

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Petra Paulasová

Využití molekulárně cytogenetických metod v reprodukční genetice

Utilisation of molecular cytogenetic techniques in reproductive
genetics

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Milan Macek, ml., DrSc.

Praha, 2013

Doktorský studijní program v biomedicíně

Studijní program: **Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie**

Školitel: **prof. MUDr. Milan Macek, ml., DrSc.**

Školící pracoviště: **Ústav biologie a lékařské genetiky 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Fakultní nemocnice v Motole**

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat svému školiteli prof. MUDr. Milanu Mackovi, jr., DrSc., za jeho vstřícnost a odborné vedení. Ráda bych poděkovala také doc. MUDr. Milanu Mackovi, CSc., za možnosti pracovat na zajímavých projektech a za jeho podporu a cenné rady během celého postgraduálního studia.

Za cenné rady, připomínky a odbornou pomoc v průběhu mého studia děkuji také doc. RNDr. Ivanu Mazurovi, CSc. a prof. Ing. Zdeňku Sedláčkovi, DrSc.

Děkuji také svým spolupracovníkům, MUDr. Bc. Jeleně Černíkové, MUDr. Janu Diblíkovi, Ph.D. a Mgr. Janu Novotnému za jejich přátelství a vytvoření příjemné pracovní atmosféry v průběhu mého postgraduálního studia. Za spolupráci děkuji také svým zahraničním spolupracovníkům, především Assoc. prof. F. Pellestorovi z Univerzity v Montpellier.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za všestrannou podporu a pomoc a především svým dcerám Alžbětě a Natálii za jejich trpělivost, zejména v závěrečné fázi mého studia.

ABSTRAKT

Téma: Využití molekulárně cytogenetických metod v reprodukční genetice

Chromosomové abnormality jsou jednou z hlavních příčin vrozených vad, poruch fertility a/nebo lidské infertility. Přibližně 40-50% lidských plodů je chromosomově abnormálních. Chromosomové abnormality jsou příčinou asi 6% potratů v prvním trimestru těhotenství a vyskytují se u přibližně u 0,6% živě narozených dětí. Většina těchto CA má svůj původ v gametogenezi a vzniká poruchou procesu meiosis. Každá gameta je finálním a originálním produktem meiosis, nesoucí originální chromosomovou výbavu. Cytogenetické vyšetření gamet představuje proto důležitý úkol z hlediska porozumění mechanismu, původu a etiologie výše zmíněných chromosomových abnormalit. V tomto ohledu vyšetření gamet však představuje technicky náročný úkol.

Moje Ph.D. práce je zaměřena na rozvoj nových technik pro detekci chromosomových abnormalit v gametách a embryích. Vyvinuli jsme PNA-FISH metodu jako alternativu ke konvenční FISH a PRINS metodě, pro rychlou, účinnou a robustní *in situ* detekci chromosomových abnormalit v lidských gametách, polárních tělískách a blastomerách. S použitím přímo značených PNA sond pro chromosomy 1, 4, 9, 16, X a Y jsme provedli jednoduchou i vícebarevnou PNA-FISH metodu. Tato práce potvrzuje efektivitu multibarevné PNA-FISH reakce jako významnou alternativu FISH pro *in situ* chromosomové vyšetření a demonstruje, že PNA sondy mohou být významnou alternativou konvenční metody FISH pro rychlou diagnostiku aneuploidií a doplňkem rychle se rozvíjejících arrayCGH metod.

Experimentální část mé disertační práce je založena na studiu aneuploidií ve spermiích u nosičů zárodečné mutace v genu TP53, pacientů s Li-Fraumeni syndromem. Důvodem této studie byly nedávno publikované studie o účasti genu TP53 ve spermatogenezi a nález dvou případů Turnerova syndromu u dětí v rodinách s Li-Fraumeni syndromem. Gen TP53, regulátor transkripce a tumor supresor, je také exprimován během časného embryonálního vývoje, který je u člověka asociován s vysokou chromosomovou instabilitou. Klíčovým regulátorem p53 je protein MDM2. Oba tyto proteiny jsou funkčně spjaty s apoptózou v zárodečných buňkách, což může ovlivňovat lidskou fertilitu. Chybí však důkazy, jak varianty v těchto genech mohou ovlivnit apoptózu zárodečných buněk a způsobit mužskou infertility. Naše studie našla zvýšenou frekvenci aneuploidií, zvláště gonosomů,

ve spermiích nosičů zárodečné mutace genu TP53 oproti zdravým kontrolám a odhalila riziko chromosomových abnormalit u potomstva těchto nosičů. Tato pozorování mohou mít souvislost s účastí proteinu p53 ve spermatogenezi i s nálezem dvou případů Turnerova syndromu v rodinách se zárodečnou mutací TP53.

Poslední téma disertační práce se týká dopadu varianty rs6836703:G>A v genu pro ADP-ribosyltransferázu a její vliv na spermatogenezi u české populace mužů s oligozoospermii a azoospermii. Neplodnost postihuje v západních zemích 10 - 15% párů, přičemž asi u přibližně 50% případů mužské neplodnosti zůstává příčina neobjasněna. Z tohoto důvodu bylo publikováno velké množství prací, analyzujících genetické příčiny mužské neplodnosti. Studie v japonské populaci mužů prokázala, že varianta rs6836703:G>A v genu pro ADP-ribosyltransferázu (*ART3*) je signifikantně asociována s neobstrukční azoospermii. Cílem naší práce bylo stanovit frekvenci této varianty a určit její vliv na spermatogenezi u české populace mužů s oligozoospermii a azoospermii. Nalezli jsme významné rozdíly v distribuci alel/genotypů mezi fertilními muži a pacienty s oligozoospermii, zatímco u mužů s azoospermii nebyl tento rozdíl signifikantní. Zjistili jsme, že tato varianta je v populaci českých mužů asociována s oligozoospermii.

ABSTRACT

Title.: Utilisation of molecular cytogenetic techniques in reproductive genetics

Chromosomal abnormalities constitute one of the most important causes of birth defects, fertilization failure and/or human infertility.

Approximately, 40-50% of human conceptuses are chromosomally abnormal, 6% of the abortions during the first trimester of gestation are directly linked to chromosomal abnormality, while at term 0.6% of livebirths present with such features. Most of these abnormalities originate from the gametogenesis and arise through disturbed meiotic processes. Each gamete is a final and original product of the meiosis carrying a unique chromosomal set. Therefore, cytogenetic examination of individual gametes represents an important scientific challenge for our understanding of the formation, incidence and etiology of aforementioned chromosomal abnormalities. Nonetheless, it is very technically demanding to perform efficient chromosomal investigation on gametes, hence single cells.

My Ph.D. thesis is focused on the development of new techniques for the detection of chromosomal abnormalities in gametes and embryos. We developed a PNA-based technique as an alternative to conventional FISH and PRINS-based methods for fast, efficient and robust in situ detection of chromosomal abnormalities in human gametes, polar bodies and embryos. Simple and multicolor PNA labelling procedure was performed on human oocytes, polar bodies and blastomeres using directly labelled centromere PNA probes specific for chromosomes 1, 4, 9, 16, 18, X and Y. My thesis demonstrates the efficiency of multicolour PNA procedure and shows that PNA can be a powerful alternative to FISH for in situ chromosomal examinations. This study indicates that PNA probes allow reliable chromosomal analysis in isolated human oocytes and blastomeres and thereby might provide an important adjunct to FISH for diagnostic examinations, and complement rapidly developing arrayCGH-based methods.

The main experimental part of my thesis is focused on the study of sperm aneuploidy in carriers of germline mutations of the TP53 gene in patients with Li-Fraumeni syndrome. The rationale for this study relies on the fact that TP53, a transcriptional regulator and tumor

suppressor, is functionally important in spermatogenesis. TP53 is also expressed during early embryonic development, which is associated with high chromosome instability in humans. Recently published study demonstrated that TP53 is indeed functionally important in spermatogenesis. The key regulator of the p53 pathway is MDM2. Both proteins have been functionally linked to germ cell apoptosis, which may affect human infertility. However, there is limited evidence on how common variants in these genes may influence germ cell apoptosis and the risk of male infertility. Our study demonstrated increased sperm aneuploidy, mainly concerning gonosomes when compared to normal male controls. These findings substantiate the increased risk of chromosomally aberrant offsprings in carriers of germline TP53 mutations. This observation corroborates the involvement of the p53 protein in spermatogenesis and may explain two previously reported cases of Turner syndrome in families with germline TP53 mutations.

