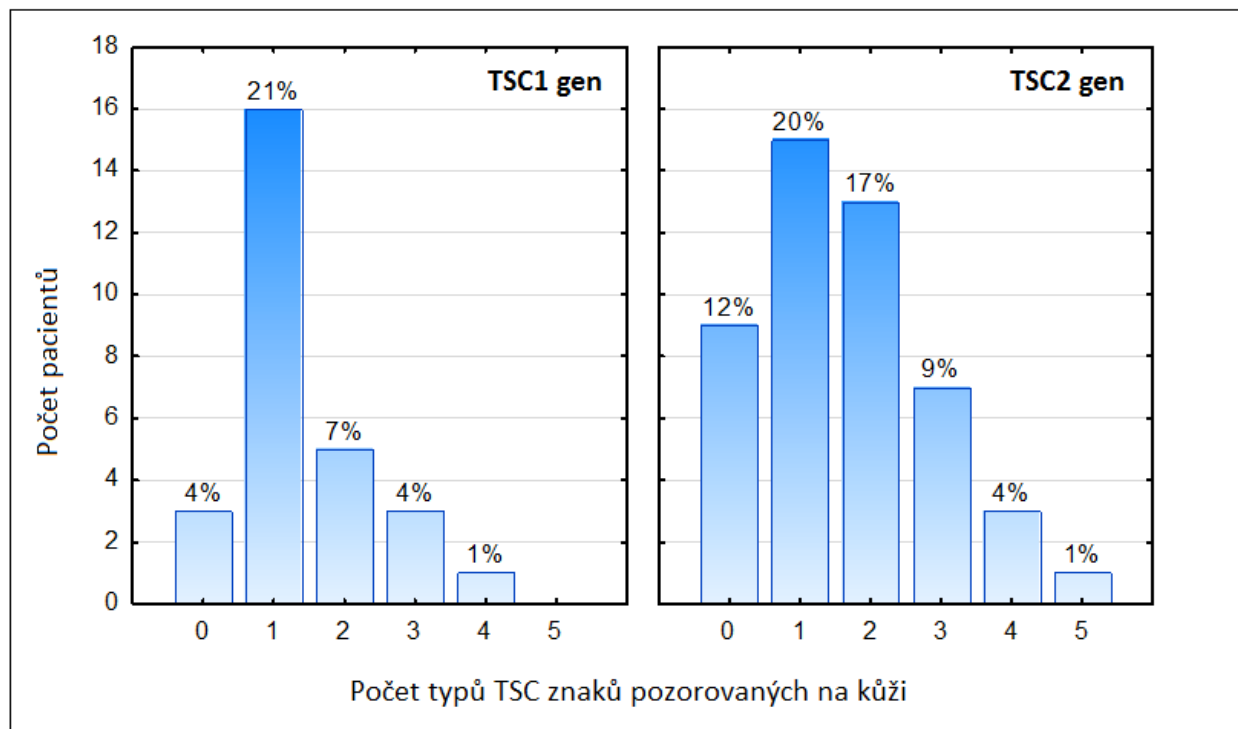
(0) TSC znak je nepřítomen , (1) TSC znak je přítomen

Poměr sporadických/familiárním případů byl v TSC1 (8:12) a v TSC2 skupině byl shledán opačný trend (19:13).

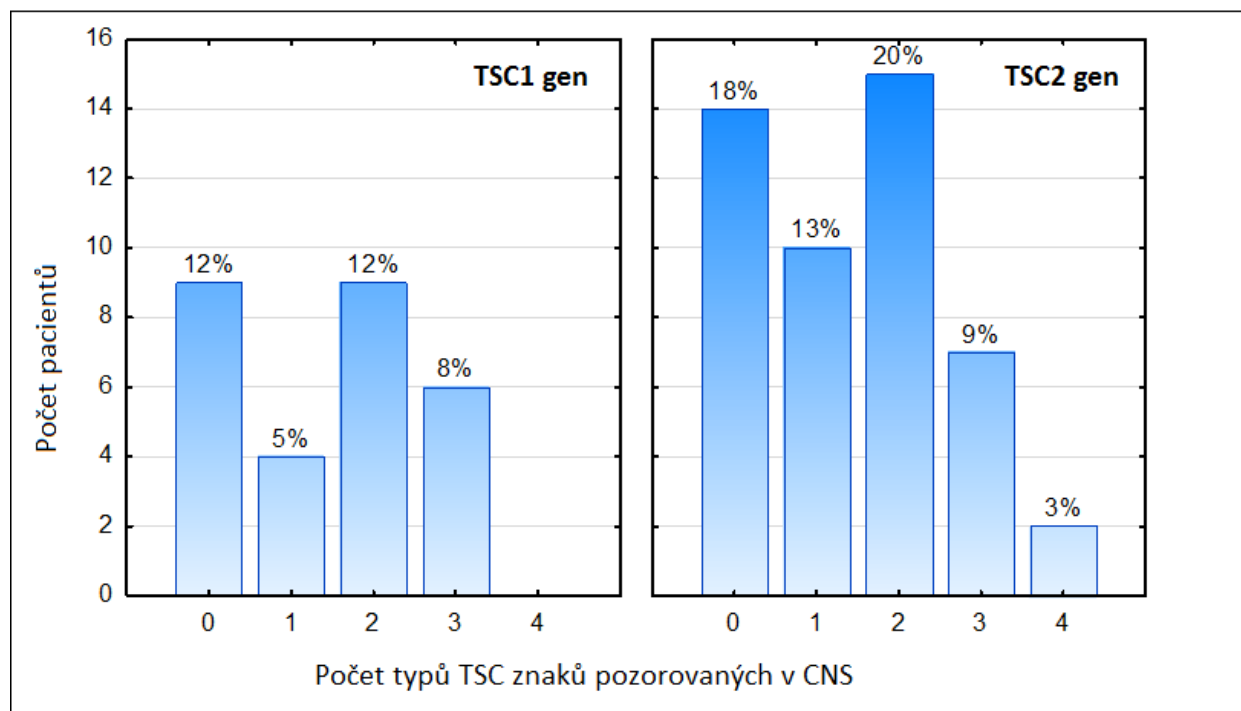
Souhrnný ukazatel postižení kůže vystihuje, že TSC2 pacienti měli často 1 a více typů ze sledovaných kožních TSC znaků (faciální angiofibromy, hypomelanotické skvrny, fibrózní plaky čela, šagrénové skvrny a unguální fibromy). Naopak u TSC1 jedinců byl ve většině případů identifikován pouze 1 typ (graf 11). Porovnáním souhrnného ukazatele postižení CNS bylo zjištěno, že 4 různé znaky (kortikální tubery, SEN, SEGA a přidružený projev v podobě

kalcifikací) byly zachyceny pouze u jedinců s TSC2 mutacemi, avšak současný výskyt 2 nebo 3 znaků byl obvyklý u obou skupin pacientů (graf 12).

**Graf 11: Souhrnného ukazatele postižení kůže u skupiny TSC1/TSC2 s mutacemi způsobujícími zkrácení délky proteinu**



**Graf 12: Souhrnný ukazatel postižení CNS u skupiny TSC1/TSC2 s mutacemi způsobujícími zkrácení délky proteinu**



### 6.3 Výsledy korelace mezi jednotlivými TSC znaky

Prostřednictvím neparametrické (Spearmanovy) korelace byl posuzován vzájemný vztah mezi konkrétními TSC znaky. Do této korelační studie byly zahrnuty i souhrnné ukazatele postižení tkáně (u CNS a kůže) a souhrnné indikátory postižení tkáně plic, ledvin, sítnice a dutiny ústní. Všechny statisticky významné korelace, které byly zjištěny analýzou souboru pacientů s TSC2 mutacemi jsou uvedeny v tab. 13, přičemž zapsaná čísla představují hodnotu Spearmanova korelačního koeficientu. Mezi nejvýraznější statisticky významné korelace patřily např: korelace mezi celkovým postižením kůže a výskytem renálních angiomyolipomů. Konkrétně velmi významný vztah byl odhalen mezi postižením faciálními angiofibromy a AML ledvin. Dále významná korelace byla mezi nálezem hypomelanotických skvrn a přítomností kortikálních tuberů, mezi hamartomy sítnice a srdečním rhabdomyomem či mezi epilepsií a mentální retardací.

Zároveň bylo potvrzeno, že s narůstajícím věkem pacienta přibývají projevy onemocnění (kromě postižení srdce). Dokladem jsou např. významné korelace zaznamenané mezi věkem a výskytem angiomyolipomů ledvin, postižením plic, záchytem unguálních fibromů či faciálních angiofibromů. V případě srdečního rhabdomyomu byla v souvislosti se stoupajícím věkem prokázána významná antikorelace.

Ve skupině osob s TSC1 mutacemi nebyla nalezena žádná výrazná korelace mezi konkrétními TSC znaky, pouze byla opět zjištěna významná korelace mezi věkem a postižením kůže a ledvin a silná ( $p = 0,02$ ) antikorelace (korelační koeficient  $r = -0,41$ ) mezi věkem a postižením srdce.

**Tab 13 : Statisticky významné korelace nalezené mezi TSC znaky u pacientů s TSC2 mutacemi**

	Věk	Adenoma sebaceum	Unguální fibromy	Fibrózní plaky čela	Hypomelan. skvrny	Šagrénové skvrny	Kůže_sumárně	Kalcifikace CNS	SEN	SEGA	Kortikální tubery	CNS_sumárně	Depigmentace sítnice	Fakomy sítnice	Sítnice_indikátor	Rhabdomyom srdce	Renální AMLs	Renální cysty	Ledviny_indikátor	LAM	Intraorální fibromy	Jamky zub. skloviny	Dutina ústní_ind.	Epilepsie	Mentální retardace
Věk		0,57	0,47			0,36	0,32	0,33								-0,43	0,55	0,30	0,27	0,53					
Adenoma sebaceum	0,57		0,36		0,42	0,63	0,68				0,32						0,64		0,36						
Unguální fibromy	0,47	0,36		0,29			0,44										0,44			0,50		0,27			
Fibrózní plaky čela			0,29		0,34	0,39	0,63					0,34							0,43					0,37	
Hypomelan. skvrny		0,42		0,34		0,44	0,57		0,30		0,55	0,33													
Šagrénové skvrny	0,36	0,63		0,39	0,44		0,79										0,39		0,32		0,38		0,31		
Kůže_sumárně	0,32	0,68	0,44	0,63	0,57	0,79					0,29	0,33					0,43		0,47				0,29		
Kalcifikace CNS	0,33											0,65					0,35		0,29						
SEN					0,30							0,63													
SEGA																			0,36				0,42		
Kortikální tubery		0,32			0,55		0,29					0,37													
CNS_sumárně				0,34	0,33		0,33	0,65	0,63		0,37			0,38	0,29										
Depigment. sítnice																				0,45					-0,41
Fakomy sítnice												0,38			0,93	0,47									
Sítnice_indikátor												0,29	0,57	0,93					0,23						
Srd. rhabdomyom	-0,43													0,47											
Renální AMLs	0,55	0,64	0,44			0,39	0,43	0,35											0,82						
Renální cysty	0,30																		0,55						
Ledviny_indikátor	0,27	0,36		0,43		0,32	0,47	0,29		0,36					0,23		0,82	0,55						0,24	
LAM	0,53												0,45												-0,44
Intraorální fibromy			0,50			0,38																		0,82	-0,32
Jamky z. skloviny																							0,69		
Dutina ústní_ind.			0,27			0,31	0,29			0,42									0,24		0,82	0,69			
Epilepsie				0,37									-0,41							-0,44	-0,32				0,58
Mentální retardace																								0,58	

