

1. ÚVOD

Tématem vrozených vývojových vad se lidstvo zabývá odjakživa. Postupně se však pohled na ně s přibývajícím znalostmi měnil. Od démonizovaného pohledu na jedince postižené vývojovou vadou jsme se dostali do doby, kdy je výskyt vrozené vývojové vady stále nechtěnou a neradostnou událostí, ale zejména jejich vzniku a příčinám rozumíme mnohem více. Stále sice nejsme schopni vývojové vady léčit, nicméně dokážeme určit rizika jejich vzniku, případně přijmout opatření, která vznik vývojové vady mohou minimalizovat.

Rozvíjením modernějších metod, nových typů vyšetření a celkovým pokrokem vědy získáváme informace o příčinách vývojových vad, které nám byly dosud skryty, což dělá z tématu vývojových vad téma aktuální.

Ke zpracování jsem si v tomto kontextu tedy vybrala vady, které s tímto pokrokem souvisí. Mikrodelece a mikroduplikace jsou poměrně novými diagnózami právě proto, že jsme po dlouhou dobu byli schopni detekovat pouze abnormality v počtu chromozomů, ne však v jejich struktuře. RASopatie tvoří skupinu diagnóz týkajících se mutace genů jedné signální kaskády, kde může jít o mutace v různých genech, avšak s podobnými fenotypovými projevy. Bez specifitějších metod bychom také nebyli schopni diagnózu určit. Dále jsem věnovala část práce problematice thalidomidu, jelikož působení teratogenů na plod při jeho vývoji je často diskutovaným tématem především ve spojitosti s životním prostředím a životním stylem. Zároveň neustále vznikají nové hypotézy ohledně mechanismu jeho působení, a v neposlední řadě je předmětem výzkumu v odvětvích léčby lepry, myelomů či dalších závažných chorob.

Cílem této práce je stručné rozdělení vrozených vývojových vad podle jejich mechanismu, četnosti a příčiny vzniku, a na základě literární rešerše zahraniční odborné literatury a zdrojů definovat molekulární podstatu některých onemocnění zastupujících vybrané kategorie genetických příčin a vnějších vlivů.

2. ROZDĚLENÍ VROZENÝCH VÝVOJOVÝCH VAD

Podle mechanismu můžeme vývojové vady rozdělit následovně:

Malformaci rozumíme vrozenou vývojovou vadu tvaru, která vzniká během nitroděložního vývoje zárodku. Patří mezi ně například rozštěpy, polydaktylie, ageneze, aplazie apod.

Za **deformaci** označujeme změnu tvaru orgánu či tkáně, které byly doposud zdravé a normálně se vyvíjející a k poškození došlo působením fyzické síly.

Pokud dojde k narušení normálního vývoje ne fyzickou silou, ale patologickým procesem, hovoříme o **disrupci**.

Dysplasie je taková porucha růstu a vývoje, ke které dochází na histologické úrovni, tzn. dojde k poruchám uspořádání buněk. (Vokurka, Hugo, *Velký lékařský slovník*, 2009; Gregor et al., *Vrozené vývojové vady*, web 1)

Podle četnosti se vývojové vady dělí na:

Isolované vady, jež jsou vadami, které nejsou spojované s jinou vadou.

Naopak lze pak najít **asociace**, což jsou vady, které se vyvíjí spolu s dalšími typickými vadami v asociaci.

Sekvence jsou mnohočetné vady, které jsou následkem patologického zásahu, jenž poruší celou kaskádu dějů.

Syndromem označujeme komplexně soubor fenotypových projevů dané diagnózy.

Dle příčiny vzniku vývojových vad je rozdělujeme následovně:

2.1 Genetické příčiny

2.1.1 Chromozomální aberace

Do této skupiny vrozených vad patří ty, které jsou způsobeny mutací na genomové úrovni či na úrovni struktury chromozomů. Jako zástupci této skupiny jsou popsány mikrolece a mikroduplikace na chromozomu 17, konkrétně na jeho krátkém raménku.

2.1.2 Monogenně podmíněné vrozené vady

Ze skupiny monogenně podmíněných vrozených vad, tedy mutací v jednom genu, jsou rozebrány RASopatie. V této kaskádě dochází hned k několika monogenním mutacím, které vedou k celé skupině diagnóz.

2.1.3 Multifaktoriálně podmíněné vrozené vady

V případě multifaktoriálně podmíněných mutací se uplatňují jak vlivy genetických mutací, tak vlivy faktorů vnějšího prostředí. Právě díky této kombinaci se jedná o velmi rozsáhlou skupinu vrozených vývojových vad.

2.2 Vnější faktory

Za vnější faktory vzniku vývojových vad jsou považovány teratogeny biologického, chemického nebo fyzikálního charakteru. Jde o látky či procesy, které riziko vzniku vývojových vad mohou zvyšovat nebo tento vznik přímo způsobovat.

Mezi **biologické teratogeny** řadíme původce infekčních onemocnění. Nejčastěji tedy viry a bakterie. Nebezpečné pro vývoj plodu však mohou být i onemocnění matky, mezi které se řadí například diabetes mellitus, fenylketonurie a další.

Za **chemické teratogeny** je považována řada chemických látek počínaje technickými (rozpouštědla, barviva, těžké kovy), přes léčiva a léčivé přípravky až po návykové látky, alkohol a drogy. Z léčiv můžeme jmenovat antibiotika, cytostatika, antiepileptika, warfarin a další.

Teratogeny fyzikální povahy jsou různé druhy záření, ať už RTG či jiná ionizující, poté například vysoká teplota způsobená horečkou nebo přehřátím matky nebo mechanické poškození plodu.

Na tom, jaká či zda vůbec vývojová vada působením teratogenu vznikne, má svůj podíl **faktor dávky**. Tedy menší dávky mohou způsobit mírnější vadu. Velmi důležitým faktorem při vystavení se působení teratogenu je **faktor času**. Rozeznáváme zde takzvanou kritickou periodu, která je pro každý teratogen jiná. Záleží vždy na čase podání (například léku) a na tom, která soustava plodu se právě vyvíjí a zda může tato látka vývoj ovlivnit.

Faktorem genetické výbavy a druhu pak rozumíme rozdílnou citlivost různých živočišných druhů na daný teratogen. Tento faktor je nutno brát v úvahu především v klinických studiích léků (Gregor et al., *Vrozené vývojové vady*, web 1).

Tomuto tématu věnuji kapitolu o thalidomidu, který patří do skupiny chemických teratogenů.

3. MIKRODUPLIKACE A MIKRODELECE OBLASTI 17p11.2

3.1 Chromozom 17

Chromozom 17 patří mezi krátké submetacentrické chromozomy skupiny E. Hustotou genů se řadí na druhé místo v lidském genomu (Grimwood et al., 2004), z čehož vyplývá také velké množství geneticky podmíněných chorob vázaných právě na tento chromozom (Zody et al., 2006).

V této části práce bych se chtěla věnovat duplikaci dlouhé 3,7 Mb na krátkém raménku tohoto chromozomu, konkrétně v oblasti 17p11.2, která způsobuje syndrom Potocké – Lupského (PTLS), a jejíž reciproká delecce zapříčiňuje syndrom Smithové – Magenisové (SMS) (Potocki et al., 2007). Jde o nealelické homologní rekombinace (NAHR) mezi specifickými úseky ohraničenými LCR (low copy repeats) (Hurles, Lupski, 2006).

3.2 Mikroduplikační a mikrodeleční syndromy

Během několika posledních let se počet nalezených mikroduplikačních a mikrodelečních syndromů (MMS) zvýšil. (Obr. 1) Dříve byly tyto syndromy označovány jako CGS (contiguous gene syndromes), protože se mělo za to, že je způsobuje více genů ležících blízko sebe. Nyní se ale ukazuje, že jde často právě o jeden gen z deletované či duplikované části, který je citlivý na dávku, a tak zapříčiňuje nejvíce z fenotypových projevů daného syndromu, jako se ukázalo například u výše zmíněných SMS, PTLS a genu *RAI1* (Weise et al., 2012).