The last topics described in this work was the study of impact of the rs6836703:G>A variant of *ART3* gene on impaired spermatogenesis within the Czech male population. Infertility affects 10 – 15% of couples in Western countries and the cause of the male infertility has not yet been determined in about 50 % of cases. Therefore, there have been many attempts to identify genetic factors associated with male infertility. We utilised the HRM method of small amplicons for genotyping, in order to evaluate its possible clinical use and to establish medical indications targeted at the Czech infertile male population. Significant differences in allele/genotype distribution between fertile versus oligozoospermic men were found, while in azoospermic men, this difference was not observed. This study represents the first effort to evaluate in a different population the implication of rs6836703: G>A in impaired spermatogenesis. We found that the “A” allele of the rs6836703: G>A variant of *ART3* is a genetic risk factor for oligozoospermia in Czech male population.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AML	akutní myeloidní leukémie
AR	androgenní receptor
arrayCGH	array comparative genomic hybridisation
ART	assisted reproductive technology, technika asistované reprodukce
AZF	azoospermický faktor
CA	chromosomové abnormality
CBAVD	congenital bilateral agenesis of vas deferens
CCR	complex chromosomal rearrangements, komplexní chromosomové přestavby
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, transmembránový regulátor vodivosti
CGH	comparative genomic hybridization, komparativní genomová hybridizace
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
HRM	high resolution melting
ICSI	intracytoplasmic sperm injection, intracytoplazmatická injekce spermií do vajíčka
ISH	in situ hybridizace
IVF	in vitro fertilizace
KS	Klinefelterův syndrom
LFS	Li-Fraumeni syndrom
M	meiosa
PB	polar body, polární tělísko
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
PGD	preimplantační genetická diagnostika
PGS	preimplantační genetický screening
PNA	peptide nucleic acid, peptidová nukleová kyselina

PRINS	primed in situ labeling
TESE	testicular sperm extraction, mikrochirurgický odběr spermií z varlete
SNP	single nucleotide polymorphism
SRY	sex determining region on chromosome Y, oblast určující pohlaví na chromosomu Y
VVV	vrozené vývojové vady
WGA	whole genome amplification, celogenomová amplifikace

Obsah

1. ÚVOD	11
1.1 Chromosomové abnormality.....	11
1.1.1 Typy chromosomových abnormalit a jejich prevalence.....	13
1.1.2 Chromosomové abnormality a reprodukce	15
1.2 METODY PRO CHROMOSOMOVOU ANALÝZU LIDSKÝCH GAMET A EMBRYÍ	20
1.2.1 Cytogenetické metody.....	20
1.2.2 Molekulárně cytogenetické metody	23
2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE.....	37
3. VÝSLEDKY A DISKUZE K PŘILOŽENÝM PUBLIKACÍM.....	38
3.1 Stanovení úrovně aneuploidií v gametách, PB a preimplantačních embryích pomocí PNA sond a komparativní analýza technik PNA-FISH versus PNA.....	38
3.2 Studium chromosomové aneuploidie spermií u nosičů mutace v genu TP53	61
3.3 Studium varianty rs6836703: G>A v ART3 a její vliv na spermatogenezi u české populace mužů s oligozoospermií a azoospermií.....	68
4. DISKUZE A ZÁVĚRY	75
5. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	79
6. PŘEHLED PUBLIKACÍ, POSTERŮ, PŘEDNÁŠEK A OCENĚNÍ	86
6.1 PUBLIKACE	86
6.1.1 Zahraniční publikace s přímým vztahem k disertační práci.....	86
6.1.2 Zahraniční publikace s nepřímým vztahem k disertační práci	87
6.1.3 Publikace bez vztahu k disertační práci	88
6.2 PŘEDNÁŠKY A POSTERY	89
6.3 OCENĚNÍ	92

1. ÚVOD

1.1 *Chromosomové abnormality*

Chromosomové abnormality (dále CA) jsou u lidí relativně časté a významně se podílejí na rozvoji vrozených vývojových vad (dále VVV), mentální retardace, případně nádorových onemocnění a poruch reprodukce. CA se vyskytují u 40 – 50% lidských plodů v časných fázích těhotenství a u 0,85% novorozenců (Hassold et al., 2007). CA jsou rovněž jednou z hlavních příčin těhotenských ztrát a infertility, která postihuje ve vyspělých zemích přibližně 10 – 15% párů (Munné et al, 1994, Braude et al, 2002). Dalším důležitým aspektem je skutečnost, že cca 6% potratů v prvním trimestru gravidity je způsobeno CA. Většina těchto abnormalit vzniká v gametách během gametogeneze v důsledku poruch meiotického procesu. Každá gameta je unikátním produktem meiosis, nesoucím specifickou chromosomovou výbavu.

Cytogenetické a molekulárně cytogenetické metody byly a stále jsou důležitým prostředkem pro studium prevalence a původu CA v gametách, tj. jednotlivých buňkách, které jsou z hlediska dostupnosti i zpracování jedinečným genetickým materiálem. Analýza chromosomů a meiotické segregace v lidských oocytech a spermiích byla dlouho neuskutečnitelná jak z technických, tak i etických důvodů. Situace se změnila až se zavedením technik asistované reprodukce (assisted reproductive techniques, dále ART) a in vitro fertilizace (dále IVF), které umožnily rychlý rozvoj cytogenetických studií gamet u obou pohlaví. První publikovaná data však byla nepřesná, protože nebyly používány pruhovací techniky pro identifikaci jednotlivých chromosomů. Nalezené frekvence CA na velmi omezeném počtu gamet byly variabilní, od 3% do 55% z celkového počtu. Se zavedením pruhovacích technik na chromosomy oocytů byla stanovena přesnější frekvence CA v lidských oocytech, 20 – 25 % (Pellestor et al., 2003a).

Dále bylo prokázáno, že většina lidských plodů s CA vzniká vlivem chybné chromosomové segregace, zejména mechanismem předčasné separace sesterských chromatid během gametogeneze (Angell, 1991), stejně jako byla prokázána přímá korelace mezi tímto mechanismem a věkem matky (Pellestor et al, 2005, Hassold and Hunt, 2001, Nicolaidis and Petersen, 1998).

Ke konci 80. let byla zavedena technika přímé *in situ* hybridizace (dále ISH), která byla úspěšně adaptována na lidské oocyty a polární tělíska a otevřela tak nové perspektivy pro cytogenetický výzkum lidských gamet. Většina publikovaných dat potvrdila vysokou incidenci CA v lidských oocytech, dříve zjištěných klasickými cytogenetickými metodami. I tyto nové přístupy ISH však čelily obtížím způsobeným špatnou kvalitou preparátů a přirozenou kompaktací chromosomů v oocytech. Metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (dále FISH) techniky však neumožní vyšetřit všechny chromosomy a přináší riziko falešného pozadí nebo tzv. „cross-hybridizace“.

Studium spermií bylo technicky náročnější, protože zralá spermie je buňka, u které jediným způsobem aktivace jejího genomu a tak „zpřístupnění“ kompaktních chromosomů vyšetřovacím metodám nastává až při iniciaci fertilizačního procesu. Rudak et al., 1978, představili experimentální techniku zvanou test fúze spermií s křeččími oocyty založenou na *in vitro* fertilizaci křeččích oocytů a lidských spermií. Tento přístup byl poprvé použit k hodnocení fertilizační schopnosti spermií před zavedením IVF technik. Zablokováním ve fázi 1. meiotického dělení této chimerické zygoty a fixací na sklíčko bylo možno získat a analyzovat všech 23 chromosomů lidské spermie. Tato metoda umožnila první experimentální studie lidských spermií.

Následné zavedení techniky FISH usnadnilo výzkum na lidských spermiích. Po fixaci a dekonenzaci jádra spermie na sklíčko bylo možné analyzovat velký počet spermií v jedné reakci. Limitací této metody je však omezený celkový počet analyzovaných chromosomů. Vzhledem k malému jádru a hrozícímu překryvu signálů lze optimálně analyzovat max. 3 chromosomy. Data získaná FISH studiemi potvrdila výsledky předchozích, cytogenetických studií a frekvenci aneuploidie cca 3%.

Metody *in situ* značení chromosomů při studiu lidských gamet byly v průběhu několika let zdokonalovány a byly vyvinuty nové přístupy, jako například metoda PRINS (Primed in Situ Labeling), PNA-FISH (Peptide Nucleic Acid, dále PNA) nebo arrayCGH (Comparative Genomic Hybridization, dále aCGH). Klinická aplikace výše uvedených metod tvoří základ první části mé disertační práce (viz níže).