## 7. Diskuze

V souladu s výsledky zahraničních analýz TSC pacientů (Dabora *et al.*, 2001; Sancak *et al.*, 2005; Au *et al.*, 2007), bylo i v české TSC populaci prokázáno, že TSC2 mutace jsou příčinou závažnějšího fenotypu než TSC1 mutace. Rovněž poměr v nálezu mutací TSC2:TSC1 a spektrum zachycených mutací v jednotlivých TSC genech bylo podobné. Dokladem je např. studie 362 pacientů, kdy poměr nalezených mutací TSC2:TSC1 byl 3,4:1 a zastoupení jednotlivých typů mutací podpořilo tvrzení, že gen TSC1 je pouze vzácně zasažen rozsáhlými přestavbami, záměnovými mutacemi a in frame delecemi (Sancak *et al.*, 2005). V naší studii byl poměr TSC2:TSC1 mutací v souboru probandů 3:1 a rozsáhlé delece a in frame delece jsme v genu TSC1 neprokázali žádné, záměnovou mutaci pouze jednu. Poměr sporadických/familiárních případů (40:17 ve skupině probandů, 40:36 v celém souboru) byl zkreslen tím, že u dalších 42 jedinců jsme neměli k dispozici DNA vzorky obou rodičů a tudíž status výskytu jsme nemohli stanovit.

V rámci analýzy TSC genů bylo odhaleno 27 sekvenčních variant, které nebyly dosud popsány v LOVD TSC1/2. I když nebyla provedena funkční analýza, byly tyto varianty považovány za pravděpodobně patologické. Důsledkem většiny nově nalezených variant je zkrácení délky proteinu. Vzhledem k nálezu v blízkosti intron/exonového rozhraní 4 varianty pravděpodobně ovlivní sestřih. U varianty c.4493G>T (p.Ser1498Ile) nelze jednoznačně určit, zda tato záměna bází nacházející se v těsné blízkosti exon/intronového rozhraní bude rovněž ovlivňovat sestřih. Možnou patogenicitu zachycených záměnových variant nejasného významu podpořil výsledek predikčních programů (SIFT, PolyPhen2) a zejména prokázání variant (p.Val692Phe, p.Leu222Gln, p.Ile1621Phe) i v DNA vzorcích rodinných příslušníků rovněž postižených tuberózní sklerózou.

Poměr sporadických/familiárních případů (40:17 ve skupině probandů, 40:36 v celém souboru) byl zkreslen tím, že u dalších 42 jedinců jsme neměli k dispozici DNA vzorky obou rodičů a tudíž status výskytu jsme nemohli stanovit. Forma výskytu onemocnění byla tedy zjištěna pouze u 76 ze 118 osob, což byl hlavní důvod, proč sledování vztahu mezi genotypem a fenotypem bylo omezeno jen na TSC1 a TSC2 skupinu pacientů. Dalším rozdělením jedinců v těchto skupinách podle příslušnosti k familiárním či sporadickým případům (jak je běžné ve velkých zahraničních výzkumech) by vznikly 4 podskupiny s nízkým počtem osob (zejména u TSC1 pacientů), což v kombinaci s neúplnými klinickými údaji představovalo nedostatečný zdroj dat pro statistickou analýzu. Dalším omezením při porovnávání dosažených výsledků



se zahraničními údaji byl rozdílný přístup v posuzování míry závažnosti projevů TSC. Zatímco naše klinické posouzení závažnosti odráželo pouze přítomnost či nepřítomnost znaku v dané tkáni či souhrnný počet různých projevů v rámci jednoho orgánu, jiné studie hodnotily závažnost projevu i v souvislosti s počtem kortikálních tuberů a dle počtu a velikosti renálních cyst a angiomyolipomů (Dabora *et. al.*, 2001).

Naše fenotyp/genotypová studie 118 jedinců v porovnání s analýzou rozsáhlejšího (224 osob) souboru TSC pacientů odhalila stejné zjištění, že angiomyolipomy a vícečetné renální cysty, fibrózní plaky čela a hamartomy sítnice jsou velmi vzácné u pacientů s TSC1 mutacemi (Dabora *et al.*, 2001). Přestože jsme prokázali, že všechny námi pozorované TSC znaky a přidružené projevy se s vyšší frekvencí vyskytovaly u nositelů TSC2 mutací, tak v případě epilepsie byla prevalence překvapivě mírně vyšší ve skupině TSC1 pacientů, nicméně se nejednalo o statisticky významný rozdíl. Statistické zpracování bylo problematické u plicních a intraorálních TSC projevů. Všichni 3 pacienti postižení LAM měli detekované záměnové mutace TSC2 genu. Pro odlišení, zda se jedná o náhodu či trend, by v souboru muselo být pozorováno více postižených. Příčinou nízké prevalence TSC projevů v ústní dutině v obou TSC1/TSC2 skupinách mohla být skutečnost, že někteří pacienti v době vyšetření ještě/už neměli zuby, či vzhledem k možným opravám chrupu nebyly dentální jamky v zubní sklovině patrné.

Kombinovaný efekt (málo pacientů s mutacemi genu TSC1 a zároveň s mírnějším postižením) mohl být důvodem, proč ve skupině TSC1 nebyla nalezena žádná významná korelace navzájem mezi určitými TSC znaky, zatímco u osob s TSC2 mutacemi jich byla odhalena celá řada.

Nález mutace ve formě mozaiky nebyl zárukou mírnějšího fenotypového projevu onemocnění. Pouze v rámci jedné rodiny bylo možné pozorovat, že nositel mutace ve formě mozaiky (otec probanda) vykazoval pouze faciální angiofibromy a subjektivně se cítil zdrav. Naopak jeho syn s ne-mozaikovou formou mutace trpěl kožním, renálním a mentálním postižením. Avšak protože otec probanda nedodal výsledky ostatních doporučených vyšetření (kromě posouzení stavu kůže), nelze vyloučit, že některý z jeho orgánů nese projevy TSC. Ze zbývajících 3 pacientů se zachycenou mutací ve formě mozaiky, byl (zejména u dvou) projev onemocnění spíše závažného charakteru. Porovnáním klinického obrazu pacientky s TSC2 mutací c.4646A>G ve formě 20% - 25% mozaiky s fenotypem pacienta (22 let) ze zahraniční studie (Au *et al.*, 1998), který měl téže mutaci v ne-mozaikové formě, byly shledány shodné nálezy v podobě: SEN, kortikálních tuberů, mnohočetných renálních AML a hypomelanotických

skvrn. Dále však měl pacient z našeho souboru šagrénové skvrny a LAM a nositel mutace v ne-mozaikové formě měl rhabdomyom a trpěl záchvaty.

V rámci vyšetřovaného souboru TSC pacientů byla shledána značná variabilita klinických projevů onemocnění, a to i v rámci rodin či mezi nepříbuznými jedinci se stejnou mutací.

Porovnávání TSC fenotypu mezi pacienty bylo negativně ovlivněno chybějícími údaji o stavu TSC asociovaných orgánů, jelikož někteří pacienti nepodstoupili všechna doporučená vyšetření. Dalším problémem byl rozdílný věk porovnávaných osob. Možným vysvětlením značné variability onemocnění může být i vliv případných sekvenčních změn v dalších komponentách signálních drah.

## 8. Souhrn

Komplex tuberózní sklerózy je genetické onemocnění, které se projevuje benigními tumory v mnoha tkáních a orgánech (především na kůži, mozku, ledvinách a srdci). Příčinou tuberózní sklerózy jsou mutace v TSC1 a TSC2 genu.

Tato studie byla zaměřena na analýzu TSC genů u vybraného souboru pacientů a následnou fenotyp/genotypovou korelaci. Analyzovaný soubor tvořilo 118 pacientů (99 probandů a 19 případů reprezentovalo tuberózní sklerózou postižené rodinné příslušníky některých probandů) Ve skupině 99 probandů bylo nalezeno 75 mutací v TSC2 genu a 24 mutací v TSC1 genu.

Poměr detekovaných TSC2:TSC1 mutací v rámci celého souboru byl 87:31. Zastoupení jednotlivých typů mutací v TSC genech bylo podobné jako u zahraničních analýz. Zatímco spektrum typů mutací bylo více variabilní v genu TSC2, v genu TSC1 výrazně převládaly nesmyslné mutace. Rozsáhlé a in frame delece nebyly v genu TSC1 zastoupeny vůbec.

Celkem 27 zachycených sekvenčních variant (mutací) nebylo dosud popsáno v LOVD TSC1/TSC2.

Poměr sporadických/familiárních případů byl ve skupině probandů 40:17 a 40:36 v celém souboru. U 42 probandů nebylo možné stanovit formu výskytu onemocnění.

Variabilita klinických projevů onemocnění mezi pacienty byla značná a to i v rámci rodin či mezi nepříbuznými jedinci se stejnou mutací. V souladu s výsledky zahraničních výzkumů bylo v naší fenotyp/genotypové studii prokázáno, že TSC2 mutace jsou spjaty se závažnějším fenotypovým projevem než mutace genu TSC1. Žádná statisticky významná korelace nebyla zaznamenána mezi jednotlivými kategoriemi mutací (sestříhovými, záměnovými a mutacemi způsobujícími zkrácení délky proteinu) a konkrétním fenotypovým projevem ve skupině TSC2 pacientů. TSC1 pacienti měli téměř výlučně pouze mutace vedoucí ke zkrácení délky genového produktu. Nositelé mutací způsobujících zkrácení délky tuberinu měli závažnější charakter onemocnění než jedinci s mutacemi vedoucími ke zkrácení délky hamatinu.

Dále byly odhaleny významné korelace mezi nálezem hypomelanotických skvrn a výskytem kortikálních tuberů, mezi postižením kůže faciálními angiofibromy a nálezem renálních AML, mezi hamartomy sítnice a srdečním rhabdomyomem či mezi epilepsií a mentální retardací ve skupině pacientů s TSC2 mutacemi. Naopak u jedinců s TSC1 mutacemi byly vzácně pozorovány AML a vícečetné renální cysty, fibrózní plaky čela a hamartomy sítnice.