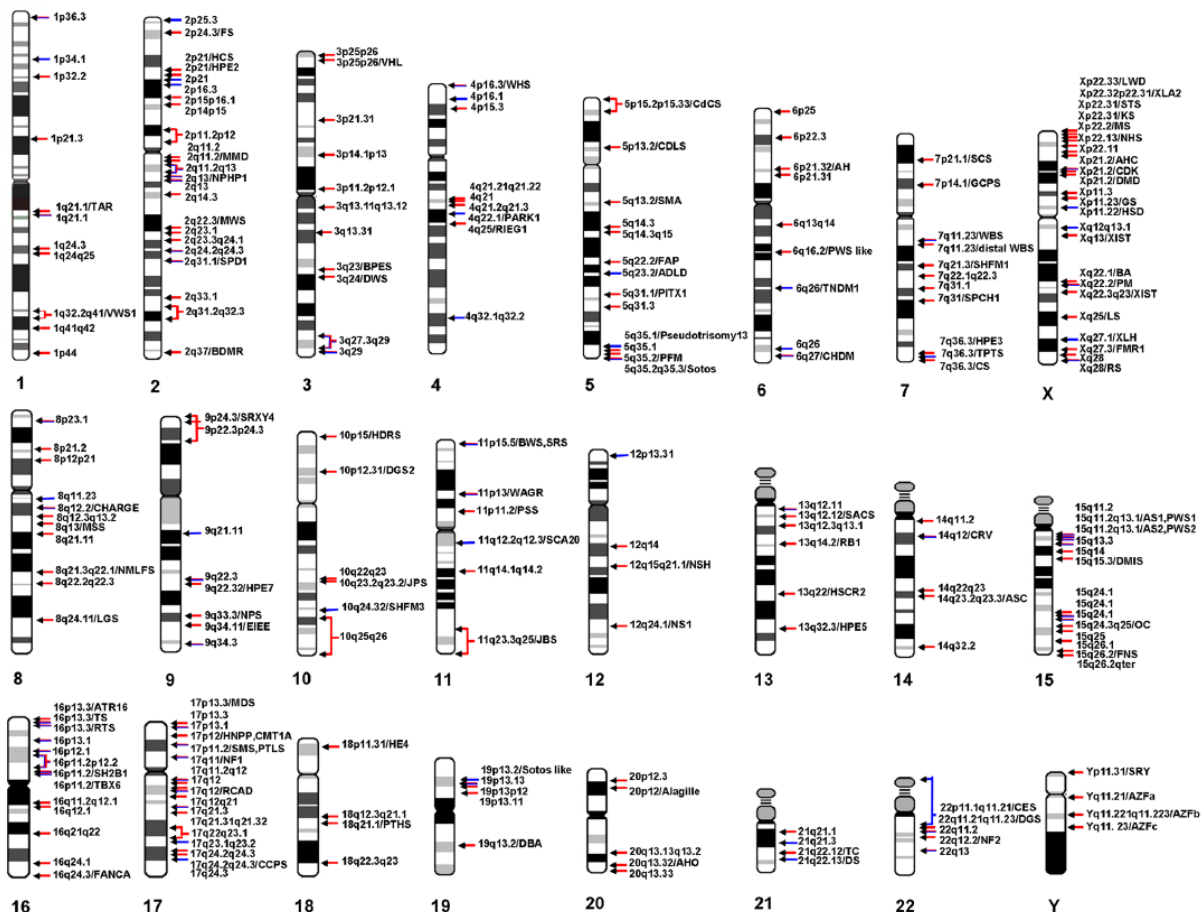
Velmi důležitým aspektem v rozvoji diagnostiky těchto syndromů je i použití více specifických metod. Výhodou těchto metod (FISH, MLPA, aCGH) jsou jejich rychlost a cena. Například pokud porovnáme použití MLPA a WGS (whole genome sequencing), dostaneme při stejných nákladech za použití MLPA až třikrát více informací (Jehee et al., 2011).

3.2.1 FISH

Fluorescenční *in situ* hybridizace je metoda využívající fluorescenčních sond, kterými lze na základě vysoké komplementarity označit konkrétní sekvenci na chromozomu. Díky její specifčnosti je využívána k potvrzení nebo k vyvrácení předpokládané diagnózy získané méně specifickou metodou. Mezi její nesporné výhody patří schopnost stanovit diagnózu i z jediné buňky za přítomnosti chromozomů v metafázi (Weise et al., 2012).

3.2.2 MLPA

Z anglického „multiplex ligation-dependent probe amplification“ je metoda molekulární cytogenetiky, která využívá principu PCR. Její velkou výhodou je amplifikace až několika desítek lokusů najednou za potřeby pouze malého množství DNA ve vzorku (Schouten et al., 2002).



Obrázek 1

Na tomto schématu jsou shrnuty všechny mikrodelece a mikroduplikace, které se dosud vyskytly alespoň dvakrát. Červené šipky označují mikrodelece, modré mikroduplikace, fialové pak reciproké mikroduplikace a mikrodelece (převzato z Weise et al., 2012). Můžeme si všimnout opravdu velkého množství mikroduplikací a mikrodeleci právě na chromozomu 17.

3.3 Syndrom Potocké – Lupského (PTLS)

Je pojmenován po Lorraine Potocké a Jamesu Lupském, kteří ho definovali jako reciprokou mikroduplikaci k syndromu Smithové – Magenisové (Potocki, 2007) s výskytem přibližně 1:15 000 – 25 000 (Treadwell-Deering et al., 2010).

3.3.1 Fenotypové znaky

Příznaky PTLs jsou zpozorovatelné už v novorozeneckém a dětském věku, kdy děti špatně prospívají, trpí psychomotorickou retardací a mají horší komunikační schopnosti. Dále k projevům choroby patří poruchy autistického spektra, poruchy spánku a dýchání, kardiovaskulární anomálie a dalekozrakost. Rozeznáváme zde širší čelo, špičatý nos a téměř absenci nosoretní rýhy. (Obr. 2) Méně často se pak objevuje snížená hladina cholesterolu v krvi a snížená funkce štítné žlázy. Ne vždy se příznaky projeví v plném rozsahu, většinou jde o jejich variantní kombinace (Potocki et al., 2007).



Obrázek 2

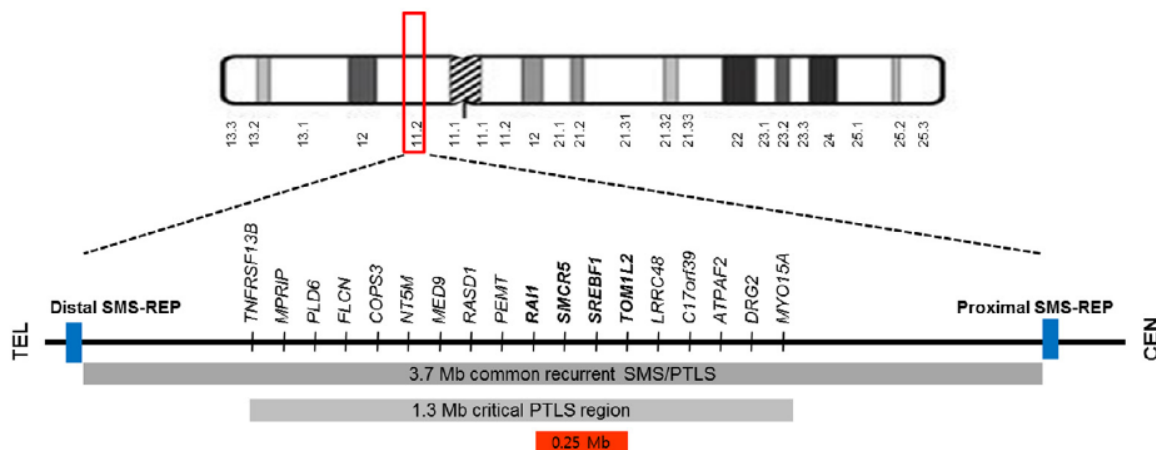
Fotky pacientů s PTLs ve věku (A) 8 měsíců, (B) 3 roky, (C) 10 let, (D) 28 let, (E) 6 měsíců, (F) 6 let, (G) 10 let, (H) 19 let. V případech A-D jde o děvče, u E-H o chlapce. (převzato a upraveno z Neira-Fresneda, Potocki, 2015)

3.3.2 Molekulární podstata onemocnění

Duplikovaný úsek se nachází mezi dvěma LCR úseky. Prvním úsekem je proximální SMS-REP, dlouhý ~256 kb, druhým pak SMS-REP distální o délce ~176 kb. Tyto dva úseky jsou stejně orientované. Mezi nimi se nachází ještě třetí úsek, orientovaný opačně, prostřední SMS-REP, dlouhý ~241 kb. Pokud porovnáme sekvence proximálního a distálního úseku, najdeme hned čtyři oblasti shodné na více než 95 %, z toho tři na více než 98 %. Prostřední SMS-REP má téměř stejnou sekvenci jako proximální úsek (až na malé delece a duplikace), avšak s opačnou orientací (Park et al., 2002).