1.1.1 Typy chromosomových abnormalit a jejich prevalence

Vrozené CA vznikají přibližně v 80 % případů *de novo*, ve 20 % jsou získané. CA mohou být numerické nebo strukturní a mohou se vyskytovat ve všech buňkách organismu, nebo jen v některých buněčných liniích, tj. v mozaikové formě. Fenotypový (klinický) dopad mozaikových forem CA bývá většinou mírnější. Mozaiky jsou způsobeny chybou v mitotickém dělení buněk časného embrya.

1.1.1.1 Numerické aberace

Za numerickou CA označujeme stav, kdy buňka obsahuje odlišný počet chromosomů od standardní chromosomové sady. Chromosomovou sadu, která obsahuje jiný počet chromosomů než 46, označujeme jako heteroploidní. Přesný násobek haploidního počtu chromosomů (n) nazýváme euploidní, jiný počet chromosomů aneuploidní ($2n+1$, $2n-1$). Vznikají následkem nondisjunkce chromosomů během meiotického dělení.

U lidských plodů byly popsány i případy výskytu odlišných euploidních sad - triploidní ($3n$) nebo tetraploidní ($4n$). K triploidii dochází obvykle oplozením oocyty dvěma spermiemi, nebo následkem poruchy meiosis, jejímž důsledkem vznikne diploidní oocyt nebo spermie.

Aneuploidie se vyskytují téměř u 5% klinicky rozpoznaných těhotenství. Klinicky nejvýznamnější jsou trisomie 13 (Patauův syndrom), trisomie 18 (Edwardsův syndrom) a trisomie chromosomu 21 (Downův syndrom), která je jediná slučitelná se životem. Klinicky významné jsou i aneuploidie pohlavních chromosomů. Nejčastější gonosomální aneuploidíí je konstituce 47, XXY (Klinefelterův syndrom), s prevalencí 1 na 1000 mužských plodů.

1.1.1.2 Strukturní aberace chromosomů

Strukturní aberace rozdělujeme na *balancované* a *nebalancované*. Balancované jsou inverze, inzerce, reciproké translokace a Robertsonské translokace. Nebalancované strukturní aberace jsou delecce a duplikace. Stejně jako numerické, mohou být i strukturní aberace přítomny ve všech buňkách jedince, nebo ve formě mozaiky.

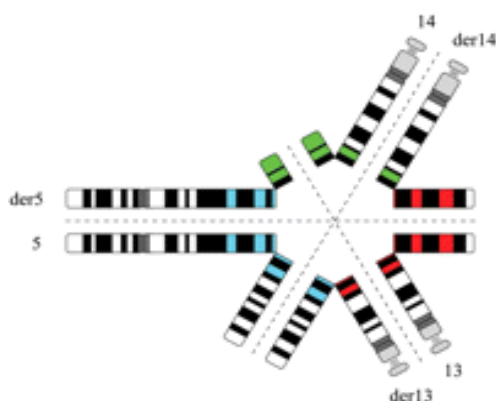
Strukturní aberace vznikají jako důsledek chromosomových zlomů nebo nerovnoměrného crossing-overu, který má za následek vznik duplikací nebo delecí. Strukturní aberace se vyskytují v normální populaci s frekvencí 2,84 ‰. Mohou být nebalancované (0,62‰) a mít závažné důsledky pro fenotypový a mentální vývoj jedince,

nebo balancované (2,22%). Nejčastěji se vyskytují translokace Robertsonské a reciproké s frekvencí 1,23‰ a 0,77 ‰ u novorozenců (Nielsen a Wohler, 1991). Inverze jsou nalézány u 0,22‰ novorozenců. Frekvence pericentrických inverzí je odhadována na 1-2‰ (Kaiser, 1984). Incidence paracentrických inverzí je velmi nízká, ale předpokládá se, že může být podhodnocena vlivem jejich obtížné identifikace nebo také proto, že její nosiči nejsou zachyceni důvodu zachované fertility. Její výskyt se odhaduje na 0,09 - 0,49‰ (Pettenati et al., 1995).

1.1.1.3 Komplexní chromosomové přestavby

Komplexní chromosomové přestavby (Complex Chromosomal Rearrangements, dále CCR) jsou strukturní vady chromosomů, nejčastěji translokace, charakterizované přítomností nejméně 3 zlomových míst na 2 nebo více chromosomech. Jejich výskyt u člověka je poměrně vzácný a jejich nosiči mohou vykazovat variabilní nálezy od normálního fenotypu přes mužskou infertilitu, mentální retardaci až po závažné VVV.

Heterozygoti pro balancovanou CCR přestavbu mají vysoké riziko spontánních potratů nebo chromosomově abnormálního potomstva, jelikož meiotická segregace CCR může teoreticky vést k řadě nebalancovaných chromosomových konfigurací – (Obr.1) (Pellestor et al., 2011).



Obr.1 Vznik hexavalentu v pachytene I.meiosy u CCR zahrnující chromosomy t(5,13,14) (Pellestor et al.,2011)

Technika FISH na spermiích umožňuje přímou analýzu meiotické chromosomové segregace CCR v gametách (Loup et al., 2010). Byly publikovány i práce prokazující možnosti preimplantační genetické diagnostiky (dále PGD) pomocí FISH u embryí nosičů CCR (Escudero et al., 2008).

1.1.2 Chromosomové abnormality a reprodukce

Příčiny infertility jsou jak maternálního, tak paternálního původu, nebo často na straně obou partnerů. Asi 40 % infertility je způsobeno ženskými faktory, minimálně 20% je na straně muže, 15% na straně obou partnerů a 25% je idiopatické povahy.

1.1.2.1 Chromosomové abnormality ve spermiích a mužská infertility

V normální mužské populaci jsou numerické CA nalézány ve 3,48%. Z toho prevalence numerických odchylek gonosomů je 2,03% a 1,45% u autosomů. Strukturní abnormality nese přibližně 7% všech spermií.

Frekvence disomie je přibližně stejná u všech autozomů a pohybuje se v rozmezí 0,1% - 0,3%, přičemž frekvence disomie gonosomů je přibližně 0,27% (Templado et al., 2011, Martin et al., 1993, Pellestor et al., 1996).

Asi 15% případů mužské infertility je způsobeno CA nebo monogenními defekty (Ferlin et al, 2006). CA se vyskytují u 5 % mužů s oligozoospermií (snížená koncentrace spermií v ejakulátu) a až u 15% mužů s azoospermií (nepřítomnost spermií v ejakulátu v důsledku nedostatečné nebo chybějící spermatogeneze). Přibližně 10-20% pacientů s azoospermií a 5-7% pacientů s oligozoospermií má abnormální karyotyp. Hlavní příčinou aneuploidie u infertilních mužů jsou chyby v meiotických kontrolních bodech v pachytene a v metafázi prvního meiotického dělení (Handel et Schimenti, 2010).

Nejčastější CA asociované s mužskou infertilitou jsou numerické abnormality pohlavních chromosomů (Sarrate et al, 2010) či reciproké translokace (Duzcan et al, 2006). Nejčastějšími gonosomálními aneuploidie jsou konstituce 47,XXY (Klinefelterův syndrom) a 47,XYY. Karyotyp 47,XXY s prevalencí 0,1 – 0,2% u novorozenců se vyskytuje u 5% mužů s těžkou oligozoospermií a u 10% mužů s azoospermií (Ferlin et al., 2006). Většina mužů s KS je infertilních, u některých jedinců lze spermie nalézt pomocí invazivní metody TESE (Testicular Sperm Extraction).

Naopak u mužů s konstitucí 47, XYY nalézáme různý klinický obraz od azoospermie po normospermii z neznámých důvodů. Ve většině případů jsou však tito muži fertilní, problémy s fertilitou má pouze 8% z nich (Mau-Holzmann, 2005). Jejich potomstvo má však zvýšené riziko aneuploidie, neboť ve spermiích pacientů s konstitucí XXY nebo XYY byla popsána

zvýšená frekvence disomie pohlavních chromosomů, autosomů i diploidních spermií (Egozcue et al, 2000, Sarrate et al, 2005).

Strukturní CA pohlavních chromosomů jsou vzácnější a postižení je závislé na rozsahu a lokalizaci postižené oblasti, zvláště pokud jsou zasaženy oblasti nesoucí geny podílející se na tvorbě gonád a spermatogenezi. Kromě reciprokých translokací jsou u infertilních mužů nalézány také Robertsonské translokace, paracentrické i pericentrické inverze nebo komplexní anomálie chromosomů (De Braekeler et al, 2006). Ve většině případů se jedná o balancované translokace, tzn. bez ztráty nebo přebytku chromosomového materiálu a nemají fenotypový dopad pro nosiče. Jejich potomci však mají zvýšené riziko CA.