## 9. Summary

Tuberous sclerosis complex is a genetic disorder that is manifested by benign tumours in many tissues and organs (particularly of the skin, brain, kidney, heart). Pathogenic mutations are in TSC1 and TSC2 gene. This study is focused on the analysis of the TSC genes in a selected group of patients and subsequent phenotype / genotype correlation. The analyzed group consisted of 118 patients (99 probands and 19 cases of disabled family members of some probands). In the group of 99 probands were found 75 mutations in the TSC2 gene and 24 mutations in TSC1 gene. The ratio of detected TSC2:TSC1 mutations within the entire file was 87:31. Representation of different types of mutations in the TSC genes was were similar to the literature. While the spectrum of the mutation were more variable in TSC2 genes, TSC1 gene significantly prevailed nonsense mutations. Extensive and in-frame deletions in the gene TSC1 were not represented at all.

In total 27 revealed sequence variants (mutations) has not been described in LOVD TSC1/TSC2.

The ratio of sporadic / familial cases were in the group of 40:17 and 40:36 in the entire set. In 42 probands it was not possible to determine the form of the disease incidence.

The variability of clinical expression of the disease among patients was substantial, even within families or between unrelated individuals with the same mutation. In accordance with the results of international research we have in our phenotype / genotype study demonstrated that TSC2 mutations are associated with more severe phenotypes than TSC1 mutations. No statistically significant correlation was observed between different categories of mutations (splicing, missense and mutations causing shortening the length of the protein) and specific phenotypes in a group of patients TSC2. In a group of TSC1 patients there were almost exclusively only mutations leading to a reduction in the length of the gene product. Carriers of mutations causing shortening of the length of tuberin had more severe manifestation of the disease than individuals with mutations leading to shortening of the length of hamatin.

We also revealed significant correlations between findings hypomelanotic spots and the incidence of cortical tuber, the facial skin involvement angiofibromas a finding of renal AML, between hamartoma of the retina and heart rhabdomyoma or between epilepsy and mental retardation in the group of patients with TSC2 mutations. Conversely, in individuals with TSC1 mutations have been rarely observed AML and multiple renal cysts, fibrous plaques head and retinal hamartomas.

## 10. Seznam použitých zkratk

aa	amino acids - aminokyseliny
AML	angiomyolipoma – angiomyolipomy
AMPK	AMP-activated protein kinase - proteinkináza aktivovaná adenosinmonofostátem
APS	amonium persulfate – persíran amonný
CC	coiled coil domain – alfa-helikální doména
CCSTL	clear cell sugar tumor lung - světlobuněčný „sugar“ tumor plic
CNS	centrální nervová soustava
CT	computed tomography - počítačové tomografie (CT)
ddNTPs	dideoxynucleotide triphosphates – dideoxynukleotidtrifosfáty
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis – denaturační gradientová gelová elektroforéza
dH <sub>2</sub> O	deionizovaná voda
daptor	DEP-domain-containing mTOR-interacting protein – DEP doménu obsahující mTOR-interakční protein
DMSO	dimethylsulfoxide – dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid – deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylene diamine tetra-acetic acid - ethylendiamintetraoctová kyselina
EEG	elektroencefalogram
eIF4E	eukaryotický translační iniciační faktor 4
EKG	elektrokardiogram
ERK1/2	extracellular signal–regulated kinase 1/2 – extracelulárním signálem regulovaná kináza 1/2
ERM	ezrin-radixin-moesin – ezrin- radixin-moesin proteinový komplex
EtBr	ethidium bromide – ethidiumbromid
FLAIR	fluid attenuated inversion recovery - sekvence potlačující selektivně signál tekutiny
GAP	GTPase activating protein – GTPázový aktivační protein
GSK3 $\beta$	glycogen synthase kinase-3 $\beta$ – glykogensyntáza-kináza 3 beta
GDP	guanosine diphosphate – guanosindifosfát
GTP	guanosine triphosphate – guanosintrifosfát
HMB-45	human monoclonal antibody 45 – lidská monoklonální protilátka 45
HRCT	high-resolution computed tomography - výpočetní tomografii s vysokým rozlišením

IGV	Integrative Genome Viewer – prohlížeč genomu
LAM	lymphangioliomyomatosis - lymphangioliomyomatóza
LB	lysis buffer – lyzační pufr
LOH	loss of heterozygosity – ztráta heterozygosity
MAPK	mitogen-activated protein kinases – mitogenem aktivované proteinkinázy
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification - multiplexová ligačně dependentní amplifikace sond
mLST8	mammalian lethal with Sec13 protein 8 - savčí letální protein 8 s Sec13
MMPH	multifocal micronodular pneumocyte hyperplasia - multifokální multinodulární hyperplazie pneumocytů
MPS	massively parallel sequencing - masivní paralelní sekvenování
MRI	magnetic resonance imaging - zobrazování magnetickou rezonancí
mRNA	messenger ribonucleic acid – mediátorová ribonukleová kyselina
mTOR	mammalian target of rapamycin – cílová molekula rapamycinu v savčích buňkách
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1 - komplex 1 cílové molekuly pro rapamycin u savců
NCBI	National center for biotechnology information - Národní centrum pro biotechnologické informace
UTR	untranslated region - netranslatovaný region
NLB	nuclei lysis buffer – pufr pro lyzaci jader
PCR	polymerase chain reaction – polymerázová řetězová reakce
PKD1	polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene – gen polycystické choroby ledvin 1
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase – fosfatidylinositol-3-kináza
PRAS40	proline-rich Akt substrate of 40 kDa – na prolin bohatý substrát Akt – 40 kDa
REDD1	protein regulated in development and DNA damage responses 1 protein - protein regulovaný v průběhu vývoje a v odpovědi na poškození DNA
Raptor	regulatory-associated protein of mTOR – regulační protein asociovaný s mTOR
Rheb	Ras homolog enriched in brain – homolog Ras hojně se vyskytující v mozkové tkáni
RSK1	ERK-activated p90 ribosomal S6 kinase 1- kinázou ERK aktivovaná p90 ribozomální S6 kináza
S	serin
SEGA	subependymal giant cell astrocytoma - subependymální obrovskobuněčný astrocytom

SEN	subependymal nodules - subependymální noduly
SGCT	subependymal giant cell tumor - subependymální obrovskobuněčný tumor
S6K1	ribosomal protein S6 kinase 1- ribozomální protein S6 kináza 1
T	threonin
T <sub>a</sub>	annealing temperature – teplota „annealingu“
TAE	tris, acetic acid, EDTA buffer – tris, kyselina octová, EDTA pufr
TBE	tris, boric acid, EDTA buffer – tris, kyselina boritá, EDTA pufr
TBC1D7	TBC1 domain family, member 7 – člen 7 rodiny proteinů s TBC doménou
TE	tris, EDTA buffer – tris, EDTA pufr
TEMED	N,N,N',N'- tetramethyldiamine – N,N,N',N'- tetramethyldiamin
TM	transmembránová doména
TSC	tuberous sclerosis complex - komplex tuberózní sklerózy
LOVD	Leiden open variantion database – databáze sekvenčních variant
UV	ultraviolet light – ultrafialové záření
4E-BP1	eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 – protein vázající se k eukaryotickému translačnímu iniciačnímu faktoru 4E
p70S6K	ribosomal protein S6 kinase - p70 ribozomální protein-S6-kináza

## 11. Seznam publikací

### Původní vědecké publikace v recenzovaných časopisech s impakt faktorem:

Kacerovska D, Kerl K, Michal M, Filipova H, Vrtel R, Vanecek T, Zelenakova H, Kraus J, Kodet R, Kazakov DV. Giant angiofibromas in tuberous sclerosis complex: a possible role for localized lymphedema in their pathogenesis. J Am Acad Dermatol. 2012 Dec; 67(6): 1319-1326. IF=4,105

Petrák B, Gabera A, Filipová H, Tomek V, Puchmajerová A, Mrázková L, Jahodová A, Malíková M, Černý M, Vrtěl R. Tuberózní skleróza u dětí sledovaných od novorozeneckého věku pro prenatalní nález rhabdomyomů srdce – dvě kazuistiky. Cesk Slov Neurol N. 2013; 76/109(6): 763–768.

IF=0,159

### Přehledné publikace v recenzovaných časopisech:

Vrtěl R, Filipová H, Vodička R, Šantavá A, Curtisová V, Foretová L. Tuberózní skleróza. Klin Onkol 2009; 22(Suppl): S50– S53.

Filipová H, Procházka M, Vrtěl R. Diagnostika komplexu tuberózní sklerózy se zaměřením na prenatalní období. Čes. Gynek., 2016, 81, č. 2, s. 147–154.

### Původní vědecká publikace v recenzovaném časopise:

Filipová H, Vrtěl R, Vodička R, Petrák B, Curtisová V, Procházka M. Korelace fenotypu a genotypu u českých pacientů s komplexem tuberózní sklerózy. Prakt. Léč. 2016 (v červnu 2016 úspěšně proběhlo posouzení recenzentem).

### Publikace - nerecenzovaná:

Filipová H, Vrtěl R. Molekulární diagnostika komplexu tuberózní sklerózy. Medical Tribune, ročník X, č. 24, 18. listopadu 2014, D5.



Přednášková činnost:

H. Filipová, R. Vrtěl, R. Vodička, E. Schneiderová: Molekulární diagnostika komplexu tuberózní sklerózy v období 2009-2013. XVII. celostátní konference DNA diagnostiky, Dolní Morava, 27. – 29. listopadu 2013.

H. Filipová, A. Šantavá, E. Schneiderová, R. Kratochvílová, E. Krejčířiková, R. Vodička, R. Vrtěl: Současný stav molekulární diagnostiky TSC, Pracovní den Společnosti lékařské genetiky, České společnosti J. E. Purkyně - 10. Kaprasův den, Praha, 22. března. 2011.

Posterová prezentace:

H. Filipova, R. Vrtel, R. Vodicka: Molecular diagnosis of Czech tuberous sclerosis complex patients in the period 2009 – 2014. ESHG 2015, Glasgow, Scotland,UK, 6th to 9th June 2015.