Přibližně u 60 % pacientů s PTLs je nalezena duplikace celého úseku 3,7 Mb. Kritická oblast je pak dlouhá 1,3 Mb a zahrnuje 18 genů (Shchelochkov, Cheung, Lupski, 2010). (Obr. 3) Nejkratší mikroduplikace, která se prozatím vyskytla, byla o délce 0,25 Mb (Lee et al., 2013). Kritická oblast se rozkládá mezi distálním úsekem SMS-REP a oblastí vzdálenou 200 kb směrem k telomeře od úseku prostředního (Potocki et al., 2007).

Nejspíše nejdůležitějším z 18 obsažených genů v této oblasti je gen *RAI1* (kódující RAI1 protein – retinoic acid induced protein), který se nachází přibližně uprostřed kritické oblasti (Carmona-Mora, Walz, 2010). Vzhledem k vyšší expresi v srdci a mozku je zároveň zodpovědný za většinu fenotypových projevů PTLs (Shchelochkov, Cheung, Lupski, 2010). Tuto teorii podporuje také další studie, která zjistila, že gen *RAI1* se jako jediný vyskytuje v 125 kb sekvenci, která vznikla srovnáním duplikovaných oblastí a byla společná pro všechny pacienty dané studie (Zhang et al., 2010).



Obrázek 3

Zde můžeme vidět celý 3,7 Mb dlouhý úsek mezi distálním a proximálním SMS-REP (vyznačeny modře) a zároveň vymezení kritické oblasti s rozepsanými geny. Červeně je pak znázorněna dosud nejmenší zaznamenaná duplikace o 0,25 Mb. (převzato z Lee et al., 2013)

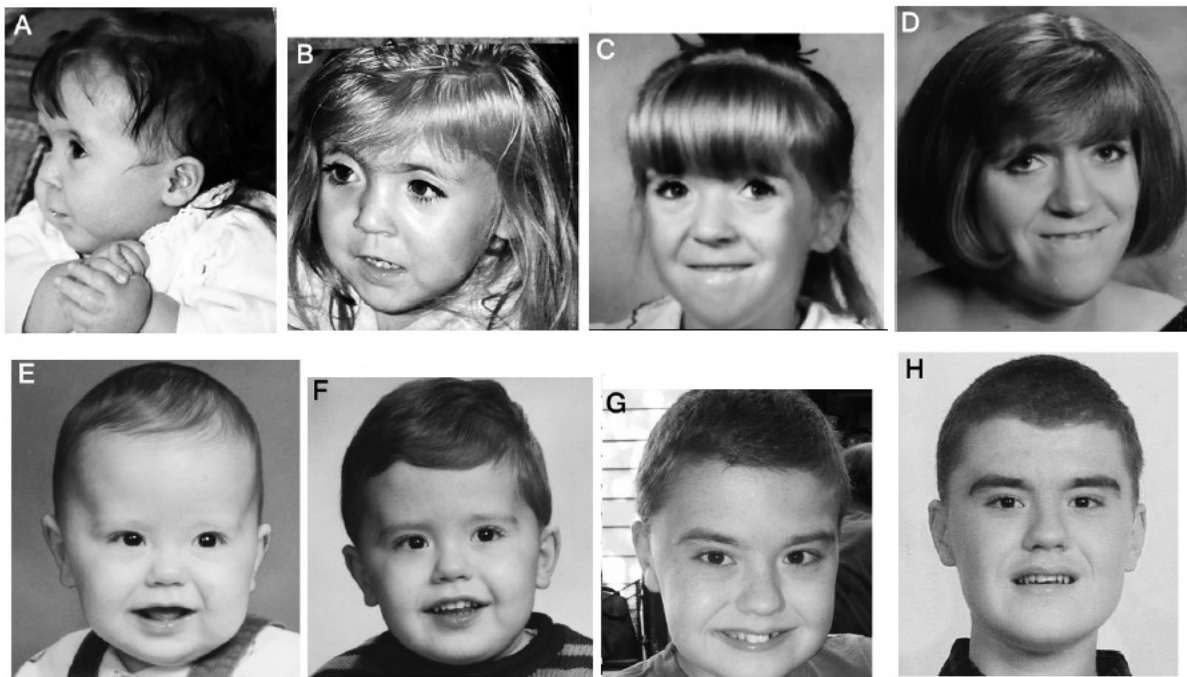
3.4 Syndrom Smithové – Magenisové (SMS)

Tento syndrom nese jméno své objevitelky Ann Smithové, která syndrom se svými kolegy v roce 1982 poprvé popsala, a Ruth Ellen Magenisové, která se podílela na jeho pozdějším výzkumu (Smith et al., 1986).

3.4.1 Fenotypové znaky

Všeobecně můžeme říci, že u SMS můžeme pozorovat horší fenotypové projevy mutace než u PTLs (Potocki et al., 2007).

Kvůli patrným dysmorfiiím v kraniofaciální oblasti (Obr. 4), hypotonii a opožděnému vývoji je taktéž toto onemocnění možno rozpoznat již v raném věku. Pacienti trpí poruchami zraku a sluchu, neméně časté jsou pak poruchy spánku (Neira-Fresneda, Potocki, 2015). Právě tyto příznaky jsou připisovány přítomnosti pouze jedné alely genu *RAI1* (Slager, 2003). U více než 35 % pacientů je opět postiženo srdce (Neira-Fresneda, Potocki, 2015).



Obrázek 4

Fotky pacientů se SMS ve věku (A) 7 měsíců, (B) 2 roky, (C) 9 let, (D) 21 let, (E) 23 měsíců, (F) 3 let, (G) 12 let, (H) 17 let. V případech A-D jde o děvče, u E-H o chlapce. (převzato a upraveno z Neira-Fresneda, Potocki, 2015)

3.4.2 Molekulární podstata onemocnění

Na rozdíl od Potocké – Luského syndromu, kdy dochází k duplikaci v oblasti 17p11.2, jde v případě syndromu Smithové – Magenisové o delecí 3,6 Mb dlouhého úseku.

Důvodem pro celkově horší následky mikrolece než mikroduplikace je citlivost na dávku u *RAI1* (Carmona-Mora, Walz, 2010).

Ke studiu fenotypů byla využita homologie kritického úseku pro SMS, která se u myši nachází na chromozomu 11 (Bi et al., 2002). Myši s mikroduplikací byly výrazně hubenější, aktivnější a méně bázlivé, naopak ty s delecí trpěly většími kraniofaciálními abnormalitami, byly výrazně obézní a línější (vše ve srovnání s divokým typem) (Walz et al., 2003, 2004, 2006).

4. RASOPATIE

Tvoří skupinu monogenně podmíněných vývojových vad, v jejímž případě dochází k mutacím v genech Ras/MAPK kaskády.

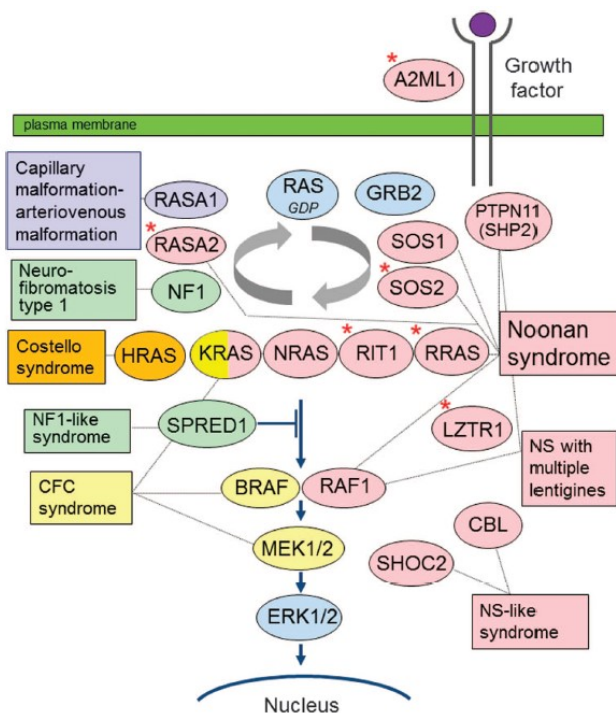
4.1 Ras/MAPK kaskáda

Ras protein je členem skupiny malých GTPáz, jejichž úlohou je přenos signálu z vnější membrány k efektorovým proteinům uvnitř buňky (Malumbres, Barbacid, 2003; shrnuto v Aoki et al., 2015). Jeho aktivovaná forma s navázanou molekulou GTP místo GDP se účastní signální dráhy MAP kináz (Rauen, 2013).

Mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) tvoří důležitou složku kaskád, které se uplatňují v regulaci vývoje buňky, její diferenciaci, proliferaci a buněčné smrti. Neméně důležitou úlohu hrají v embryogenezi. Proto každá mutace v MAPK kaskádě může být kritická pro správný vývoj (Pearson, 2001).

Ras/MAPK kaskáda je jednou z nejprozkoumanějších kaskád přenosu signálu v buňce právě proto, že gen kódující protein Ras patří mezi protoonkogeny. Jeho mutace, a tudíž porušení této signální kaskády, patří mezi hlavní příčiny rakoviny (Rauen, 2013).

Mezi nejčastější RASopatie se řadí neurofibromatóza typu 1, která byla zároveň první objevenou, dále syndrom Noonanové (NS) a jeho příbuzné varianty: NS-like syndrom a NS s mnohočetnými pihami (dříve nazýván LEOPARD syndrom), syndrom kapilárních a arteriovenózních malformací CV-AVM, Costello syndrom a CFC (kardio-facio-kutánní) syndrom (Aoki et al., 2008, 2015).



Obrázek 5

Schéma Ras/MAPK kaskády s rozlišením jejich potenciálně poškozených částí ve vztahu ke konkrétním chorobám. Hvězdičkou jsou označeny nově (od roku 2013) spojované geny s touto diagnózou. (převzato z Aoki et al., 2015)

4.2 Syndrom Noonanové

Syndrom Noonanové (NS) je autozomálně dominantním onemocněním s incidencí přibližně 1 na 1000–2000 novorozenců (Rauen, 2013). Ačkoliv se jedná o dědičné onemocnění, až 60 % případů vzniká mutací *de-novo* (Shaw et al., 2006). Je pojmenován podle dětské kardioložky Jacquelin Noonanové, která v 60. letech jako první uvedla spojitost mezi symptomy a jejich výskytem u obou pohlaví (Romano et al. 2010).

4.2.1 Fenotypové znaky

Charakteristickými fenotypovými znaky postižených jedinců jsou velká hlava s malým obličejem a očima daleko od sebe, vysoké čelo, ptóza očních víček, hlubší nosoretní rýha a nízko postavené, odstávající uši. (Obr. 6) Obvyklý je nižší vzrůst. Za pravděpodobně nejdůležitější znak pro stanovení diagnózy jsou považovány malformace srdce (hypertrofická kardiomyopatie). Dále u pacientů můžeme vidět poruchy krvácivosti či deformity hrudníku a páteře. V neposlední řadě hrozí postiženým touto chorobou vyšší riziko vzniku nádorového onemocnění (Rauen, 2013; Romano et al., 2010).



Obrázek 6

Pacient postižený NS. Zleva ve věku 10 dní, 6 měsíců a 2 let. (převzato a upraveno z Romano et al., 2010)

4.2.2 Geny asociované s NS

V následující tabulce jsou shrnuty geny Ras/MAPK kaskády, jejichž mutace způsobují NS a příbuzné syndromy. V dalších kapitolách se věnuji konkrétním genům asociovaným s NS.

Syndrom Noonanové	gen Ras/MAPK kaskády	Lokace na chromozomu	Protein	Funkce proteinu
	<i>PTPN11</i>	12q24.1	SHP2	fosfatáza
	<i>SOS1</i>	2p22.1	SOS1	RasGEF
	<i>RAF1</i>	3p25.1	CRAF	kináza
	<i>KRAS</i>	12p12.1	KRAS	GTPáza
	<i>NRAS</i>	1p13.2	NRAS	GTPáza
NS-like syndrom	<i>SHOC2</i>	10q25.2	SHOC2	scaffold protein
	<i>CBL</i>	11q23.3	CBL	E3 ubiquitin ligáza
Syndrom Noonanové s mnohočetnými pihami	<i>PTPN11</i>	12q24.1	SHP2	fosfatáza
	<i>RAF1</i>	3p25.1	CRAF	kináza

Tabulka 1, upravena a vytvořena podle Rauen, 2013 a Aoki et al., 2015

PTPN11

Gen *PTPN11* je genem kódujícím enzym PTPN11 (tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11), jinak také PTP Shp2. Katalytická aktivita tohoto enzymu je řízena dvěma SH2 doménami (Freeman, Plutzky, Neel, 1992). Obě dvě jsou navázány na fosfatázu. Zatímco C-koncová SH2 doména v jeho aktivaci žádnou roli nehraje, N-koncová SH2 doména je navázána na fosfatázu tak, že blokuje její aktivní centrum a tím blokuje přístup substrátu a dojde k inhibici. PTP je aktivována, když se N-SH2 doména naváže na fosfoproteiny a uvolní tak přístup k aktivnímu centru (Hof et al., 1998). Enzym PTP je exprimován v mnoha tkáních a je součástí několika signálních procesů, které jsou důležité pro funkce, jako jsou např. mitogenní signalizace, regulace transkripce a migrace buněk (NCBI Gene (5781) – web 2). Zároveň bylo zjištěno, že PTP Shp2 má také tumor-supresorovou funkci, což by při mutaci *PTPN11* vysvětlovalo častý výskyt rakoviny u pacientů se syndromem Noonanové (Bard-Chapeau et al., 2011).

SOS1

Zatímco mutaci v genu *PTPN11* můžeme pozorovat u více než 50 % postižených NS, mutaci v genu *SOS1* nalezneme asi u 28 %, což ho řadí na druhé místo (Zenker et al., 2007). Gen *SOS1* kóduje RasGEF, což je membránový protein, který řídí výměnu GTP a GDP, které se váží na Ras protein a tím dochází k jeho aktivaci či inaktivaci (NCBI Gene (6654) – web 3).

RAF1

Gen *RAF1* kóduje protoonkogenní serin-threonin kinázu, která aktivuje MEK1 a MEK2 (Pandit et al., 2007). Odstraněním tohoto proteinu dojde ke snížení senzitivity buňky k apoptóze, aniž by se porušila regulace extracelulárního signálu, což naznačuje možnost ještě jiné regulace apoptózy (O'Neill et al., 2004).

Jeho další funkcí je řízení buněčné proliferace a diferenciaci. Vzhledem k tomu, že jde opět o protoonkogen, jeho mutace může mít za následek rakovinné bujení (UniProtKB (P04049) – web 4).

KRAS a NRAS

Oba tyto geny (společně ještě s *HRAS*) patří do skupiny Ras genů. Tyto geny kódují malé GTPázy, které hrají úlohy molekulárních „vypínačů“. Pomocí RasGEF dochází k záměně GDP za GTP a tím dojde k aktivaci RAS proteinů, které aktivují další složky kaskády, například kinázy, které jsou kódovány genem *RAF1*, a tím se uplatňují v Ras/MAPK kaskádě.

Mutace v těchto genech patří k těm méně častým, například incidence mutace v genu *KRAS* je méně než 5 % (Roberts et al., 2007).

Nedávno byly s RASopatiemi spojeny další geny, mezi nimi *RITI*, *RRAS*, *RASA2*, *A2ML1*, *SOS2* a *LZTR1* (Obr. 5, označeno hvězdičkou) (Aoki et al., 2015).

4.2.3 NGS

Co se týče diagnostiky těchto onemocnění, nalézáme právě v tomto odvětví velkou výhodu v sekvenování nové generace (NGS). Jak bylo již zmíněno, fenotyp u RASopatií se často překrývá, což znesnadňuje výběr genu k vyšetření Sangerovou metodou a posléze určení přesné diagnózy. Použitím NGS můžeme vyšetřit hned několik genů současně (Lepri et al., 2014).