Nejvýznamnější genetickou příčinou mužské infertility jsou mikrodelece chromosomu Y (AZoospermia Factor, dále AZF): mikrodelece AZFa, AZFb a AZFc (Lanfranco et al., 2004). Z nich nejčastější je mikrodelece AZFc s prevalencí 2 – 10% u infertilních mužů (Simoni et al., 2008, Ferlin et al, 2006). Konečně oblast, která bývá také často postižena delecemi, je oblast genu SRY (Sex determining Region on chromosome Y, tj. oblast určující pohlaví na chromosomu Y). Mutace nebo delece tohoto genu vedou obvykle ke zvratu mužského pohlaví na ženské.

Další genetickou příčinou mužské infertility jsou mutace v genu *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) a androgenním receptoru (AR). Androgeny a funkční AR jsou nezbytné pro spermatogenezi. Přibližně 90% mutací v AR genu bylo popsáno u syndromu známého jako androgen insensitivity syndrome (Ferlin et al, 2006).

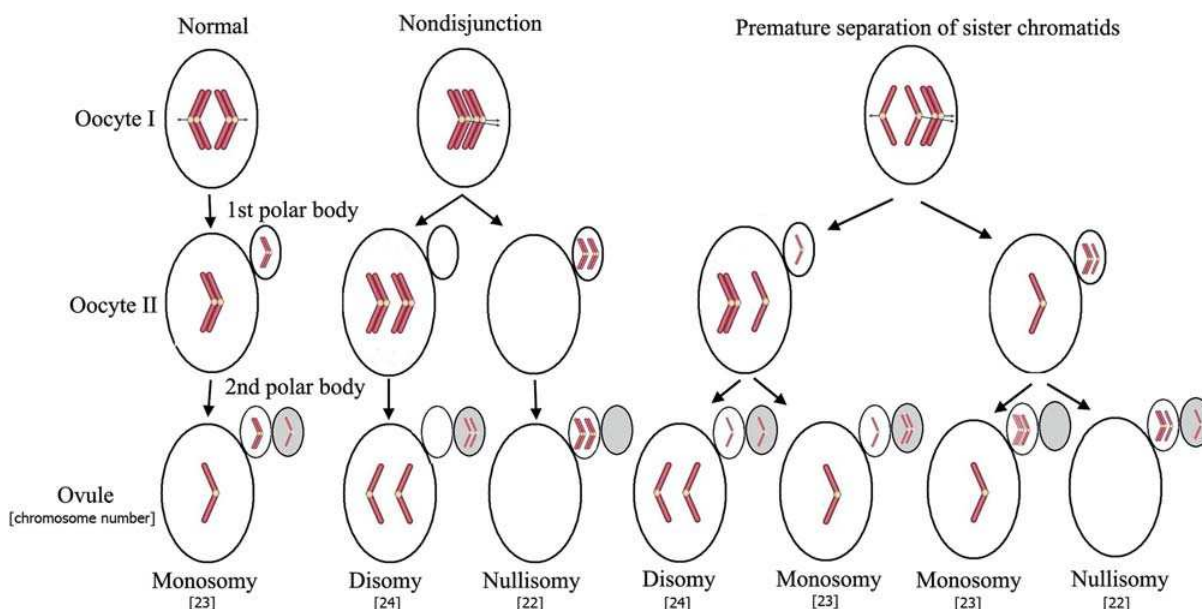
Mutace v genu *CFTR* vedou ke kongenitální bilaterální absenci vas deferens (CBAVD), způsobující obstrukční azoospermii u více než 95% mužů s cystickou fibrózou. Mutace v genu *CFTR* mohou být také spojeny s neobstrukční azoospermii nebo idiopatickou infertility (Schlegel, 2007).

V současné době je známa řada genů a genových variant podílejících se na spermatogenezi. Ve své práci se budu podrobněji zabývat genem *TP53*, neboť v nedávné době byly provedeny studie, které vedly k závěru, že protein p53 může hrát důležitou roli ve spermatogenezi a v regulaci lidské fertility.

1.1.2.2 Chromosomové abnormality v oocytech a ženská infertilita

Chromosomové aneuploidie jsou nejčastěji se vyskytující CA u oocytů a také klinicky nejvýznamnější. Většina aneuploidií má svůj původ v gametogenezi. Jsou známy dva mechanismy vzniku aneuploidie –a) nondisjunkce celých chromosomů v meiose I a meiose II (Obr.2), nebo b) v důsledku předčasné separace chromatid v meiose I (Angell, 1991).

V případě nondisjunkce putují oba homologní chromosomy ke stejnému pólu. To vede ke vzniku oocyta obsahujícího nadbytečný chromosom, zatímco odpovídající polární tělísko (1. i 2.) je nulismické pro tento chromosom. Výsledkem je tedy vždy aneuploidní oocyt, disomický ($n=24$) nebo nulismický ($n=22$) a následně všechna embrya vzniklá oplozením těchto oocytů.(Obr. 2). Jiná situace je v případě předčasné separace chromatid, která vede ke vzniku abnormálních oocytů a následně embryí v 50 % všech případů. Zde však závisí na tom, zda separované chromatidy segregují k opačným pólům, nebo k jednomu pólu společně. Výsledkem je 50% normálních gamet a 25% gamet hypohaploidních a 25% hyperhaploidních (Obr. 2).



Obr.2 Mechanismus vzniku aneuploidie během oogeneze (Vialard et al., 2011)

V této souvislosti byl prokázán i vliv rekombinace na frekvenci chromosomové aneuploidie. Molekulární studie trisomií realizované za pomoci polymorfních DNA markerů objevily sníženou frekvenci rekombinace nebo její absenci u chromosomů, u kterých došlo k nondisjunkci. Tyto studie potvrdily, že model rekombinace je důležitý predisponující faktor meiotické nondisjunkce (Abruzzo et Hassold, 1995). Abnormální rekombinace, tj. pokud nedojde k vytvoření adekvátního počtu chiazmat, vede k nepřesné segregaci celých chromosomů k jednotlivým pólům (Delhanty 2005, Hassold et al, 2007). Stejně tak je důležitá i pozice chiazmat ve vztahu k centromere a může vést k abnormální segregaci homologů. Předpokládá se, že věk matky má vliv na různé způsoby rekombinace a predispozici k nondisjunkci.

Cytogenetické analýzy oocytů jednoznačně prokázaly přímý vliv věku matky na frekvenci aneuploidie, která je u žen do 25 let odhadována na 5%, u žen ve věku kolem 30 let 10 – 25%. S věkem však významně stoupá a u žen nad 40 let tvoří asi 50% (Pellestor et al., 2003, Fragouli et al., 2010, 2013).

V posledních letech se významně projevil sociální trend odkládání mateřství do vyššího věku, což vedlo ke zvýšení incidence syndromů spojených s aneuploidií chromosomů se všemi zdravotními, psychickými i finančními důsledky. PGS a PGD se tak v posledních letech staly významnou součástí metod asistované reprodukce (ART).

1.1.2.3 Chromosomové abnormality v embryích

Chromosomová instabilita je typickým znakem časného života lidských embryí. Nejčastěji jsou nalézány celochromosomové aneuploidie, mozaicismus a segmentální aneuploidie. Celková frekvence CA v časných embryích je odhadována na 50% (Munné et al, 2004). Data získaná cytogenetickými studiemi materiálu ze spontánních potratů, prenatalních vzorků nebo živě narozených plodů, potvrdily, že 5% všech klinicky rozpoznaných těhotenství je chromosomálně abnormálních, nesoucích trisomii nebo monosomii (Hassold et al, 2007). Velká většina těchto těhotenství se potratí v časném stádiu těhotenství. V klinicky rozpoznaných spontánních potratech byly zaznamenány trisomie všech chromosomů, jediná postnatálně pozorovaná monosomie je u chromosomu X (45,X) (Hassold et al., 1996). Pouze trisomie chromosomů 13, 18, 21 a anomálie postihující pohlavní chromosomy jsou slučitelné se životem, vedou však (s výjimkou některých aneuploidí

gonosomů) k narození dětí s těžkými VVV a/nebo mentální retardací (Hassold and Hunt, 2001). Trisomie autosomů (93% trisomií 18, 95% trisomií 21 a 100% trisomií chromosomu 16) jsou většinou maternálního původu (Hassold et Hunt, 2001). Trisomie 21 vzniká převážně chybami v MI (Antonarakis et al., 1993), zatímco trisomie chromosomu 18 chybami v M II. (Fisher et al, 1995). Naopak aneuploidie pohlavních chromosomů jsou častěji původu paternálního (50% 47,XXY, 100% 47,XYY a 70-80% 45,X) .