## 12. Použitá literatura

- Adriaensen ME, Schaefer-Prokop CM, Stijnen T, Duyndam DA, Zonnenberg BA, Prokop M. Prevalence of subependymal giant cell tumors in patients with tuberous sclerosis and a review of the literature. *Eur J Neurol*. 2009 Jun; 16(6): 691-696.
- Adriaensen ME, Schaefer-Prokop CM, Duyndam DA, Zonnenberg BA, Prokop M. Radiological evidence of lymphangioliomyomatosis in female and male patients with tuberous sclerosis complex. *Clin Radiol*. 2011 Jul; 66(7): 625-628.
- Aldrich CS, Hong CH, Groves L, Olsen C, Moss J, Darling TN. Acral lesions in tuberous sclerosis complex: insights into pathogenesis. *J Am Acad Dermatol*. 2010 Aug; 63(2): 244-251.
- Aronow ME, Nakagawa JA, Gupta A, Traboulsi EI, Singh AD. Tuberous sclerosis complex: genotype/phenotype correlation of retinal findings. *Ophthalmology*. 2012 Sep; 119(9): 1917-1923.
- Astrinidis A, Henske EP. Tuberous sclerosis complex: linking growth and energy signaling pathways with human disease. *Oncogene*. 2005 Nov 14; 24(50): 7475-7481.
- Au KS, Rodriguez JA, Finch JL, Volcik KA, Roach ES, Delgado MR, Rodriguez E Jr, Northrup H. Germ-line mutational analysis of the TSC2 gene in 90 tuberous-sclerosis patients. *Am J Hum Genet*. 1998 Feb; 62(2): 286-294.
- Au KS, Williams AT, Roach ES, Batchelor L, Sparagana SP, Delgado MR, Wheless JW, Baumgartner JE, Roa BB, Wilson CM, Smith-Knuppel TK, Cheung MY, Whittemore VH, King TM, Northrup H. Genotype/phenotype correlation in 325 individuals referred for a diagnosis of tuberous sclerosis complex in the United States. *Genet Med*. 2007 Feb; 9(2):88-100.
- Auladell M, Boronat S, Barber I, Thiele EA. Thyroid nodules on chest CT of patients with tuberous sclerosis complex. *Am J Med Genet A*. 2015 Dec; 167(12): 2992-2997.
- Back SJ, Andronikou S, Kilborn T, Kaplan BS, Darge K. Imaging features of tuberous sclerosis complex with autosomal-dominant polycystic kidney disease: a contiguous gene syndrome. *Pediatr Radiol*. 2015 Mar; 45(3): 386-95.
- Bisceglia M, D'Alessandro V, Simeone A, Ben-Dor D, Pasquinelli G. Selected case from the Arkadi M. Rywlin International Pathology Slide Seminar: Sporadic lymphangioliomyomatosis. *Adv Anat Pathol*. 2010 Nov; 17(6): 445-452.

- Black ME, Hedgire SS, Camposano S, Paul E, Harisinghani M, Thiele EA. Hepatic manifestations of tuberous sclerosis complex: a genotypic and phenotypic analysis. *Clin Genet*. 2012 Dec; 82(6): 552-527.
- Bolton PF, Clifford M, Tye C, Maclean C, Humphrey A, le Maréchal K, Higgins JN, Neville BG, Rijdsdijk F; Tuberous Sclerosis 2000 Study Group, Yates JR. Intellectual abilities in tuberous sclerosis complex: risk factors and correlates from the Tuberous Sclerosis 2000 Study. *Psychol Med*. 2015 Aug; 45(11): 2321-31.
- Campen CJ, Porter BE. Subependymal Giant Cell Astrocytoma (SEGA) Treatment Update. *Curr Treat Options Neurol*. 2011 Aug; 13(4): 380–385.
- Cansu A, Ahmetoglu A, Kul S, Uzman D, Ersoz S. Nonfunctional islet cell tumor of the pancreas in a patient with tuberous sclerosis: a case report with literature review. *J Clin Imaging Sci*. 2014 Jan 30; 4:3.
- Colosi E, Russo C, Macaluso G, Musone R, Catalano Ch.: Sonographic diagnosis of fetal cardiac rhabdomyomas and cerebral tubers: a case report of prenatal Tuberous Sclerosis. *J Prenat Med*. 2013 Oct-Dec; 7(4): 51–55.
- Cudzilo CJ, Szczesniak RD, Brody AS, Rattan MS, Krueger DA, Bissler JJ, Franz DN, McCormack FX, Young LR. Lymphangiomyomatosis screening in women with tuberous sclerosis. *Chest*. 2013 Aug; 144(2): 578-585.
- Curatolo P, Moavero R, Roberto D, Graziola F. Genotype/Phenotype Correlations in Tuberous Sclerosis Complex. *Semin Pediatr Neurol*. 2015 Dec; 22(4): 259-73.
- Dabora SL, Jozwiak S, Franz DN, Roberts PS, Nieto A, Chung J, Choy YS, Reeve MP, Thiele E, Egelhoff JC, Kasprzyk-Obara J, Domanska-Pakiela D, Kwiatkowski DJ. Mutational analysis in a cohort of 224 tuberous sclerosis patients indicates increased severity of TSC2, compared with TSC1, disease in multiple organs. *Am J Hum Genet*. 2001 Jan; 68(1): 64-80.
- Dashti SR, Robinson S, Rodgers M, Cohen AR. Pineal region giant cell astrocytoma associated with tuberous sclerosis: case report. *J Neurosurg*. 2005 Apr; 102(3): 322-325.
- De Rosa N. Pulmonary lymphangiomyomatosis in tuberous sclerosis. A case report. *Pathologica*. 2009 Oct; 101(5): 186-189.
- Dibble CC, Elis W, Menon S, Qin W, Klekota J, Asara JM, Finan PM, Kwiatkowski DJ, Murphy LO, Manning BD. TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1. *Mol Cell*. 2012 Aug 24; 47(4): 535-546.

- Elousrouti LT, Lamchahab M, Bougtoub N, Elfatemi H, Chbani L, Harmouch T, Maaroufi M, Amarti Riffi A. Subependymal giant cell astrocytoma (SEGA): a case report and review of the literature. *J Med Case Rep.* 2016 Feb 9; 10(1): 35.
- European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium. Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell.* 1993 Dec 31; 75 (7): 1305-1315.
- Flieder DB, Travis WD. Clear cell "sugar" tumor of the lung: association with lymphangiomyomatosis and multifocal micronodular pneumocyte hyperplasia in a patient with tuberous sclerosis. *Am J Surg Pathol.* 1997 Oct; 21(10): 1242-1247.
- Foster KG, Acosta-Jaquez HA, Romeo Y, Ekim B, Soliman GA, Carriere A, Roux PP, Ballif BA, Fingar DC. Regulation of mTOR complex 1 (mTORC1) by raptor Ser863 and multisite phosphorylation. *J Biol Chem.* 2010 Jan 1; 285(1): 80-94.
- Francalanci P, Diomedi-Camassei F, Purificato C, Santorelli FM, Giannotti A, Dominici C, Inserra A, Boldrini R. Malignant pancreatic endocrine tumor in a child with tuberous sclerosis. *Am J Surg Pathol.* 2003 Oct; 27(10): 1386-1389.
- Franz DN, Belousova E, Sparagana S, Bebin EM, Frost M, Kuperman R, Witt O, Kohrman MH, Flamini JR, Wu JY, Curatolo P, de Vries PJ, Whittemore VH, Thiele EA, Ford JP, Shah G, Cauwel H, Lebowhl D, Sahnoud T, Jozwiak S. Efficacy and safety of everolimus for subependymal giant cell astrocytomas associated with tuberous sclerosis complex (EXIST-1): a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet.* 2013 Jan 12; 381(9861): 125-132.
- Gallagher A, Grant EP, Madan N, Jarrett DY, Lyczkowski DA, Thiele EA. MRI findings reveal three different types of tubers in patients with tuberous sclerosis complex. *J Neurol.* 2010 Aug; 257(8): 1373-1381.
- Glasgow CG, Steagall WK, Taveira-DaSilva A, Pacheco-Rodriguez G, Cai X, El-Chemaly S, Moses M, Darling T, Moss J. Lymphangiomyomatosis (LAM): Molecular insights lead to targeted therapies. *Respir Med.* 2010 Jul; 104(1): S45–S58.
- Gomez MR, Sampson JR, Whittemore VH. Tuberous sclerosis complex Tuberous sclerosis complex, *Developmental perspectives in psychiatry.* New York: Oxford University Press, 3rd edition, 1999; 11, 195, 160, 170, 282, 292, 313-316.
- Goyer I, Dahdah N, Major P. Use of mTOR inhibitor everolimus in three neonates for treatment of tumors associated with tuberous sclerosis complex. *Pediatr Neurol.* 2015 Apr; 52(4): 450-453.

- Grajkowska W, Kotulska K, Jurkiewicz E, Matyja E. Brain lesions in tuberous sclerosis complex. Review. *Folia Neuropathol.* 2010; 48(3): 139-49.
- Gusman M, Servaes S, Feygin T, Degenhardt K, Epelman M.: Multimodal Imaging in the Prenatal Diagnosis of Tuberous Sclerosis Complex. *Case Rep Pediatr.* 2012; 2012: 925646.
- Henske EP, Scheithauer BW, Short MP, Wollmann R, Nahmias J, Hornigold N, van Slegtenhorst M, Welsh CT, Kwiatkowski DJ. Allelic loss is frequent in tuberous sclerosis kidney lesions but rare in brain lesions. *Am J Hum Genet.* 1996 Aug; 59(2): 400-406.
- Hinton RB, Prakash A, Romp RL, Krueger DA, Knilans TK; International Tuberous Sclerosis Consensus Group: Cardiovascular manifestations of tuberous sclerosis complex and summary of the revised diagnostic criteria and surveillance and management recommendations from the International Tuberous Sclerosis Consensus Group. *Am Heart Assoc.* 2014 Nov 25; 3(6): e001493 doi 10.1161/JAHA.114.001493.
- Hodges AK, Li S, Maynard J, Parry L, Braverman R, Cheadle JP, DeClue JE, Sampson JR. Pathological mutations in *TSC1* and *TSC2* disrupt the interaction between hamartin and tuberin. *Hum Mol Genet.* 2001; 10(25): 2899-2905.
- Hoogeveen-Westerveld M, Ekong R, Povey S, Karbassi I, Batish SD, den Dunnen JT, van Eeghen A, Thiele E, Mayer K, Dies K, Wen L, Thompson C, Sparagana SP, Davies P, Aalfs C, van den Ouweland A, Halley D, Nellist M. Functional assessment of *TSC1* missense variants identified in individuals with tuberous sclerosis complex. *Hum Mutat.* 2012 Mar; 33(3): 476-479.
- Hoogeveen-Westerveld M, Ekong R, Povey S, Mayer K, Lannoy N, Elmslie F, Bebin M, Dies K, Thompson C, Sparagana SP, Davies P, van Eeghen AM, Thiele EA, van den Ouweland A, Halley D, Nellist M. Functional assessment of *TSC2* variants identified in individuals with tuberous sclerosis complex. *Hum Mutat.* 2013 Jan; 34(1): 167-175.
- Hung CC, Su YN, Chien SC, Liou HH, Chen CC, Chen PC, Hsieh CJ, Chen CP, Lee WT, Lin WL, Lee CN. Molecular and clinical analyses of 84 patients with tuberous sclerosis complex. *BMC Med Genet.* 2006 Sep 18; 7: 72.
- Ichikawa T, Wakisaka A, Daido S, Takao S, Tamiya T, Date I, Koizumi S, Niida Y. J Mol Diagn. A case of solitary subependymal giant cell astrocytoma: two somatic hits of *TSC2* in the tumor, without evidence of somatic mosaicism. *J Mol Diagn.* 2005 Oct; 7(4): 544-549.

- Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* 2003a Aug 1; 17(15): 1829–1834.
- Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell.* 2003b Nov 26; 115(5): 577-590.
- Jones AC, Shyamsundar MM, Thomas MW, Maynard J, Idziaszczyk S, Tomkins S, Sampson JR, Cheadle JP. Comprehensive mutation analysis of TSC1 and TSC2 and phenotypic correlations in 150 families with tuberous sclerosis. *Am J Hum Genet.* 1999; 64(5): 1305-1315.
- Jozwiak S, Nabbout R, Curatolo P; participants of the TSC Consensus Meeting for SEGA and Epilepsy Management. Management of subependymal giant cell astrocytoma (SEGA) associated with tuberous sclerosis complex (TSC): Clinical recommendations. *Eur J Paediatr Neurol.* 2013 Jul; 17(4): 348-52.
- Jozwiak S, Schwartz RA, Janniger CK, Michałowicz R, Chmielik J. Skin lesions in children with tuberous sclerosis complex: their prevalence, natural course, and diagnostic significance. *Int J Dermatol.* 1998 Dec; 37(12): 911-917.
- Katz JS, Milla SS, Wiggins GC, Devinsky O, Weiner HL, Roth J. Intraventricular lesions in tuberous sclerosis complex: a possible association with the caudate nucleus. *J Neurosurg Pediatr.* 2012 Apr; 9(4): 406-413.
- Kim WJ, Kim SR, Choe YH, Lee KY, Park SJ, Lee HB, Chung MJ, Jin GY, Lee YC. Clear cell "sugar" tumor of the lung: a well-enhanced mass with an early washout pattern on dynamic contrast-enhanced computed tomography. *J Korean Med Sci.* 2008 Dec; 23(6): 1121-1124.
- Kingswood JC, Jozwiak S, Belousova ED, Frost MD, Kuperman RA, Bebin EM, Korf BR, Flamini JR, Kohrman MH, Sparagana SP, Wu JY, Brechenmacher T, Stein K, Berkowitz N, Bissler JJ, Franz DN.: The effect of everolimus on renal angiomyolipoma in patients with tuberous sclerosis complex being treated for subependymal giant cell astrocytoma: subgroup results from the randomized, placebo-controlled, Phase 3 trial EXIST-1. *Nephrol Dial Transplant.* 2014 Jun; 29(6): 1203-1210.
- Kotulska K, Borkowska J, Roszkowski M, Mandera M, Daszkiewicz P, Drabik K, Jurkiewicz E, Larysz-Brysz M, Nowak K, Grajkowska W, Domańska-Pakieła D, Jozwiak S. Surgical treatment of subependymal giant cell astrocytoma in tuberous sclerosis complex patients. *Pediatr Neurol.* 2014 Apr; 50(4): 307-312.

- Krymskaya VP. Tumour suppressors hamartin and tuberin: intracellular signalling. *Cell Signal*. 2003 Aug; 15(8): 729-39.
- Krymskaya VP. Smooth muscle-like cells in pulmonary lymphangiomyomatosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 Jan 1; 5(1): 119-126.
- Krymskaya VP. Therapeutic Strategies for Treatment of Pulmonary Lymphangiomyomatosis (LAM). *Expert Opin Orphan Drugs*. 2014 Oct 1; 2(10): 1063–1074.
- Laass MW, Spiegel M, Jauch A, Hahn G, Rupprecht E, Vogelberg C, Bartsch O, Huebner A. Tuberous sclerosis and polycystic kidney disease in a 3-month-old infant. *Pediatr Nephrol*. 2004 Jun; 19(6): 602-608.
- Lamb RF, Roy C, Diefenbach T, Vinters HV, Johnson MW, Jay DG, Hall A. The TSC1 tumour suppressor hamartin regulates cell adhesion through ERM proteins and the GTPase Rho. *Nature Cell Biology*. 2000; 2(5): 281-287.
- Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol*. 2005;15:702–713.
- Lonngi M, Gold AS, Murray TG. Combined bevacizumab and triamcinolone acetonide injections for macular edema in a patient with astrocytic hamartomas and tuberous sclerosis. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*. 2013 Jan-Feb; 44(1): 85-90.
- Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by ERK: implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 2005; 121: 179–193.
- Maruyama H, Seyama K, Sobajima J, Kitamura K, Sobajima T, Fukuda T, Hamada K, Tsutsumi M, Hino O, Konishi Y. Multifocal micronodular pneumocyte hyperplasia and lymphangiomyomatosis in tuberous sclerosis with a TSC2 gene. *Mod Pathol*. 2001 Jun; 14(6): 609-614.
- Miyake M, Tateishi U, Maeda T, Kusumoto M, Satake M, Arai Y, Sugimura K. Pulmonary lymphangiomyomatosis in a male patient with tuberous sclerosis complex. *Radiat Med*. 2005 Nov; 23(7): 525-527.
- Mlynarczyk G. Enamel pitting. A common sign of tuberous sclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 1991; 615: 367-369.
- Mohamed I, Ethier G, Goyer I, Major P, Dahdah N. Oral everolimus treatment in a preterm infant with multifocal inoperable cardiac rhabdomyoma associated with tuberous sclerosis

- complex and a structural heart defect. *BMJ Case Rep.* 2014 Nov 26; 2014. doi: 10.1136/bcr-2014-205138
- Moss J, Avila NA, Barnes PM, Litzenberger RA, Bechtle J, Brooks PG, Hedin CJ, Hunsberger S, Kristof AS. Prevalence and clinical characteristics of lymphangioliomyomatosis (LAM) in patients with tuberous sclerosis complex. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Aug 15; 164(4): 669-671.
  - Mühlebner A, Iyer AM, van Scheppingen J, Anink JJ, Jansen FE, Veersema TJ, Braun KP, Spliet WG, van Hecke W, Söylemezoğlu F, Feucht M, Krsek P, Zamecnik J, Bien CG, Polster T, Coras R, Blümcke I, Aronica E. Specific pattern of maturation and differentiation in the formation of cortical tubers in tuberous sclerosis complex (TSC): evidence from layer-specific marker expression. *J Neurodev Disord.* 2016 Apr 1; 8: 9.
  - Nandagopal R, Vortmeyer A, Oldfield EH, Keil MF, Stratakis CA. Cushing's syndrome due to a pituitary corticotropinoma in a child with tuberous sclerosis: an association or a coincidence? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007 Oct; 67(4): 639–641.
  - Neuman NA, Henske EP. Non-canonical functions of the tuberous sclerosis complex-Rheb signalling axis. *EMBO Mol Med.* 2011 Apr; 3(4): 189-200.
  - Northrup H, Krueger D. The International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Group. Tuberous Sclerosis Complex Diagnostic Criteria Update: Recommendations of the 2012 International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference. *Pediatr Neurol.* 2013a; 49: 243–254.
  - Northrup H, Krueger D. Tuberous Sclerosis Complex Surveillance and Management: Recommendations of the 2012 International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference. *Pediatr Neurol.* 2013b; 49(4): 255–265.
  - O'Callaghan FJ, Noakes MJ, Martyn CN, Osborne JP. An epidemiological study of renal pathology in tuberous sclerosis complex. *BJU Int.* 2004 Oct; 94(6): 853-857.
  - Ogiwara H, Morota N. Subependymal giant cell astrocytoma with intratumoral hemorrhage. *J Neurosurg Pediatr.* 2013 Apr; 11(4): 469-472.
  - Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS, Sabatini DM. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell.* 2009 May 29; 137(5): 873-86.
  - Prabowo A, Anink J, Lammens M, Nellist M, van den Ouweland AMW, Adle-Biassette H, Sarnat HB, Flores-Sarnat L, Crino PB, Aronica E. Fetal brain lesions in tuberous sclerosis



- complex: TORC1 activation and inflammation. *Brain Pathol.* 2013 Jan; 23(1): 45–59.
- Rakowski SK, Winterkorn EB, Paul E, Steele DJ, Halpern EF, Thiele EA. Renal manifestations of tuberous sclerosis complex: Incidence, prognosis, and predictive factors. *Kidney Int.* 2006 Nov; 70(10): 1777-1782.
  - Ridler K, Suckling J, Higgins N, Bolton P, Bullmore E. Standardized whole brain mapping of tubers and subependymal nodules in tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol.* 2004; 19(9): 658-665.
  - Roach E, Gomez M, Northrup H.: Tuberous sclerosis complex consensus conference: revised clinical diagnostic criteria. *J Child Neurol.* 1998; 13: 624– 628.
  - Roach ES, Sparagana SP: Diagnosis of Tuberous Sclerosis Complex Disclosures. *J Child Neurol.* 2004; 19(9): 643-649.
  - Rose VM, Au KS, Pollom G, Roach ES, Prashner HR, Northrup H. Germ-line mosaicism in tuberous sclerosis: how common? *Am J Hum Genet.* 1999 Apr; 64(4): 986-92.
  - Roth J, Roach ES, Bartels U, Jozwiak S, Koenig MK, Weiner HL, Franz DN, Wang HZ. Subependymal giant cell astrocytoma: diagnosis, screening, and treatment. Recommendations from the International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference 2012. *Pediatr Neurol.* 2013 Dec; 49(6): 439-444.
  - Rowley S, O’Callaghan F, Osborne J. Ophthalmic manifestations of tuberous sclerosis: a population based study. *Br J Ophthalmol.* 2001; 85: 420–423.
  - Ryu JH, Moss J, Beck GJ, Lee JCh, Brown KK, Chapman JT, Finlay GA, Olson EJ, Stephen J, Ruoss SJ, Maurer JR, Raffin TA, Peavy HH, McCarthy K, Taveira-DaSilva A, Francis X, McCormack FX, Avila NA, Rosamma M, DeCastro RM, Susan S. ,Jacobs SS, Stylianou M, Fanburg BL, The NHLBI Lymphangiomyomatosis Registry. Characteristics of 230 Patients at Enrollment, *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Jan 1; 173(1): 105–111.
  - Sancak O, Nellist M, Goedbloed M, Elfferich P, Wouters C, Maat-Kievit A, Zonnenberg B, Verhoef S, Halley D, van den Ouweland A. Mutational analysis of the TSC1 and TSC2 genes in a diagnostic setting: genotype--phenotype correlations and comparison of diagnostic DNA techniques in Tuberous Sclerosis Complex. *Eur J Hum Genet.* 2005 Jun; 13(6): 731-41.
  - Santos L, Brcic I, Unterweger G, Riddell R, Langner C. Hamartomatous polyposis in tuberous sclerosis complex: Case report and review of the literature. *Pathol Res Pract.* 2015 Dec; 211(12): 1025-1029.