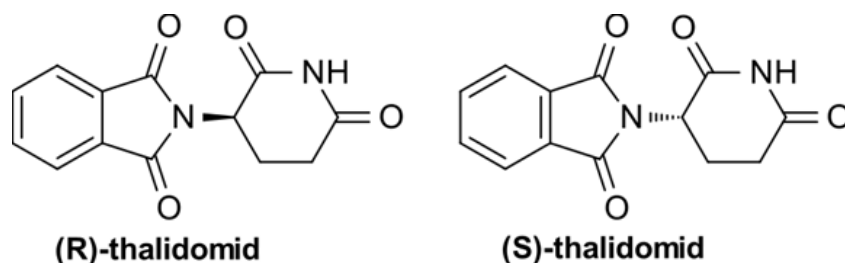
5. THALIDOMID

Lék vyráběný německou firmou Chemie – Grünenthal byl původně využíván jako sedativum, hypnotikum a prostředek k úlevě od ranních těhotenských nevolností, později se jeho užívání ukázalo jako jedna z největších katastrof v historii medicíny.

Nyní se používá v léčbě lepry, vícečetného myelomu, Crohnovy choroby či HIV (Vargesson, 2015).

5.1 Chemická struktura

Strukturně je thalidomid derivátem kyseliny glutamové, složen z glutarimidového a phtalimidového kruhu. (Obr. 7)



Obrázek 7

Převzato a upraveno z: [online, 14. 8. 2017,

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/86/Thalidomide-racemate2DCSD.svg>]

Klinicky byla využívána racemická směs S (-) a R (+) izomerů, avšak každý z nich má jiné účinky. Zatímco R (+) izomer se jeví jako účinné sedativum, S (-) izomer je odpovědný za teratogenní účinky. Právě kvůli vzájemnému přechodu z jednoho izomeru na druhý probíhajícímu za fyziologických podmínek není možno použít pro klinické účely jen jeden z nich (Franks, Macpherson, Figg, 2004).

5.2 Historie

Thalidomid byl syntetizován v roce 1954 švýcarskou farmaceutickou firmou CIB. Pod více než 37 názvy byl předepisován ve 46 zemích po celém světě (Vargesson, 2009) krom USA, kde nebyl schválen „Food and Drug Administration“ (Franks, Macpherson, Figg, 2004).

Pod komerčním názvem Contergan byl uveden na trh v Německu roku 1957, v dubnu 1958 jako Distaval (Obr. 8) ve Velké Británii a Rakousku, dále např. jako Softenon v dalších zemích Evropy (Vargesson, 2009; Smithells, Newmann, 1992). V Československu nebyl nikdy registrován (Infolisty SÚKL, 2012).

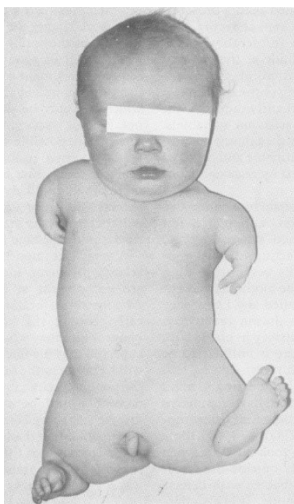


Obrázek 8

A: přední strana obalu, B: zadní strana obalu obsahující upozornění o bezpečnosti a absenci vedlejších účinků, C: vnitřní strana balení s doporučeným dávkováním a tabletami, (převzato z Vargesson, 2009)

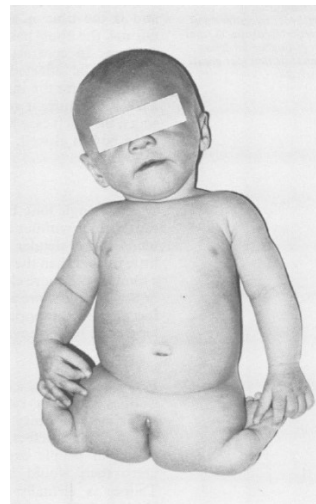
Jednou z výhod tohoto léčiva bylo, že v případě nadměrného užití či předávkování nezpůsobil smrt, ale jen delší spánek. Nejen díky tomu byl v kombinaci s dalšími látkami podáván také jako Asthaval pro léčbu astmatu, Tensival na hypertenzi či Valgraine při migréně (Smithells, Newmann, 1992).

V roce 1960 však němečtí pediatři a genetici zaznamenali nárůst neobvyklých malformací končetin u novorozenců. (Obr. 9 a 10)



Obrázek 9

9: Symetrická redukce všech končetin se ztrátou prstů horních končetin, hypoplastické skrotum.



Obrázek 10

10: Redukce dolních končetin, hypoplazie labií, horní končetiny normální délky s prodlouženými palci. (obojí převzato ze Smithells, Newmann, 1992)

V listopadu roku 1961 navrhnul Widukind Lenz spojitost mezi výskytem deformit a užíváním thalidomidu těhotnými. Stejná myšlenka byla v prakticky stejnou dobu vyslovena Williamem McBridem v Austrálii. Potvrzení této domněnky okamžitě přišlo ze všech kontinentů včetně USA, kde zatím lék nebyl uveden do prodeje, ale byl pouze testován v klinických studiích (Smithells, Newmann, 1992).

Celkové odhady počtu postižených dětí těmito deformitami sahají přes 10 000 (Therapontos et al., 2009). Kromě defektů končetin šlo také o další malformace uvedené v Tabulce 2.

Malformace končetin		79-89 %
z toho	fokomelie ¹ všech končetin	9,70 %
	defekty horních a zároveň dolních končetin	11,50 %
	fokomelie horních končetin + normální dolní končetiny	37 %
	defekty dolních končetin	8,40 %
	ostatní defekty (např. ztráta prstů)	23 %
Jiné orgánové defekty (uší, genitálií, ledvin, GITu, NS)		11-21 %
Malformace končetin spolu s dalšími orgánovými defekty		18 %

Tabulka 2

Úmrtnost dětí s tímto postižením v prvním roce života byla zvýšena o 40 %.

Tabulka obsahuje shrnutí dat publikovaných v letech 1958–1962 ve Velké Británii, 1956–1962 v Německu a 1969–1995 v Jižní Americe. Zahrnuje nejčastěji se vyskytující defekty způsobené užitím léku během těhotenství. Vzhledem k diagnostickým možnostem v 50. a 60. letech může být procento výskytu defektů vnitřních orgánů podhodnoceno (převzato a přeloženo z Vargesson, 2009).

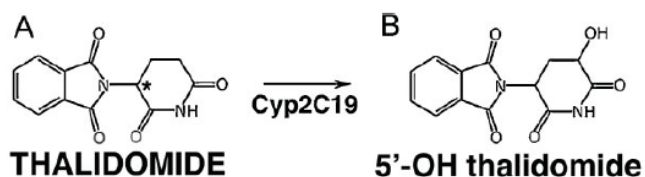
Kromě malformací končetin však může docházet také k defektům téměř všech orgánů. Nejčastěji jsou postiženy uši, oči, nervový systém obličeje, z vnitřních orgánů pak srdce, ledviny a uro-genitální a trávicí systém. Vysoká novorozenecká úmrtnost a potratovost byly

¹ Fokomelie – malformace končetin, kdy nohy a ruce jsou zdánlivě dobře vyvinuty, ale nasedají přímo na trup. Je přítomna rudimentární kostra proximálních částí (Vokurka, Hugo, *Velký lékařský slovník*, 2009).

nejčastěji způsobeny závažnými malformacemi vnitřních orgánů, z čehož vyplývá i nižší procento výskytu těchto malformací u přeživších (Smithells, Newmann, 1992).