Většina znalostí o původu a incidenci chromosomálních aberací během časně embryogeneze byla získána FISH studii interfázních blastomer embryí po *in vitro* fertilizaci. Vyšetřením 7 – 10 chromosomů byla nalezena chromosomální aneuploidie u 45 – 65% embryí (Gianaroli et al., 2001, Munné et al., 2004, Delhanty, 2005, Baart et al., 2006). Aneuploidní počty signálů lokus specifických sond jsou však hodnoceny jako celochromosomová imbalance, zatímco se ve skutečnosti může jednat o strukturní aberaci chromosomů.

Metodou arrayCGH, kterou lze studovat výskyt segmentálních chromosomových vad, byla zachycena jejich přítomnost u 7 – 32% embryí (Wells and Delhanty, 2000, Wells et al., 2008).

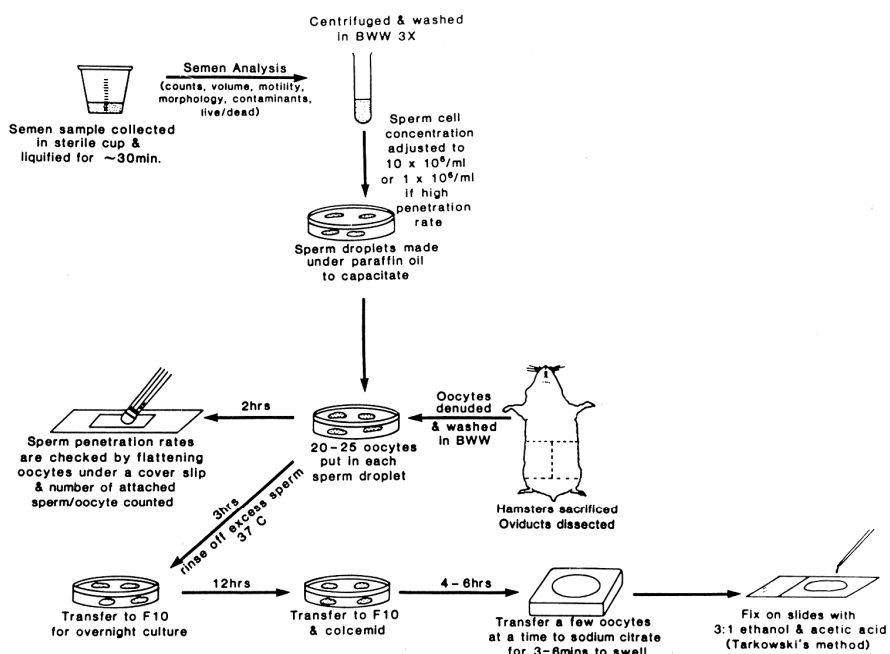
Tento vysoký výskyt celochromosomových a segmentálních aberací v časných embryích by předpokládal mnohem vyšší výskyt vrozených aberací. Jelikož prevalence chromosomově abnormálních embryí je mnohem vyšší než incidence VVV, předpokládá se, že diploidní blastomery mají proliferační výhodu oproti aneuploidním, nebo aneuploidní buňky musí být eliminovány, nebo opraveny v „post-cleavage stage“ embrya. Tato negativní selekce abnormálních blastomer závisí do jisté míry i na genech lokalizovaných v aberantních lokusech chromosomů (Mantzouratou and Delhanty, 2011).

1.2 METODY PRO CHROMOSOMOVOU ANALÝZU LIDSKÝCH GAMET A EMBRYÍ

1.2.1 Cytogenetické metody

Ke klasickým cytogenetickým metodám patří především různé druhy pruhování. Nejpoužívanější metodou v cytogenetických laboratořích je G-pruhování, což je barvení chromosomů roztokem Giemsa. Slouží k hodnocení počtu a struktury chromosomů, zlomů a nestabilních přestaveb. Q-pruhování je metoda vyžadující barvení roztokem chinakrinu. Je používána při vyšetření variant v morfologii chromosomů, tzv. heteromorfismů.

Cytogenetické vyšetření spermií lze provést metodou tzv. heterospecifické fekundace, t.j. metodou fúze spermií s křeččími oocyty zbavených zony pellucidy (viz obr. 3 a 4). Ta vede k dekonduzaci jádra spermie, které lze následně nafixovat ve stadiu metafáze a analyzovat chromosomy za použití pruhovacích metod (Q-, R- a G-pruhování) (Pellestor et al., 1997, Martin, 1983). Tato metoda je velmi zdoluhavá a náročná a v praxi se již neprovádí. Byla nahrazena interfázni fluorescenční *in situ* hybridizací (dále FISH), která umožní vyšetřit tisíce spermií či jiných buněk.

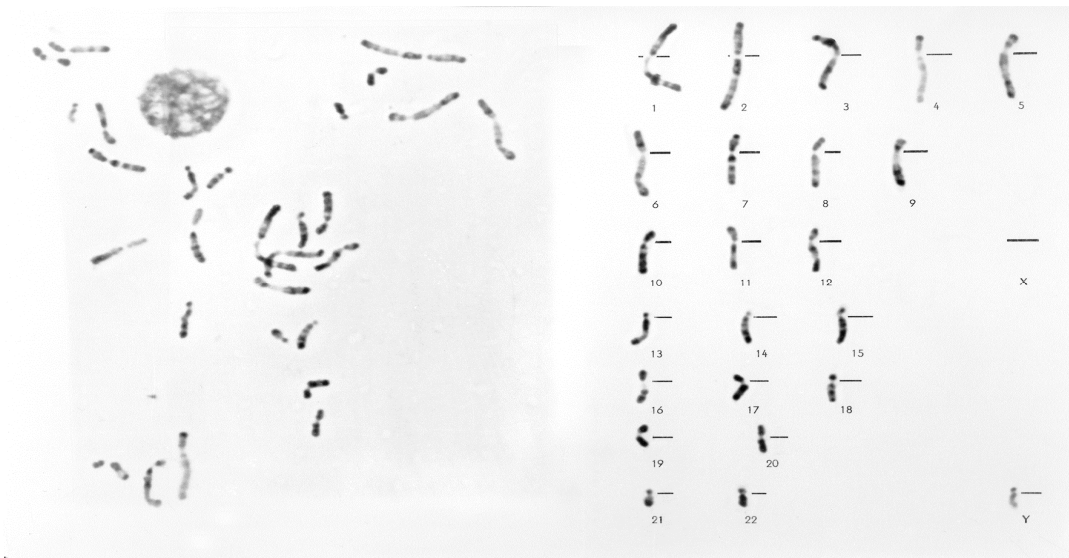


Human sperm/hamster eggs fusion technique

Obr. 3 Schéma techniky fúze spermií s křeččími oocyty



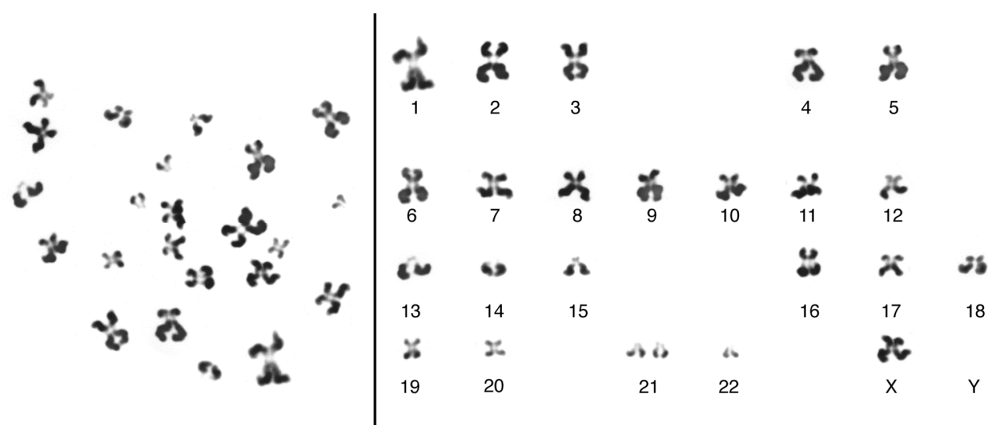
Obr. 4 Fúze spermií s křeččím oocytem



Obr. 5 Mitóza a karyotyp spermie (všechny obrázky : Pellestor et al., soukromý archiv)

Díky širokému uplatnění technik IVF v posledních dvou dekádách bylo možné získat materiál pro cytogenetickou analýzu oocytů. Oocyty jsou získávány po hormonální stimulaci a následné punkci folikulární tekutiny, neboť až 30% těchto oocytů zůstává při procesu IVF neoplovněno. Takto získané oocyty jsou vhodné pro přímou chromosomovou analýzu, protože jsou teoreticky blokovány ve stádiu metafáze I. meiotického dělení (Pellestor et al, 2003a). Jednoduchou fixací neoplozených oocytů na podložní sklo a jejich pozorováním ve světelném mikroskopu bylo tedy možné vizualizovat všech 23 chromosomů lidských oocytů a identifikovat jejich abnormality. Existuje však několik limitujících faktorů, jako například špatná morfologická kvalita chromosomů oocytů, jejich kompaktace a kondenzace

chromatinu, díky čemuž je obtížné identifikovat jednotlivé chromosomy a téměř nemožné identifikovat strukturní aberace (Obr. 6).