- Shepherd CW, Gomez MR, Lie JT, Crowson CS. Causes of death in patients with tuberous sclerosis. *Mayo Clin Proc.* 1991 Aug; 66(8): 792-796.
- Shinzato Y, Ikehara Y. A case of tuberous sclerosis complex with concomitant primary hyperparathyroidism due to parathyroid adenoma: a case report. *World J Surg Oncol.* 2015; 13: 106.
- Smolarek TA, Wessner LL, McCormack FX, Mylet JC, Menon AG, Henske EP. Evidence that lymphangiomyomatosis is caused by TSC2 mutations: chromosome 16p13 loss of heterozygosity in angiomyolipomas and lymph nodes from women with lymphangiomyomatosis. *Am J Hum Genet.* 1998 Apr; 62(4): 810–815.
- Sofer A, Lei K, Johannessen CM, Ellisen LW. Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Mol Cell Biol.* 2005 Jul; 25(14): 5834-5845.
- Sparling JD, Hong CH, Brahim JS, Moss J, Darling TN. Oral findings in 58 adults with tuberous sclerosis complex. *J Am Acad Dermatol.* 2007 May; 56(5): 786-790.
- Sue Hake, Cutaneous Manifestations of Tuberous Sclerosis. *Ochsner J.* 2010 Fall; 10(3): 200–204.
- Tyburczy ME, Dies KA, Glass J, Camposano S, Chekaluk Y, Thorner AR, Lin L, Krueger D, Franz DN, Thiele EA, Sahin M, Kwiatkowski DJ. Mosaic and Intronic Mutations in TSC1/TSC2 Explain the Majority of TSC Patients with No Mutation Identified by Conventional Testing. *PLoS Genet.* 2015 Nov 5; 11(11): e1005637. doi:10.1371/journal.pgen.1005637.
- van Slechtenhorst M, de Hoogt R, Hermans C, Nellist M, Janssen B, Verhoef S, Lindhout D, van den Ouweland A, Halley D, Young J, Burley M, Jeremiah S, Woodward K, Nahmias J, Fox M, Ekong R, Osborne J, Wolfe J, Povey S, Snell RG, Cheadle JP, Jones AC, Tachataki M, Ravine D, Sampson JR, Reeve MP, Richardson P, Wilmer F, Munro C, Hawkins TL, Sepp T, Ali JB, Ward S, Green AJ, Yates JR, Kwiatkowska J, Henske EP, Short MP, Haines JH, Jozwiak S, Kwiatkowski DJ. Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science.* 1997 Aug 8; 277(5327): 805-808.
- Verhoef S, Bakker L, Tempelaars AM, Hesselink-Janssen AL, Mazurczak T, Jozwiak S, Fois A, Bartalini G, Zonnenberg BA, van Essen AJ, Lindhout D, Halley DJ, van den Ouweland AM. High rate of mosaicism in tuberous sclerosis complex. *Am J Hum Genet.* 1999 Jun ;64(6): 1632-1637.
- Webb DW, Clarke A, Fryer A, Osborne JP. The cutaneous features of tuberous sclerosis: a population study. *Br J Dermatol.* 1996 Jul; 135(1): 1-5.

- Xu L, Sterner C, Maheshwar MM, Wilson PJ, Nellist M, Short PM, Haines JL, Sampson JR, Ramesh V. Alternative splicing of the tuberous sclerosis 2 (TSC2) gene in human and mouse tissues. *Genomics*. 1995 Jun 10; 27(3): 475-80.
- Yamanaka A, Kitaichi M, Fujimoto T, Hirai T, Hori H, Konishi F. Multifocal micronodular pneumocyte hyperplasia in a postmenopausal woman with tuberous sclerosis. *Virchows Arch*. 2000 Apr; 436(4): 389-392.
- Yang P, Cornejo KM, Sadow PM, Cheng L, Wang M, Xiao Y, Jiang Z, Oliva E, Jozwiak S, Nussbaum RL, Feldman AS, Paul E, Thiele EA, Yu JJ, Henske EP, Kwiatkowski DJ, Young RH, Wu CL. Renal cell carcinoma in tuberous sclerosis complex. *Am J Surg Pathol*. 2014 Jul; 38(7): 895-909.
- Yinon Y, Chitayat D, Blaser S, Seed M, Amsalem H, Yoo SJ, Jaeggi ET.: Fetal cardiac tumors: a single-center experience of 40 cases. *Prenat Diagn*. 2010 Oct; 30 (10): 941-949.
- Yu J, Astrinidis A, Henske EP. Chromosome 16 loss of heterozygosity in tuberous sclerosis and sporadic lymphangiomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Oct 15; 164(8 Pt 1): 1537-1540.
- Zhang YX, Meng H, Zhong DR, Jiang YX, Dai Q, Zhang H. Cardiac rhabdomyoma and renal cyst in a fetus: early onset of tuberous sclerosis with renal cystic disease. *J Ultrasound Med*. 2008 Jun; 27(6): 979-982.

## **13. Seznam příloh**

Příloha 1: Registrační formulář klinických údajů TSC pacienta

Příloha 2: Tab. 1: Klinické projevy TSC pacientů, stanovená diagnóza a forma výskytu tuberózní sklerózy

## Příloha 1: Registrační formulář klinických údajů TSC pacienta

### Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny, FN Olomouc

přednosta: Prof. MUDr. Jiří Šantavý, CSc.

Jméno pacienta:		Datum narození:	
Vyšetřující specialista: (zabezpečující informovaný souhlas pacienta)		tel: fax:	
Pohlaví: mužské/ ženské		Věk v době vyšetření:	
kůže	adenoma sebaceum		+ = přítomno - = nepřítomno a = přítomno dle anamnézy n = nevyšetřeno
	unguální fibromy		
	fibrózní plaky čela		
	hypomelanotické skvrny (počet)		
	šagrenové skvrny		
CNS	drobné kalcifikace		+ = přítomno - = nepřítomno n = nevyšetřeno
	subependymální noduly		
	hamartomy		
sítnice	depigmentace		+ = přítomno - = nepřítomno n = nevyšetřeno
	fakomy		
srdce	rhabdomyomy		+ = přítomno - = nepřítomno n = nevyšetřeno
ledviny	angiomyolipomy		+ = přítomno - = nepřítomno n = nevyšetřeno
	cysty		
plíce	lymphangiomiomy		+ = přítomno - = nepřítomno n = nevyšetřeno
ústa	gingivální fibromy		+ = přítomno - = nepřítomno n = nevyšetřeno
	mnohočetné dentální jamky		
epilepsie			+ = přítomno - = nepřítomno n = nevyšetřeno
mentální retardace			není mírná střední těžká
jiné			

Doc. RNDr. Radek Vrtěl, PhD, Doc. MUDr. A. Šantavý, CSc.

Ústav lékařské genetiky a fet. med., Fakultní nemocnice Olomouc, I. P. Pavlova 6, 775 20, tel. 58585 4461, fax: 5854 14 906, e-mail: [vrtel@fnol.cz](mailto:vrtel@fnol.cz). Požadovaný vzorek: 5 – 10 ml nesrážlivé krve v EDTA (nemrazit!) nebo DNA izolovaná z tohoto objemu krve.

## **Příloha 1: Pokračování registračního formuláře klinických údajů TSC pacienta**

Nová kritéria pro diagnostiku TSC upraveno podle Roach E.S. a Sparagana S.P. 2004

**h)** histologický nálezn **r)** radiologický nálezn

Majoritní znak	umístění	věk výskytu
Faciální angiofibromy a fibrózní plaky čela	hlava	dětství - dospělost
Netraumatické unguální a periunguální fibromy	prsty	adolescence-dospělost
Hypomelanotické skvrny (tři nebo více)	kůže	od kojence
Šagrénové skvrny (névus pojivové tkáně )	kůže	od dětství
Kortikální tuber*	mozek	od plodu
Subependymální noduly	mozek	dětství - dospělost
Subependymální obrovskobuněčné astrocytomy	mozek	dětství - dospělost
Vícečetné sítnicové nodulární hamartomy	oči	od kojence
Srdeční rhabdomyom	srdce	od plodu-dětství
Lymfangiomyomatóza**	plice	adolescence-dospělost
Renální angiomyolipom	ledviny	dětství-dospělost

Minoritní znaky:

Vícečetné náhodně umístěné jamky zubní skloviny	zuby
Hamartomatózní rektální polypy <b>h</b>	rektum
Cysty kostí	kosti
Cerebrální radiální migrační dráhy bílé hmoty <b>r</b>	mozek
Fibromy dásní	dásně
Jiné hamartomy <b>h</b>	játra,slezina a další orgány
Retinální bezbarvé skvrny	oči
Kožní léze typu „confetti“	kůže
vícečetné renální cysty <b>h</b>	ledviny

\* vyskytne-li se současně cerebrální kortikální dysplázie a cerebrální migrační dráhy bílé hmoty, jsou počítány spíše jako jeden než jako dva znaky TSC.

\*\* při výskytu lymfangiomyomatózy a renálního angiomyolipomu musí být přítomny další TSC znaky pro stanovení TSC diagnózy (oba dohromady považovány za 1 majoritní znak)!

Definitivní dg. TSC je dána přítomností - buď dvou majoritních znaků

- nebo jednoho majoritního a dvou minoritních znaků

Pravděpodobná dg. TSC je dána přítomností - jednoho majoritního a jednoho minoritního znaku

Možná dg. TSC je při přítomnosti - buď jednoho majoritního,

- nebo dvou či více minoritních znaků.

Pozn. Epileptické záchvaty ani infantilní křeče nově nejsou zahrnovány mezi diagnostická kritéria vzhledem k nespecifitě a různorodosti původu.