5.3 Mechanismus účinku

Aby se thalidomid stal aktivním, musí dojít k jeho metabolickému rozpadu, což nastává v játrech pomocí cytochromů P450 (CYP), konkrétně CYP2C19 (Ando, Fuse, Figg, 2002). (Obr. 11)

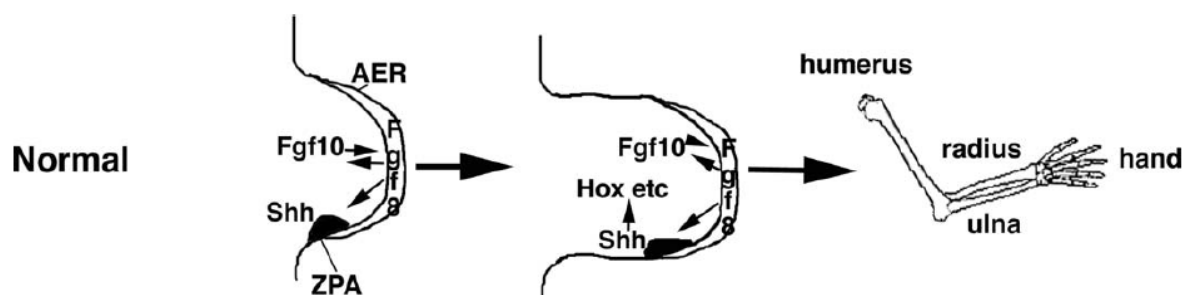


Obrázek 11 (převzato z Vargesson, 2009)

Důvodem, proč byly nejčastěji postiženy končetiny, je právě období těhotenství, ve kterém docházelo k podání léku. Růst končetin v lidském embryu probíhá od 23. dne od početí přibližně do 55. dne (4.–9. týden těhotenství). Kritická perioda k účinkům thalidomidu nastává mezi 20. a 36. dnem po početí. Jeho indikace pro úlevu od ranních nevolností probíhala ve 4.–10. týdnu těhotenství, což časově tomuto období odpovídá (Vargesson, 2009).

Růst končetiny z trupu je řízen interakcí dvou klíčových signálních center, zóny polarizující aktivity (ZPA) a apikální ektodermové lišty (AER), které tvoří končetinový pupen.

AER exprimuje Fgf8, který signalizuje mezenchymu indukci Fgf10, ZPA pak indukci a zachování aktivity Shh, což zpětně zajišťuje zachování aktivity Fgf8. Tato smyčka zajišťuje buněčnou proliferaci a správný průběh tvorby končetiny a aktivuje například Hox geny, které později zajistí stavbu kostní i měkké tkáně (Vargesson, 2015). (Obr. 12)

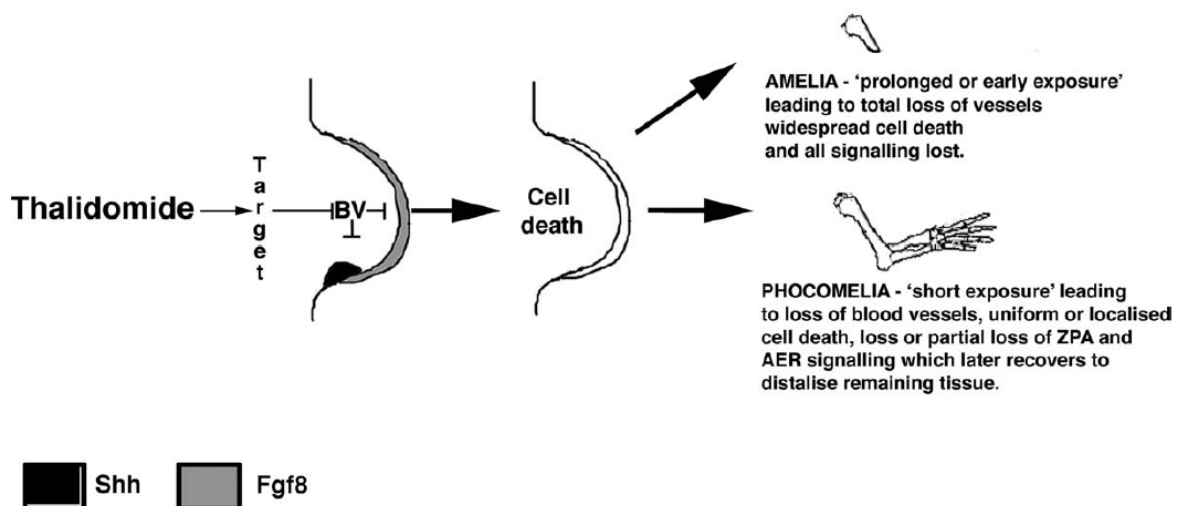


Obrázek 12 (převzato z Vargesson, 2015)

Za posledních 50 let výzkumu se bohužel zatím nepodařilo přesně určit, jakým mechanismem thalidomid způsobuje tak široké spektrum poškození. Bylo vysloveno okolo 30 hypotéz, všechny mohou být částečně pravdivé a uplatňovat se v různých částech reakční kaskády, zatím se však žádná nejevila jako výhradně správná (Vargesson, 2015). Určení konkrétního metabolitu a mechanismu zodpovědného za defekty není snadné vzhledem ke komplikované biochemické struktuře a metabolismu thalidomidu (Vargesson, 2009).

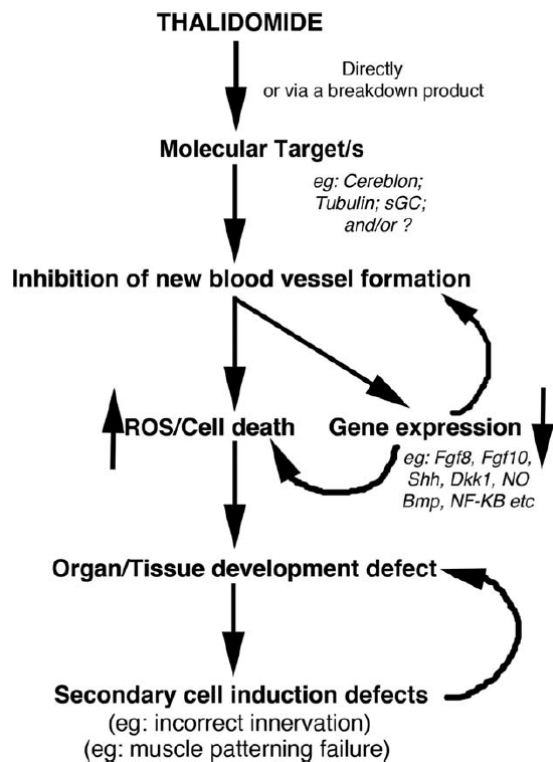
Co ale bylo dokázáno, je působení thalidomidu antiangiogenně (D'Amato et al., 1994). Toto zjištění vedlo k teoretickému předpokladu, že by místem působení thalidomidu mohlo být embryonální krevní řečiště, jehož správný vývoj a funkce jsou při embryonálním vývoji nezbytné a jakékoliv poškození může vést k vývojové vadě (Vargesson, 2009, 2013).

Při poškození krevního řečiště dojde k redukcí nebo úplné inhibici Fgf a Shh exprese, což zastaví vývoj končetin (Therapontos et al., 2009). Zda dojde k amelii, tedy úplné absenci končetiny, či fokomelii, záleží na čase, kdy je thalidomid podán. Pokud k podání dojde na začátku senzitivní periody nebo po delší dobu, je větší pravděpodobnost horších následků, při krátké či pozdější expozici dochází k lehčímu poškození, například ke ztrátě prstů či jejich článků, díky obnově genové exprese po pár dnech (Vargesson, 2015). (Obr. 13)



Obrázek 13 (převzato z Vargesson, 2015)

Dalšími vyslovenými hypotézami teratogenní aktivity thalidomidu je například zvýšení produkce ROS (Hanson, Harris, 2004) či navázání na protein Cereblon (Ito, Ando, Handa, 2011), tubulin (Rashid et al, 2015) nebo rozklad DNA pomocí ROS dihydroxy metabolitem thalidomidu (Wani et al, 2017).



Obrázek 14

Schéma zahrnující dosud vyslovené hypotézy mechanismu působení thalidomidu. (převzato z Vargesson, 2015)

Více zmapovány jsou oblasti výzkumu protizánětlivých a proti-myelomových účinků thalidomidu. Výzkum v těchto oblastech zvyšuje šanci, že budeme v budoucnu moci určit i mechanismus jeho teratogenní aktivity v embryonálním vývoji.

6. ZÁVĚR A DISKUSE

První dvě kapitoly této práce obsahují stručné rozdělení vrozených vývojových vad podle jejich mechanismu, četnosti a příčiny. Další části práce se věnují konkrétním chorobám, které byly vybrány jako příklad zvolených skupin.