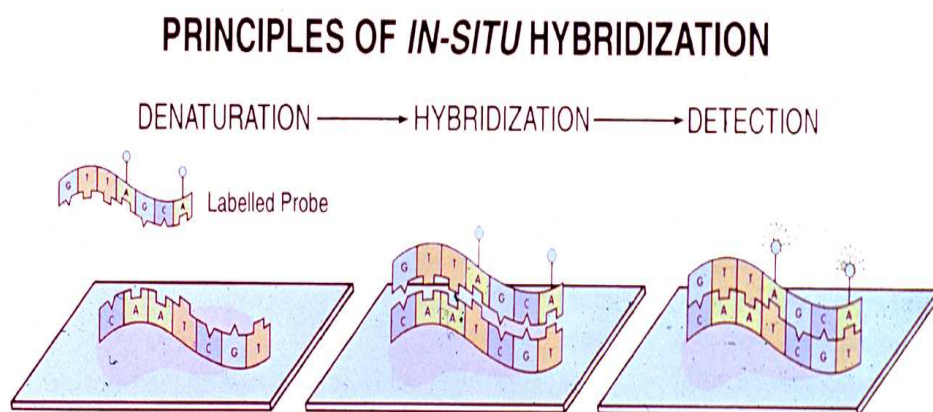


Obr.6 Mitóza a karyotyp oocyty 24,X (+21) (Pellestor et al., soukromý archiv)

1.2.2 Molekulárně cytogenetické metody

1.2.2.1 Metoda FISH a její využití

FISH je molekulárně-cytogenetická metoda sloužící k detekci specifických oblastí na chromosomu (v mitózách) nebo interfázních jádrech. Metoda je založena na použití fluorescenčně značených sond komplementárních k cílové oblasti na DNA (Liehr et al, 2002). Principem metody je hybridizace cílové denaturované DNA s denaturovanou molekulou DNA sondy, která obsahuje sekvenci komplementární k sekvenci DNA, kterou chceme vizualizovat (obr.7)

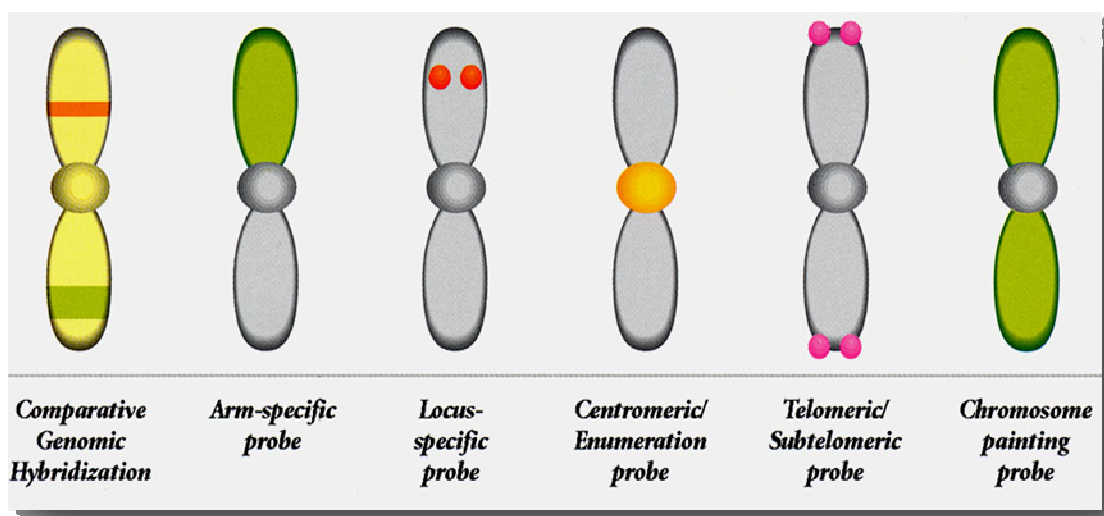


Obr. 7. Princip in situ hybridizace

V reprodukční medicíně se využívají 2 typy sond - centromerické a lokus specifické (obr.8). Centromerické sondy jsou komplementární k repetitivním sekvencím (α -satelit, β -satelit, satelit III) (Liehr et al., 2002), specifickým pro centromery jednotlivých chromosomů. Nejčastěji se používají sondy založené na α -satelitní DNA. V centromerách je přítomná v tisících tandemově se opakujících kopiích a tvoří ji monomery o délce 171 bp, které tvoří bloky o velikosti 250 kb až 5 Mb. Pro jednotlivé chromosomy byly popsány specifické odchylky v sekvenci základního monomeru nebo repetice vyššího řádu, čímž je umožněno tyto sekvence používat jako sondy pro rozlišení jednotlivých chromosomů při FISH. Mezi některými chromosomy (13 a 21, 14 a 22) ale tyto rozdíly jsou tak malé, že centromery nelze pomocí FISH s těmito sondami rozlišit.

Lokusově specifické sondy sestávají ze značené DNA odpovídající krátkému úseku (1 kb – 2Mb) (Liehr et al., 2002) daného chromosomu. Jejich signály jsou menší a méně intenzivní. Používají se pro detekci těch chromosomů, které nelze detekovat pomocí centromerických sond nebo pro detekci přestaveb daných úseků.

Speciálním typem lokusově specifických sond jsou sondy pro subtelomerické úseky jednotlivých chromosomových ramének. Vzhledem k tomu, že jsou komerčně dostupné pro všechny chromosomy, dají se používat pro detekci translokací i na interfázních jádrech. Pro PGD/PGS, kdy vyšetřovaným materiálem je pouze jedna buňka, je důležité při jedné reakci analyzovat co nejvíce chromosomů. Pro každý studovaný chromosom nebo lokus tedy sonda musí být značená jiným fluorochromem. V praxi jsou dostupné sady s maximálně pěti různě značenými sondami. Aby bylo dosaženo většího počtu vyšetřených chromosomů, je nutno sondy odmýt a FISH reakci opakovat s další sadou sond.



Obr. 8 Typy FISH sond

Původně byly sondy značeny pomocí radioaktivních izotopů (Pardue and Gall, 1969). Toto značení je sice velmi citlivé, ale pro nízké prostorové rozlišení, náročnou manipulaci a zdravotní rizika byly radioaktivně značené sondy nahrazeny sondami neizotopovými (enzymaticky či fluorescenčně značenými). Současné techniky neradioaktivního značení jsou založeny na navázání takové chemické látky na sondu, která je za určitých podmínek schopna vyvolat detekovatelnou reakci. Takovými látkami jsou např. fluorochromy (přímá detekce),

nebo se využívá nepřímá detekce. Při nepřímém značení se začleňují do DNA sondy chemicky modifikované nukleotidy, nejčastěji dUTP s kovalentně navázaným biotinem nebo digoxigeninem. Inkorporace značených nukleotidů do DNA se nejčastěji provádí metodou nick translace, metodou prodlužování primeru nebo pomocí PCR. K vizualizaci se používá detekce pomocí avidinu nebo protilátek, které jsou nejčastěji konjugované s fluorochromem.

Fluorescenční značení umožnilo díky časové nenáročnosti široké využití ISH a tak FISH zaujala nezastupitelnou pozici v molekulárně-cytogenetickém výzkumu a diagnostice, zvláště v oblasti PGD/PGS, byť je v poslední době nahrazována metodou arrayCGH. Metoda FISH umožnila velký rozmach PGD/PGS - numerických i strukturních abnormalit a přinesla pokrok ve studiu mechanismu a incidence aneuploidií gamet a embryí.