**Príloha 2: Tab. 2: Klinické prejavy TSC pacientů, stanovená diagnóza a forma výskytu tuberózní sklerózy**

Číslo vzorku pacienta	Výskyt Sporadický/ Familiární	Diagnóza Definitivní/ Možná	Věk pacienta v době vyplnění registr. formuláře	Kůže						CNS			
				Adenoma sebaceum	Unguální fibromy	Fibrózní plaky čela	Hypomelan. skvrny (HS)	Počet HS	Šagrénové skvrny	Drobné kalcifikace	SEN	SEGA	Kortikální tubery, hamartomy
13/09	S	M	14 let	0	0	0	0	?	0	0	0	0	0
130/09	S	D	23 let	1	0	2	1	?	0	1	1	1	1
347/09	S	M	7 měsíců	2	2	2	2	0	2	0	1	0	0
408/09	S	D	5 let 9 měsíců	0	0	0	1	?	0	0	1	2	1
598/09	0	D	22 měsíců	2	2	2	1	1	2	2	1	0	1
659/09	0	D	4 roky 7 měsíců	2	2	2	1	9	2	2	1	2	1
1231/09	0	D	2 roky 4 měsíce	2	2	2	1	5-7	2	2	1	0	1
1435/09	S	D	14 let	1	2	2	2	0	2	2	2	0	1
244/10	0	D	26 let 11 měsíců	1	0	0	0	?	0	2	2	2	1
312/10	0	D	2 měsíce	2	2	2	2	0	2	1	1	0	2
438/10	F	M	1 rok 9 měsíců	2	2	2	1	?	2	0	0	0	0
501/07-RP	F	D	21 let	0	0	0	1	0	0	0	1	2	1
1800/13	0	D	35 let	0	2	2	1	2	1	0	1	0	1
755/10	0	D	18 let	1	1	1	1	10	1	1	1	2	1
789/10	0	D	26 let	2	2	2	2	0	2	1	1	0	1
850/10	0	D	28 let	1	2	2	1	?	1	1	1	0	1
866/10	0	D	2 roky 6 měsíců	2	2	1	1	?	2	1	1	0	2
938/10	S	M	8 měsíců	0	0	0	1	2	0	0	1	2	2
1033/10	S	D	1 rok 5 měsíců	2	2	2	1	2	2	0	1	0	1
1077/10	0	D	3 roky 4 měsíce	1	2	1	1	7	1	2	1	2	1
1124/10	0	M	1 rok 4 měsíce	2	2	2	1	10-20	2	1	1	2	1
1246/10	S	D	4 roky 9 měsíců	2	2	2	1	5	2	2	2	2	2
1274/10	F	D	16 let	1	0	0	1	?	0	0	0	0	0
1275/10-RP	F	M	42 let	1	0	0	0	?	0	0	0	0	0
1460/10	0	D	58 let	2	1	2	2	0	2	1	1	0	2
83/11	0	D	5 let 8 měsíců	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
265/11	0	D	9 let	0	0	1	1	8	1	0	0	0	0
266/11	0	D	2 měsíce	0	0	0	1	7	0	0	0	0	0
267/11	0	D	2 roky 11 měsíců	2	2	1	1	více než 10	2	2	1	1	2
295/11	S	D	9 let 2 měsíce	2	2	1	1	7	1	1	1	2	1
527/11	S	D	15 let 9 měsíců	1	2	2	1	více než 5	2	1	1	0	1

**Příloha 2: Pokračování tab. 2: Klinické projevy TSC pacientů, stanovená diagnóza a forma výskytu tuberózní sklerózy**

Číslo vzorku pacienta	Sítnice		Srdce	Ledviny		Plíce	Ústa		Epilepsie	Mentální retardace	Závažnost mentální retardace	Jiné nálezy, popřípadě upřesnění nálezu uvedeného v registračním formuláři
	Depigmentace	Fakomy	Rhabdomyom/y	AMLs	Cysty	LAM	Gingivální fibromy	Dentální jamky				
13/09	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	těžká	
130/09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	není	skvrny barvy bílé kávy
347/09	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	není	
408/09	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	?	lipodermoid v oku
598/09	2	2	1	2	2	2	2	0	1	2	není	
659/09	2	2	1	0	0	0	2	0	1	2	není	
1231/09	2	1	1	2	2	2	2	2	1	1	?	
1435/09	2	2	2	1	0	2	0	0	1	1	mírná	
244/10	0	0	2	2	2	0	0	0	1	0	?	zmnožení intersticiální kresby, benigně vyhlížející uzlík v pravém plicním hilu, 2 skvrny bílé kávy
312/10	2	1	1	0	2	2	2	2	1	0	?	1 renální cysta (7-8 mm)
438/10	0	0	1	0	0	0	0	0	2	2	není	
501/07-RP	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	?	
1800/13	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	není	
755/10	2	2	2	1	2	2	0	2	1	2	není	
789/10	2	2	2	2	2	0	0	0	1	2	není	v 15 letech zjištěny cysty v játrech
850/10	0	0	0	1	1	0	2	2	1	1	?	v 18 letech st. p. nefrektomie l. dx
866/10	2	1	1	2	1	2	2	2	1	1	?	
938/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	na trupu v.s. verrukózní névus
1033/10	1	0	1	0	1	0	2	0	2	2	není	
1077/10	2	2	1	0	2	2	2	2	1	1	mírná	kožní léze typu confetti, relativní mikrocefalie
1124/10	2	2	0	2	2	0	0	0	1	1	?	četné hypomelanotické makuly do 0,5 cm, nespecifické hyperechogenní útvary v srdci
1246/10	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	není	
1274/10	2	2	2	1	2	2	0	0	1	1	?	jaterní hamartomy, juvenilní katarakta, obezita
1275/10-RP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	subjektivně bez obtíží, výsledky vyšetření nedodal
1460/10	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	není	
83/11	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	?	
265/11	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	?	
266/11	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	?	
267/11	0	1	1	1	2	2	2	1	1	0	?	opoždění řeči
295/11	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	není	WPW syndrom, dyslalie, známky ADHD
527/11	2	1	1	1	1	0	0	0	2	2	není	Hydrocephal.int., st.p. biVP shunt l. dx



**Príloha 2: Pokračování tab. 2: Klinické projevy TSC pacientů, stanovená diagnóza a forma výskytu tuberózní sklerózy**

Číslo vzorku pacienta	Výskyt Sporadický/ Familiární	Diagnóza Definitivní/ Možná	Věk pacienta v době vyplnění registr. formuláře	Kůže						CNS			
				Adenoma sebaceum	Unguální fibromy	Fibrózní plaky čela	Hypomelan. skvrny (HS)	Počet HS	Šagrénové skvrny	Drobné kalcifikace	SEN	SEGA	Kortikální tubery, hamartomy
586/11-RP	F	M	16 let	1	0	0	0	?	0	0	0	0	0
435/03	F	M	40 let	1	0	0	0	?	0	0	0	0	0
699/11	0	D	65 let	1	1	2	2	0	2	2	1	1	2
900/11	F	D	8 let 6 měsíců	0	0	0	1	5	0	1	1	2	1
1173/11-RP	F	D	11 let	2	0	2	1	?	1	0	0	0	0
1174/11-RP	F	NESPLŇUJE	10 měsíců	0	0	0	0	?	0	0	0	0	0
596/11-RP	F	D	32 let	1	0	0	1	?	0	2	2	2	2
702/11	S	D	2,5 let	1	2	2	1	více než 10	1	2	2	0	1
746/11	0	D	34 let	1	2	2	2	0	2	2	2	2	1
837/11	0	D	1 rok 9 měsíců	2	2	2	1	1	1	2	2	0	0
896/11	S	D	7 měsíců	2	2	2	2	0	2	0	1	2	1
903/11	S	M	6 měsíců	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0
465/08	S	D	15 let	0	0	0	1	?	0	0	2	2	1
1018/11	S	M	15 let	2	2	2	1	5	2	0	0	0	0
1067/11	0	D	21 let	1	0	1	1	?	1	1	1	0	1
1314/11	0	D	8 let 10 měsíců	1	2	1	1	více než 3	1	1	1	2	1
1384/11	S	D	6 měsíců	0	0	0	0	?	0	0	1	0	1
1400/11	0	D	6 měsíců	2	2	2	2	0	2	1	1	2	1
1651/11-RP	F	D	18 let	0	2	2	2	0	1	1	2	0	1
1650/11	F	D	43 let	1	1	2	1	10	1	2	2	0	2
1761/11	0	D	29 let	1	0	0	0	?	0	0	0	0	1
1858/11	S	D	7 let 2 měsíce	1	2	1	1	15	2	1	1	1	1
1937/11	0	D	8 let 5 měsíců	1	2	1	1	10	1	1	1	1	1
D26/12	S	D	13 let	1	2	2	1	6	1	0	0	0	1
D268/12	F	D	2 roky	2	2	2	1	7	2	1	1	2	1
D660/12-RP	F	M	32 let	0	0	0	1	?	0	0	0	0	0
D444/12	S	M	14 let	0	0	0	0	?	0	0	0	1	0
D454/12	S	D	8 let	0	0	0	1	5-6	2	1	2	0	1
D583/12	S	D	19 let	0	0	0	0	?	0	1	1	2	1
D959/12	S	D	6 let	1	2	2	1	5	1	0	0	0	0
D969/12	0	D	62 let	1	1	2	2	0	2	1	1	0	2

**Príloha 2: Pokračování tab. 2: Klinické projevy TSC pacientů, stanovená diagnóza a forma výskytu tuberózní sklerózy**

Číslo vzorku pacienta	Sítlice		Srdce	Ledviny		Plic	Ústa		Epilepsie	Mentální retardace	Závažnost mentální retardace	Jiné nálezy, popřípadě upřesnění nálezu uvedeného v registračním formuláři
	Depigmentace	Fakomy	Rhabdomyom/y	AMLs	Cysty	LAM	Gingivální fibromy	Dentální jamky				
586/11-RP	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	?	
435/03	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	?	renální selhání
699/11	0	0	2	0	1	0	2	0	1	1	mírná	operace meningeomu, astrogliomu
900/11	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	není	opožděná dentice
1173/11-RP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	není	café au lait skvrny, febrilní křeče, mléčná dentice
1174/11-RP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	fenotyp bezpříznakový
596/11-RP	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	?	café au lait skvrny
702/11	0	0	0	2	2	0	0	0	1	1	?	hemangioblastom F roh postr. Komory
746/11	2	2	2	2	0	2	2	2	1	2	není	
837/11	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	není	tu formace v oblasti clivu, hypomelanotická skvrna - pramen vlasů
896/11	2	2	2	2	2	2	2	0	1	2	není	
903/11	0	0	1	2	1	0	2	0	2	2	není	
465/08	0	0	2	1	0	0	0	0	2	2	není	
1018/11	2	2	0	0	0	0	2	2	1	2	není	na MRI drobná nespecifická ložiska
1067/11	0	0	1	0	1	0	2	2	1	1	těžká	
1314/11	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	mírná	poruchy autist. spektra, PMV postupuje
1384/11	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	?	
1400/11	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	není	gemini A z IVF (neznámý dárce spermatu), prematurita (31. t. g.)
1651/11-RP	0	0	1	2	1	0	2	2	1	1	střední	
1650/11	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1	mírná - střední	
1761/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	
1858/11	2	2	1	1	1	2	2	2	1	2	hraniční s mírnou	v.s. Aspergerův syndrom, terapie SEGA everolimem
1937/11	2	2	1	1	2	2	2	2	1	2	není	prenatální a perinatální komplikace
D26/12	2	2	2	1	2	0	2	2	1	1	střední	kombinovaná oční vada
D268/12	2	2	2	2	2	0	2	2	1	2	není	
D660/12-RP	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	?	
D444/12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	
D454/12	0	0	0	1	2	2	0	0	1	1	těžká	
D583/12	0	0	2	1	1	0	0	0	1	2	není	skvrny café au lait
D959/12	2	2	0	1	2	0	1	2	2	2	není	
D969/12	0	0	0	1	0	1	2	2	1	1	mírná	retroperitoneální lipomatóza, skleróza obratlů, alopecie