Vybranou diagnózou pro chromozomální aberace byly mikroduplikace a mikrolece na krátkém raménku chromozomu 17. Hlavním důvodem zpracování tohoto odvětví je rozvíjející se technologie na poli genetických vyšetření. Vzhledem k velmi malému rozsahu poškození na chromozomu nebylo dříve možno tyto abnormality klasickým vyšetřením karyotypu zachytit. S nástupem nových metod, jako například FISH (fluorescence in situ hybridization), MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) a aCGH (array comparative genomic hybridization), však počet diagnostikovaných onemocnění v posledních letech rychle roste (Weise et al., 2012).

Zároveň lze v tomto případě zmínit vliv CNV (copy number variation) a vliv mutací genů citlivých na dávku na výsledný projev ve fenotypu jedinců (Stankiewicz, Lupski, 2006; shnuto v Usher, McCarroll, 2015).

Druhým tématem, tentokrát zastupujícím monogenně podmíněné vývojové vady, jsou RASopatie. Ačkoli jde o mutace genů v jedné kaskádě, je zajímavé pozorovat, jak se projevy na fenotypu mění v závislosti na tom, v jaké části kaskády se daný gen uplatňuje. S novými metodami, jakou je NGS (next-generation sequencing), dokážeme přesněji a rychleji detekovat konkrétní mutace. Použití NGS panelů přímo pro RASopatie (Centogene) se ukázalo nejen jako rychlejší, ale i jako levnější varianta než Sangerova metoda (Tafazoli et al., 2017).

Ze zástupců vnějších vlivů byl v poslední kapitole popsán thalidomid, nevalně znám od thalidomidové aféry z přelomu 50. a 60. let minulého století. Přestože se jedná o poměrně dávno událost, jeho mechanismus účinku nebyl zatím přesně definován. Ukázalo se však, že je účinným lékem na lepru a uplatňuje se i v léčbě dalších onemocnění. Od této skutečnosti si můžeme slibovat, že se v dalších letech podaří určit přesný mechanismus, a použití thalidomidu bude bezpečné. Dalším důvodem, proč považuji toto téma za aktuální, je poslední dobou častá incidence thalidomidem postižených novorozenců v Brazílii (Vianna et al., 2017).

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Hvězdičkou jsou v seznamu literatury označeny sekundární zdroje (review).

online zdroje:

web 1: Gregor, V., Horáček, J., Šípek, A. & Šípek, A. jr., www.vrozene-vady.cz

web 2: [poslední přístup: 17. 8. 2017]

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=578>

1

web 3: [poslední přístup: 17. 8. 2017]

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=6654

web 4: [poslední přístup: 17. 8. 2017]

<http://www.uniprot.org/uniprot/P04049>

Ando, Y., Fuse, E., & Figg, W. D. (2002). Thalidomide metabolism by the CYP2C subfamily.

Clinical Cancer Research, 8(6), 1964–1973.

*Aoki, Y., Niihori, T., Inoue, S.-I., & Matsubara, Y. (2015). Recent advances in RASopathies.

Journal of human genetics, 61(1), 33–9. <https://doi.org/10.1038/jhg.2015.114>

Aoki, Y., Niihori, T., Narumi, Y., Kure, S., & Matsubara, Y. (2008). The RAS/MAPK

syndromes: Novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Human*

Mutation, 29(8), 992–1006. <https://doi.org/10.1002/humu.20748>

Bard-Chapeau, E. A., Li, S., Ding, J., Zhang, S. S., Zhu, H. H., Princen, F., & Feng, G. S.

(2011). Ptpn11/Shp2 Acts as a Tumor Suppressor in Hepatocellular Carcinogenesis.

Cancer Cell, 19(5), 629–639. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.03.023>

Bi, W., Yan, J., Stankiewicz, P., Park, S. S., Walz, K., Boerkoel, C. F., & Lupski, J. R. (2002).

Genes in a refined Smith-Magenis syndrome critical deletion interval on chromosome

17p11.2 and the syntenic region of the mouse. *Genome Research*, 12(5), 713–728.

<https://doi.org/10.1101/gr.73702>

Carmona-Mora, P., & Walz, K. (2010). Retinoic Acid Induced 1, RAI1: a Dosage Sensitive

Gene Related to Neurobehavioral Alterations Including Autistic Behavior. *Current*

genomics, 11(8), 607–17. <https://doi.org/10.2174/138920210793360952>

*Franks, M. E., Macpherson, G. R., & Figg, W. D. (2004). Thalidomide. *The Lancet*,

363(9423), 1802–1811. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16308-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16308-3)

- Freeman, R. M., Plutzky, J., & Neelt, B. G. (1992). Identification of a Human src Homology 2-Containing Protein-Tyrosine-Phosphatase : a Putative Homolog of Drosophila Corkscrew Source : *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(23), 11239–11243.
- Grimwood, J., Gordon, L. a, Olsen, a, Terry, a, Schmutz, J., Lamerdin, J., & Lucas, S. M. (2004). The DNA sequence and biology of human chromosome 19. *Nature*, 428(6982), 529–535. <https://doi.org/10.1038/nature02399>
- Hansen, J. M., & Harris, C. (2004). a novel hypothesis for thalidomide-induced limb teratogenesis: redox misregulation of the NF-kappaB pathway. *Antioxidants & redox signaling*, 6(1), 1–14. <https://doi.org/10.1089/152308604771978291>
- Hof, P., Pluskey, S., Dhe-Paganon, S., Eck, M. J., Shoelson, S. E., Allard, J. ., & Eck, M. . (1998). Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell*, 92(4), 441–50. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80938-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80938-1)
- Hurles, M. E., & Lupski, J. R. (2006). Recombination Hotspots in Nonallelic Homologous Recombination. In J. R.Lupski &P.Stankiewicz (Ed.), *Genomic Disorders: The Genomic Basis of Disease* (s. 341–355). Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-039-3_24
- *Ito, T., Ando, H., & Handa, H. (2011). Teratogenic effects of thalidomide: Molecular mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(9), 1569–1579. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0619-9>
- Jehee, F. S., Takamori, J. T., Vasconcelos Medeiros, P. F., Pordeus, A. C. B., Latini, F. R. M., Bertola, D. R., & Passos-Bueno, M. R. (2011). Using a combination of MLPA kits to detect chromosomal imbalances in patients with multiple congenital anomalies and mental retardation is a valuable choice for developing countries. *European Journal of Medical Genetics*, 54(4), e425–e432. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2011.03.007>
- Lee, C. G., Park, S. J., Yim, S. Y., & Sohn, Y. B. (2013). Clinical and cytogenetic features of a Potocki-Lupski syndrome with the shortest 0.25Mb microduplication in 17p11.2 including RAI1. *Brain and Development*, 35(7), 681–685. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2012.09.009>
- Lepri, F. R., Scavelli, R., Digilio, M. C., Gnazzo, M., Grotta, S., Dentici, M. L., & Dallapiccola, B. (2014). Diagnosis of Noonan syndrome and related disorders using target next generation sequencing. *BMC medical genetics*, 15, 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-15-14>

- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature reviews. Cancer*, 3(6), 459–465. <https://doi.org/10.1038/nrc1193>
- *Neira-Fresneda, J., & Potocki, L. (2015). Neurodevelopmental Disorders Associated with Abnormal Gene Dosage: Smith–Magenis and Potocki–Lupski Syndromes. *Journal of Pediatric Genetics*.
Získáno z <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0035-1564443>
- O’Neill, E., Rushworth, L., Baccharini, M., & Kolch, W. (2004). Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1. *Science*, 306(5705), 2267–2270. <https://doi.org/10.1126/science.1103233>
- Pandit, B., Sarkozy, A., Pennacchio, L. A., Carta, C., Oishi, K., Martinelli, S., & Gelb, B. D. (2007). Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Genetics*, 39(8), 1007–1012. <https://doi.org/10.1038/ng2073>
- Park, S. S., Stankiewicz, P., Bi, W., Shaw, C., Lehoczky, J., Dewar, K., & Lupski, J. R. (2002). Structure and evolution of the Smith-Magenis syndrome repeat gene clusters, SMS-REPs. *Genome Research*, 12(5), 729–738. <https://doi.org/10.1101/gr.82802>
- Pearson G, Robinson F, Gibson TB, Xu B-E, Karandikar M, Berman K, & Cobb MH. (2001). Mitogen-activated protein(MAP) Kinase pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews*, 22(2), 153–183. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.2.0428>
- Potocki, L., Bi, W., Treadwell-Deering, D., Carvalho, C. M. B., Eifert, A., Friedman, E. M., & Lupski, J. R. (2007). Characterization of Potocki-Lupski syndrome (dup(17)(p11.2p11.2)) and delineation of a dosage-sensitive critical interval that can convey an autism phenotype. *American journal of human genetics*, 80(4), 633–649. <https://doi.org/10.1086/512864>
- Rashid, A., Kuppa, A., Kunwar, A., & Panda, D. (2015). Thalidomide (5HPP-33) suppresses microtubule dynamics and depolymerizes the microtubule network by binding at the vinblastine binding site on tubulin. *Biochemistry*, 54(12), 2149–2159. <https://doi.org/10.1021/bi501429j>
- Rauen, K. A. (2013). The RASopathies. NIH Public Access. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 355–369. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153523>.The
- Roberts, A. E., Araki, T., Swanson, K. D., Montgomery, K. T., Schiripo, T. a, Joshi, V. a, & Kucherlapati, R. S. (2007). Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome. *Nature genetics*, 39(1), 70–4. <https://doi.org/10.1038/ng1926>