1.2.2.1.1 Vyšetření spermií metodou FISH

V případě vyšetření spermií se jedná o interfázní FISH. Jaderný chromatin spermií je silně kondenzován díky molekulám protaminů, které v jádře spermií nahrazují histony. Z tohoto důvodu je třeba před samotnou metodou FISH provést dekonduzaci. Cílem tohoto kroku je narušení disulfidových vazeb mezi molekulami protaminu v jádře spermie a tím její dekonduzace a umožnění průniku DNA sond pro FISH.

Po dekonduzaci následuje fixace v roztoku paraformaldehydu. Spermie si tak a zachovávají, s výjimkou zvětšené hlavičky, původní tvar. Tím je umožněno jednoznačné odlišení spermií od ostatních buněčných elementů dle tvaru hlavičky a přítomnosti bičíku.

Normální spermie je monosomická a má tedy jeden signál pro každý vyšetřovaný chromosom. Abnormální je nález nulismie (nepřítomnost signálu pro daný chromosom) nebo disomie (přítomnost dvou signálů pro daný chromosom). Vzhledem k tomu, že nález nulismie může být též artefaktem způsobeným selháním hybridizace, vychází hodnocení výskytu aneuploidie spermií pouze z nalezené frekvence disomií. Aby byla spermie hodnocena jako disomická pro určitý chromosom, musí mít bičík, odpovídající tvar a velikost hlavičky s jasnými konturami, oba signály musí mít přibližně stejnou velikost a intenzitu a být od sebe vzdálené alespoň na průměr signálu. Podobně, aby byla spermie hodnocena jako diploidní, musí být disomická pro všechny vyšetřované chromosomy, resp. pár XY.

Nehodnotí se spermie: bez bičíku (může jít o jinou buňku), ve shlucích, s hlavičkami přes sebe (pokud nelze jasně rozeznat okraje hlaviček), se dvěma hlavičkami nebo s příliš malou nebo naopak velkou hlavičkou, nebo pokud se v zorném poli nachází více než 1 spermie bez signálů (špatně hybridizovaná oblast).

Pro získání validních výsledků se doporučuje testovat 3.000 - 10.000 spermií pro každý vyšetřovaný chromosom (Pellestor et al., 2003b).

1.2.2.1.2 Vyšetření oocytů a polárních tělísek metodou FISH

K analýze lze použít pouze oocyty získané metodami ART po ovariální stimulaci, jejímž cílem je současné dozrání a následný odběr více oocytů. Je třeba si uvědomit, že vyšetřované oocyty prošly dozráváním během nefyziologické hormonální stimulace, která může mít vliv na průběh meiózy a vznik CA.

Pro vyšetření se využívají neoplozené oocyty v metafázi II a první polární tělísko (polar body, dále PB), nebo po oplození oocyty i druhé PB. Vyšetření PB poskytuje pouze nepřímou informaci o chromosomech, které zůstaly v oocyty (Verlinsky et al., 1995). Obě PB rychle degradují, takže u nich nelze použít standardní cytogenetické metody. Pro klinické účely se tedy využívá FISH a v posledních letech i aCGH.

Pro fixaci neoplozených oocytů se využívají dvě metody a) dle Tarkowského (Tarkowski, 1966), nebo b) metoda postupné fixace (Kamiguchi et al, 1993, Pellestor et al, 2005). Pro vyšetření oocytů a PB se obvykle používají sady dvou až pěti centromerických nebo lokus specifických sond v 1 – 3 sekvenčních reakcích. V současnosti je dostupná sada sond Vysis Multivision (Abbott Molecular[™]), obsahující sondy lokus specifické pro chromosomy 13 (Spectrum Red[™]) a 21 (Spectrum Green[™]) a centromerické pro chromosomy 16 (Spectrum Aqua), 18 (Spectrum Blue) a 22 (Spectrum Yellow[™]). Mezi jednotlivými reakcemi je třeba po vyhodnocení odmýt navázané sondy v předchozí reakci.

Vyšetření PB umožňuje detekci chromosomových aneuploidií v oocyty například v případě vyššího věku matky. Její nevýhodou je to, že neposkytuje informace o paternálních meiotických chybách, ani o chybách vzniklých během mitotického dělení raného embrya. Biopsie PB se provádí 20 – 24 hod po oplození konvenční metodou IVF, nebo

intracytoplazmatickou injekcí spermie do vajíčka (dále ICSI), kdy lze získat obě PB najednou. Zona pellucida se otevírá mechanicky, nebo laserem (Montag et al, 1998), poté se bioptickou pipetou PBs odeberou (Harper, 2000). Velkou výhodou vyšetření PB je minimální invazivita.

Při mikroskopické analýze PB je hlavním problémem nalezení jejich chromatinu, který je často fragmentovaný, neboť se jedná o přirozeně degenerující buňky. Dále je třeba odlišit první a druhé PB. To lze podle velikosti (první PB má větší jádro, obsahuje dvojnásobek chromatinu) a podle počtu hybridizačních signálů:

V 1. PB jsou chromosomy tvořeny dvěma chromatidami, které mohou být těsně u sebe, nebo značně vzdálené, popřípadě i každá v jiném fragmentu. Pozorovat bychom tedy měli buď jeden velký dvojité signál, nebo dva nezávislé signály a to jak pro sondy centromerické, tak pro lokus specifické. Nález 0, 1, 3 nebo 4 signálů znamená abnormalitu.

Ve 2. PB jsou chromosomy jednochromatidové, normální je tedy nález jednoho signálu pro každý vyšetřovaný chromosom. Vyšetřením 1. PB získáme informaci pouze o výsledku prvního meiotického dělení. Výsledky vyšetření 1. a 2. PB je tedy třeba kombinovat, neboť ve druhém meiotickém dělení může dojít ke korekci chyby vzniklé v prvním meiotickém dělení. Hodnocení PB je často obtížné, neboť chromatin může být již značně degenerován a hrozí selhání hybridizace, rozštěpení či překryv signálů.

1.2.2.1.3 Vyšetření embryí

Pro metody PGS nebo PGD lze použít jednotlivé blastomery nebo trofoektoderm blastocysty.

Vyšetření blastomer detekuje chyby maternálního i paternálního původu. Biopsie blastomer se provádí 3. den kultivace, ve stádiu 5 - 8 buněk. K otevření zona pellucida se využívá laser, mechanické narušení nebo chemické působení roztoku kyselého Tyrodu. Pro biopsii je nutné vybrat blastomeru, která má viditelné jádro. Bioptickou pipetou se odebere 1 (maximálně 2) blastomery. Je důležité, aby při biopsii nedošlo k poškození membrány blastomery, což by mohlo vést k jejímu roztržení při biopsii nebo problému při fixaci na sklíčko pomocí hypotonického roztoku. Nevýhodou této metody je vysoká invazivita a riziko embryonálního mozaicismu (Mantzouratou and Delhanty, 2011).

Vyšetření trofoektodermu umožňuje detekovat chyby maternálního i paternálního původu, je méně invazivní metoda než biopsie blastomer. Bioptickou mikropipetou se aspiruje tkáň trofoblastu otvorem v zona pellucida. Pro oddělení pevně spojených buněk lze použít laser. Při biopsii dojde ke kolapsu dutiny blastocysty, která po několika hodinách obnoví mezibuněčné spoje i dutinu. Trofoektoderm se fixuje na podložní sklo metodou dle Coonen et al. (1994). Nevýhodou je opět riziko chromosomálního mosaicismu, který může vést k chybné diagnóze.

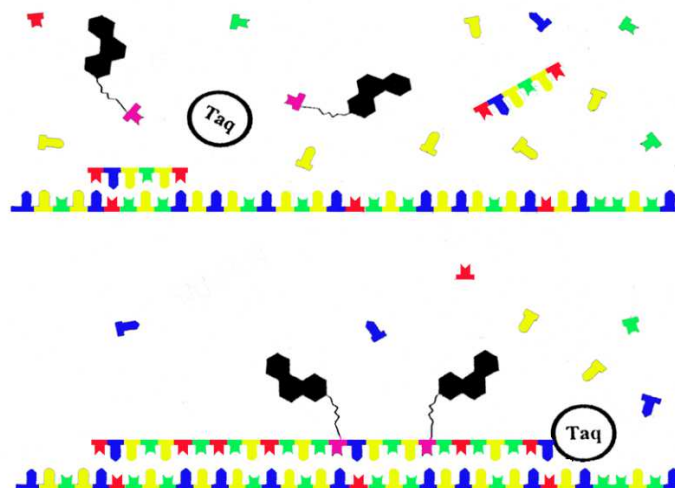
1.2.2.2 Metoda PRINS a její využití

Primed *in situ* labeling (PRINS) je metoda detekce chromosomů, založená na hybridizaci cílové DNA s primery následované elongací s inkorporací značených nukleotidů (Koch, 2004). Princip metody spočívá v *in situ* anylaci specifických, neznačených oligonukleotidových primerů ke komplementárním cílovým sekvencím denaturované DNA. Navázané primery představují iniciační místo pro elongační reakci katalyzovanou Taq DNA polymerázou v přítomnosti volných nukleotidů dATP, dCTP, dGTP, dUTP, z nichž jeden je fluorescenčně značený (obr. 9). Vizualizace fragmentů elongace je založena na inkorporaci značeného nukleotidu během *in situ* elongační reakce.