**Příloha 2: Pokračování tab. 2: Klinické projevy TSC pacientů, stanovená diagnóza a forma výskytu tuberózní sklerózy**

Číslo vzorku pacienta	Výskyt Sporadický/ Familiární	Diagnóza Definitivní/ Možná	Věk pacienta v době vyplnění registr. formuláře	Kůže						CNS			
				Adenoma sebaceum	Unguální fibromy	Fibrózní plaky čela	Hypomelan. skvrny (HS)	Počet HS	Šagrénové skvrny	Drobné kalcifikace	SEN	SEGA	Kortikální tubery, hamartomy
D1171/12	0	D	13 let	1	2	1	1	?	2	1	1	0	1
1105/08-RP	F	D	1 rok 8 měsíců	0	0	0	0	?	0	1	1	2	0
D1311/12	F	D	33 let	1	1	1	0	?	0	0	0	0	0
D1597/12	S	D	2 dny	2	2	2	2	0	2	2	1	0	2
D457/13	0	D	12 měsíců	2	2	2	1	15	2	1	1	0	1
D499/13	S	D	10 měsíců	1	2	2	1	10	2	2	1	0	1
D689/13	S	D	16 let	1	1	2	1	?	1	2	1	0	1
D693/13	S	D	2 roky 7 měsíců	2	2	2	1	7	2	0	1	0	1
D749/13	F	D	2 měsíce	0	0	0	0	?	0	2	2	2	1
D825/13-PR	F	M	33 let	2	2	0	2	0	2	2	2	2	1
D830/13	0	D	25 let	1	1	2	2	0	2	2	1	2	1
D835/13A	F	D	8 let	1	2	2	1	1	2	2	1	0	1
D836/13A-RP	F	D	36 let	1	1	2	1	4	2	2	1	2	1
D934/13	0	D	13 let	1	1	1	1	10	1	1	1	0	1
D1226/13	0	D	19 let	1	2	2	2	0	1	1	2	0	2
D1240/13	0	M	15 let	0	0	0	0	?	0	0	0	1	0
D1601/13	F	D	5 let 4 měsíce	1	2	2	1	?	2	2	1	0	1
D1600/13-RP	F	D	31 let	1	2	2	0	?	2	2	1	0	1
D1626/13	0	D	32 let	1	2	2	2	0	2	2	1	0	2
D1663/13	S	D	7 let	1	1	2	1	1	0	0	2	1	0
D1895/13	S	D	1 rok 8 měsíců	2	2	2	1	2	2	1	1	0	1
D1939/13	S	D	2 roky 7 měsíců	0	0	0	1	více než 3	0	1	1	2	1
D2082/13	F	M	1 měsíc	2	2	2	2	0	2	2	2	0	2
D21/14	0	D	31 let	0	1	1	0	?	0	0	0	0	0
D28/14	S	D	8 let 2 měsíce	0	0	0	1	1	0	0	2	1	1
D48/14	F	D	16 let	0	0	0	0	?	0	0	1	2	1
D49/14-RP	F	D	17 let	2	2	2	1	?	2	1	1	2	1
581/06-RP	F	M	24 let	2	2	2	2	0	2	1	1	2	2
D329/14	S	D	5 let 4 měsíce	1	2	2	1	7	2	2	1	0	1
D223/14	F	D	16 let	1	2	2	1	3	2	2	2	0	1

**Příloha 2: Pokračování tab. 2: Klinické projevy TSC pacientů, stanovená diagnóza a forma výskytu tuberózní sklerózy**

Číslo vzorku pacienta	Sítnice		Srdce	Ledviny		Pľíce	Ústa		Epilepsie	Mentální retardace	Závažnost mentální retardace	Jiné nálezy, popřípadě upřesnění nálezu uvedeného v registračním formuláři
	Depigmentace	Fakomy	Rhabdomyom/y	AMLs	Cysty	LAM	Gingivální fibromy	Dentální jamky				
D1171/12	0	0	2	1	2	2	2	2	1	1	?	autismus, obezita
1105/08-RP	2	2	1	0	0	2	2	0	1	1	těžká	centrální hypotonický syndrom, mikrocefalie, atrofie CNS ,porucha myelinizace, matka v graviditě užívala antiepileptika
D1311/12	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	?	subarachnoideální cysta, hemangiomy ledvin
D1597/12	0	0	1	0	0	2	2	2	2	0	?	
D457/13	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	mírná	
D499/13	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	není	
D689/13	2	2	1	1	2	0	1	2	2	2	není	
D693/13	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	?	
D749/13	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	?	
D825/13-PR	0	0	0	2	2	0	0	2	0	0	?	
D830/13	0	0	1	0	0	0	2	0	1	1	mírná	rhabdomyomatóza s regresí, WPW syndrom,
D835/13A	0	0	1	0	0	0	2	2	1	1	těžká	
D836/13A-RP	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	?	
D934/13	1	1	1	1	2	0	2	2	2	2	není	abnormální EEG, podprůměrné IQ
D1226/13	0	0	2	1	1	0	2	2	2	2	není	
D1240/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	
D1601/13	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	není	pouze 1 renální cysta, subarachnoidální cysty nad pravým frontálním lalokem
D1600/13-RP	0	0	2	1	1	2	2	2	0	0	?	
D1626/13	0	0	2	2	2	2	2	2	1	2	není	
D1663/13	2	2	1	1	1	2	1	0	1	0	?	behaviorální problémy - poruchy spánku,bázlivost
D1895/13	2	2	2	2	2	0	0	0	1	1	mírná	vážne rozvoj řeči
D1939/13	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	?	
D2082/13	0	0	1	2	2	2	2	2	2	2	není	UZ mozku - cysta intraventrikulárně
D21/14	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	?	
D28/14	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	?	
D48/14	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	?	
D49/14-RP	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	?	
581/06-RP	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	?	ve stěně žlučníku hyperech. útvar,1 cysta ledviny
D329/14	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	těžká	
D223/14	2	2	0	1	2	0	2	2	1	2	není	kortikální dysplazie

**Příloha 2: Pokračování tab. 2: Klinické projevy TSC pacientů, stanovená diagnóza a forma výskytu tuberózní sklerózy**

Číslo vzorku pacienta	Výskyt Sporadický/ Familiární	Diagnóza Definitivní/ Možná	Věk pacienta v době vyplnění registr. formuláře	Kůže						CNS			
				Adenoma sebaceum	Unguální fibromy	Fibrózní plaky čela	Hypomelan. skvrny (HS)	Počet HS	Šagrénové skvrny	Drobné kalcifikace	SEN	SEGA	Kortikální tubery, hamartomy
D225/14-RP	F	M	39 let	1	0	0	0	?	0	0	0	0	0
D581/14-RP	F	M	27 let	1	2	2	0	?	0	0	0	0	0
D403/14	S	D	10 let	1	0	0	1	?	0	1	2	2	1
D406/14	S	D	14 let	0	2	1	1	?	1	1	1	1	0
D655/14	S	D	10 měsíců	2	2	2	1	2	2	1	1	2	2
D827/14	F	D	21 let	2	1	1	2	0	2	1	2	0	1
D826/14-RP	F	D	41 let	1	2	2	2	0	2	1	2	0	2
D886/14	F	M	1 rok	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2
D941/14	0	D	17 let 8 měsíců	1	1	1	1	4	1	0	1	1	1
D1179/14	0	D	33 let	1	0	1	1	3	1	1	0	0	1
D1439/14	S	D	1 rok 7 měsíců	0	0	0	1	?	0	0	0	0	1
D1677/14	0	D	36 let	1	0	0	0	?	0	1	1	0	1
D1902/14	0	D	36 let	1	1	2	1	?	1	1	1	0	1
D2033/14	0	D	21 let	1	0	0	1	?	0	0	1	1	1
D4/15	S	D	25 let	1	2	0	1	?	1	0	0	0	1
D571/15	0	D	8 let	1	2	1	1	7	0	2	1	2	1
464/08	0	D	18 let	1	0	0	0	?	0	0	1	1	2
261/99-RP	F	M	3,5 roku	0	0	0	1	?	0	0	0	0	0
262/99	F	D	34 let	1	1	0	0	?	0	0	0	0	1
40/04	S	D	5 let	2	2	2	1	3	2	1	1	0	2
1126/07	S	D	10,5 let	2	2	2	1	15	2	2	2	0	1
695/07	S	M	1 měsíc	2	2	2	2	?	2	0	0	0	0
D2136/13	0	D	11 let	1	0	0	1	?	0	0	0	0	1
4/09	S	D	25 let	1	1	0	0	?	0	0	0	0	0
117/98	F	D	7 let	0	0	0	1	?	0	1	0	1	0
115/98-RP	F	M	31 let	1	0	0	1	?	0	0	0	0	0

**Příloha 2: Pokračování tab. 2: Klinické projevy TSC pacientů, stanovená diagnóza a forma výskytu tuberózní sklerózy**

Číslo vzorku pacienta	Sítlice		Srdce	Ledviny		Plíce	Ústa		Epilepsie	Mentální retardace	Závažnost mentální retardace	Jiné nálezy, popřípadě upřesnění nálezu uvedeného v registračním formuláři
	Depigmentace	Fakomy	Rhabdomyom/y	AMLs	Cysty	LAM	Gingivální fibromy	Dentální jamky				
D225/14-RP	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	není	
D581/14-RP	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	?	
D403/14	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	?	dítě je z dvojčat, po IVF
D406/14	2	1	1	2	1	0	0	0	1	1	těžká	
D655/14	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1	mírná	
D827/14	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	není	
D826/14-RP	1	2	2	1	1	1	2	2	2	2	není	
D886/14	2	2	1	0	0	0	2	2	1	2	není	
D941/14	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	?	pouze 1 susp. fibrom na prstu
D1179/14	0	0	0	1	0	0	2	1	1	2	není	epilepsie v dětství, od 18 let bez léčby
D1439/14	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	není	oblast velmi susp. kortikální dysplazie + poruchy gyrifikace a migrace šedé hmoty
D1677/14	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	mírná	angioliplom jater, kožní léze typu confetti
D1902/14	2	1	0	0	0	0	1	0	2	2	není	
D2033/14	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	těžká	
D4/15	0	0	0	0	0	0	2	0	1	2	není	epileptochirurgická operace
D571/15	2	2	1	2	2	2	0	2	1	1	mírná-střední	
464/08	0	0	2	2	2	0	0	0	1	0	?	navštěvuje zvláštní školu
261/99-RP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	skvrny cafe-au-lait
262/99	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	?	
40/04	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	není	skvrny cafe-au-lait
1126/07	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	není	regrese rhabdomyomu
695/07	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	?	vazivový útvar ve sklivci
D2136/13	0	0	2	0	0	0	0	0	1	1	?	
4/09	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	?	skvrny cafe-au-lait
117/98	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	není	
115/98-RP	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	?	

**Vysvětlivky:** TSC probandi jsou značeni pouze číslem, rodinní příslušníci probandů nesou za číslem vzorku zkratku RP. Pod sebou umístěná políčka s šedým pozadím reprezentují příslušnou rodinu. 1 – znak je přítomen, 2 – znak není přítomen, 0 – není znám údaj (pacient nebyl vyšetřen, popřípadě nález byl nejasný), ? – nebyl stanoven počet hypomelanotických skvrn, nebyl poskytnut údaj o závažnosti mentální retardace.