- Romano, A. A., Allanson, J. E., Dahlgren, J., Gelb, B. D., Hall, B., Pierpont, M. E., & Noonan, J. A. (2010). Noonan Syndrome: Clinical Features, Diagnosis, and Management Guidelines. *Pediatrics*, *126*(4), 746–759. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-3207>
- Doc. MUDr. Bohumil Seifert, CSc., MUDr. Eva Jirsová, MUDr. Dagmar Kliská, MUDr. Doubravka Košťálová, & RNDr. Blanka Pospíšilová, Cs. (2012). Léky v těhotenství. Infolisty (*Informační listy Státního ústavu pro kontrolu léčiv určené široké laické veřejnosti*), 09/2012, 1–3. Získáno z www.olecich.cz.
- Shaw, A. C., Kalidas, K., Crosby, A. H., Jeffery, S., & Patton, M. A. (2006). The natural history of Noonan syndrome: a long-term follow-up study. *Archives of Disease in Childhood*, *92*(2), 128–132. <https://doi.org/10.1136/adc.2006.104547>
- *Shchelochkov, O. A., Cheung, S. W., & Lupski, J. R. (2010). Genomic and clinical characteristics of microduplications in chromosome 17. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, *152*(5), 1101–1110. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33248>
- Schouten, J. P., McElgunn, C. J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., & Pals, G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic acids research*, *30*(12), e57. <https://doi.org/10.1093/nar/gnf056>
- Slager, R. E., Newton, T. L., Vlangos, C. N., Finucane, B., & Elsea, S. H. (2003). Mutations in RAI1 associated with Smith–Magenis syndrome. *Nature Genetics*, *33*(april), 1–3. <https://doi.org/10.1038/ng1126>
- Smith, A. C., McGavran, L., Robinson, J., Waldstein, G., Macfarlane, J., Zonona, J., & Magenis, E. (1986). Interstitial deletion of (17)(p11.2p11.2) in nine patients. *American Journal of Medical Genetics*, *24*(3), 393–414. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320240303>
- Smithells, R. W., & Newman, C. G. (1992). Recognition of thalidomide defects. *Journal of medical genetics*, *29*(10), 716–723. <https://doi.org/10.1136/jmg.29.10.716>
- Stankiewicz, P., & Lupski, J. R. (2006). The genomic basis of disease, mechanisms and assays for genomic disorders. *Genome dynamics*, *1*, 1–16. <https://doi.org/10.1159/000092496>
- Tafazoli, A., Eshraghi, P., Koleti, Z. K., & Abbaszadegan, M. (2017). Noonan syndrome - a new survey. *Archives of Medical Science*, *1*(1), 215–220. <https://doi.org/10.5114/aoms.2017.64720>
- Therapontos, C., Erskine, L., Gardner, E. R., Figg, W. D., & Vargesson, N. (2009). Thalidomide induces limb defects by preventing angiogenic outgrowth during early limb formation.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(21), 8573–8578. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901505106>
- Treadwell-Deering, D. E., Powell, M. P., & Potocki, L. (2010). Cognitive and behavioral characterization of the Potocki-Lupski Syndrome (duplication 17p11.2). *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics*, 31(2), 137–143. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1097/DBP.0b013e3181cda67e>
- *Usher, C. L., & McCarroll, S. A. (2015). Complex and multi-allelic copy number variation in human disease. *Briefings in Functional Genomics*, 14(5), 329–338. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elv028>
- Vargesson, N. (2009). Thalidomide-induced limb defects: Resolving a 50-year-old puzzle. *BioEssays*, 31(12), 1327–1336. <https://doi.org/10.1002/bies.200900103>
- *Vargesson, N. (2013). Thalidomide Embryopathy: An Enigmatic Challenge. *ISRN Developmental Biology*, 2013, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2013/241016>
- *Vargesson, N. (2015). Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 105(2), 140–156. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21096>
- Vianna, F. S. L., Kowalski, T. W., Fraga, L. R., Sanseverino, M. T. V., & Schuler-Faccini, L. (2017). The impact of thalidomide use in birth defects in Brazil. *European Journal of Medical Genetics*, 60(1), 12–15. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2016.09.015>
- Vokurka, M., & Hugo, J. (2009). *Velký lékařský slovník* (Jessenius). Praha: Maxdorf, 9. vydání. ISBN: 978-80-7345-202-5
- Walz, K., Caratini-Rivera, S., Bi, W., Fonseca, P., Mansouri, D. L., Lynch, J., & Lupski, J. R. (2003). Modeling del(17)(p11.2p11.2) and dup(17)(p11.2p11.2) contiguous gene syndromes by chromosome engineering in mice: phenotypic consequences of gene dosage imbalance. *Molecular and cellular biology*, 23(10), 3646–3655. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.10.3646-3655.2003>
- Walz, K., Paylor, R., Yan, J., Bi, W., & Lupski, J. R. (2006). Rail duplication causes physical and behavioral phenotypes in a mouse model of dup(17)(p11.2p11.2). *Journal of Clinical Investigation*, 116(11), 3035–3041. <https://doi.org/10.1172/JCI28953>
- Walz, K., Spencer, C., Kaasik, K., Lee, C. C., Lupski, J. R., & Paylor, R. (2004). Behavioral characterization of mouse models for Smith-Magenis syndrome and dup(17)(p11.2p11.2). *Human Molecular Genetics*, 13(4), 367–378. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh044>

- Wani, T. H., Chakrabarty, A., Shibata, N., Yamazaki, H., Guengerich, F. P., & Chowdhury, G. (2017). The Dihydroxy Metabolite of the Teratogen Thalidomide Causes Oxidative DNA Damage. *Chemical Research in Toxicology*, *acs.chemrestox.7b00127*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.7b00127>
- *Weise, A., Mrasek, K., Klein, E., Mulatinho, M., Llerena, J. C., Hardekopf, D., & Liehr, T. (2012). Microdeletion and Microduplication Syndromes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *60*(5), 346–358. <https://doi.org/10.1369/00221554124440001>
- Zenker, M., Horn, D., Wieczorek, D., Allanson, J., Pauli, S., van derBurg, I., & Kutsche, K. (2007). SOS1 is the second most common Noonan gene but plays no major role in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Journal of medical genetics*, *44*(10), 651–6. <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.051276>
- Zhang, F., Potocki, L., Sampson, J. B., Liu, P., Sanchez-Valle, A., Robbins-Furman, P., & Lupski, J. R. (2010). Identification of Uncommon Recurrent Potocki-Lupski Syndrome-Associated Duplications and the Distribution of Rearrangement Types and Mechanisms in PTLs. *American Journal of Human Genetics*, *86*(3), 462–470. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.02.001>
- Zody, M. C., Garber, M., Adams, D. J., Sharpe, T., Harrow, J., Lupski, R., & Nusbaum, C. (2006). UKPMC Funders Group UKPMC Funders Group Author Manuscript DNA sequence of human chromosome 17 and analysis of rearrangement in the human lineage. *DNA Sequence*, *440*(7087), 1045–1049. <https://doi.org/10.1038/nature04689.DNA>