Jako primery se využívají krátké oligonukleotidové sekvence (18 – 35 nukleotidů), specifické pro centromerické repetitivní DNA sekvence specifické pro jednotlivé chromosomy (alfa-satelitní, sekvence SINE -např. Alu sekvence nebo repetitivní telomerické sekvence). Výhodou těchto primerů je jejich schopnost diskriminace mezi velmi příbuznými sekvencemi (Pellestor et al, 1995), která uděluje PRINS reakci vysokou specifitu a velmi rychlou kinetiku samotné reakce. Rozdíl v jedné bázi na 3'konci primeru zabrání iniciaci *in situ* elongace. Tak bylo možno definovat specifické alfa-satelitní primery pro chromosomy, které nelze rozlišit klasickými FISH centromerickými sondami, jako např. mezi chromosomy 13 a 21, které sdílejí 99,7% homologii ve své alfa-satelitní DNA sekvenci.

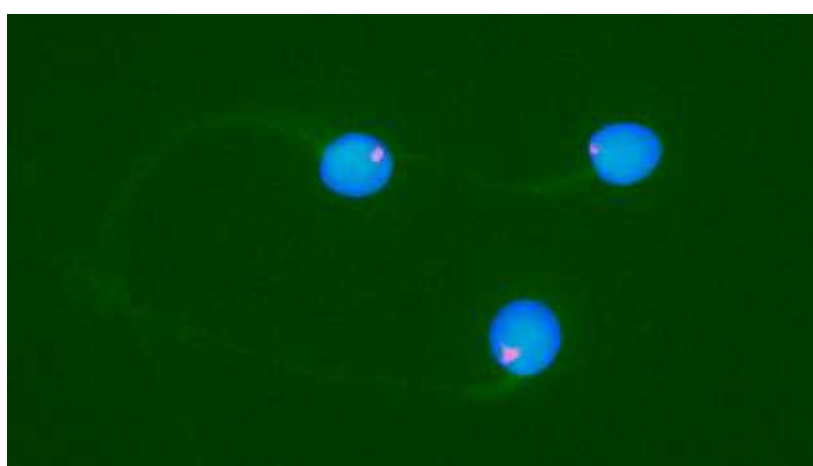
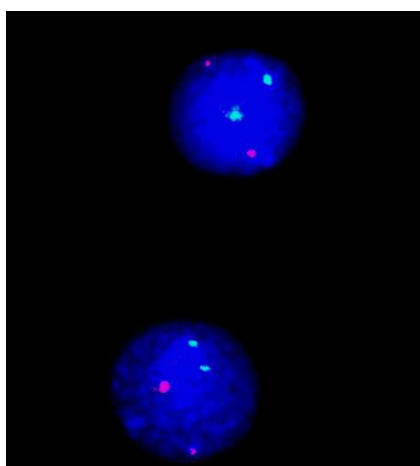
Výhodou PRINS je tedy rychlost na jedné straně a na druhé straně možnost detekovat s vyšší specifikou než konvenční FISH reakce (zejména akrocentrické chromosomy, pro které nejsou specifické alfa satelitní centromerické sondy). Další výhodou je snadná dostupnost a nízká cena primerů. Velikost sond usnadňuje jejich průnik k cílovým sekvencím, což je významné zejména u buněk s velmi kondenzovaným jádrem, jako jsou například spermie. Navíc při PRINS nedochází k poškození chromosomů během manipulace při hybridizaci a celá metoda je méně časově náročná (hybridizace 1 sondy probíhá 45 min).

Díky těmto pozitivním charakteristikám má PRINS a její varianty široké využití.



Obr. 9 Princip PRINS reakce (Pellestor et al., 1995)

Metoda PRINS zaznamenala od svého zavedení četné inovace, např. zavedením multibarevné PRINS (multicolour PRINS) s přímým značením různými fluorochromy umožňujícím detekci několika chromosomů (Pellestor et al., 1996). Metodu PRINS lze využít k detekci aneuploidie v lidských spermiích a blastomérách, pro vyšetření plodové vody, choriových klků, detekci fetálních buněk v mateřské krvi, v onkologické diagnostice ke studiu nádorových buněk a k detekci hybridních buněk apod.

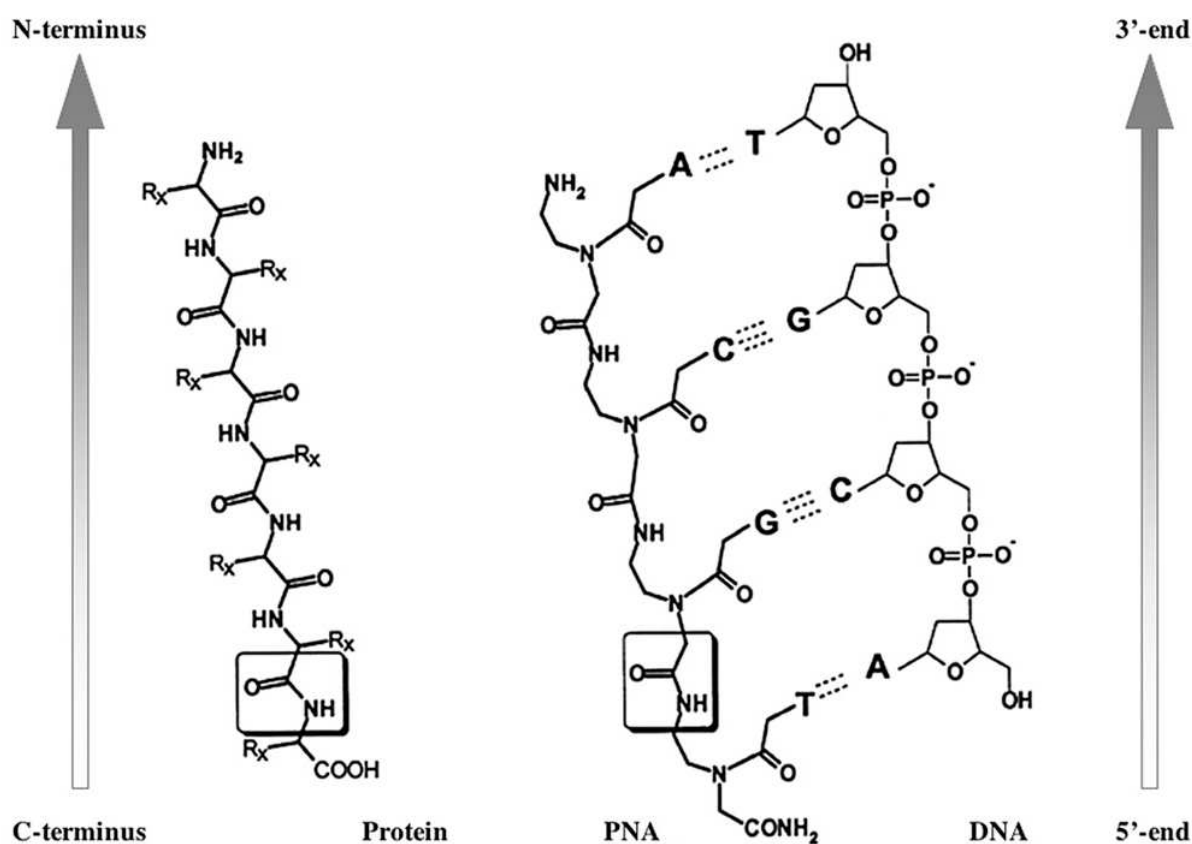


Obr.10 Využití PRINS pro vyšetření blastomer: chromosomy 1 a 18, normální nález

Obr.11 Využití PRINS pro vyšetření spermií: chromosom 18, normální nález (obojí z materiálu autorky)

1.2.2.3 Metoda PNA - FISH a její využití

První publikovaná práce týkající se stavby a vlastností PNA se objevila v časopise Science v roce 1991 (Nielsen et al., 1991). PNA (Peptide Nucleic Acid) jsou syntetické oligomery, analogy DNA, ve kterých je fosfodiesterová páteř nahrazena repetitivními jednotkami N (2-aminoethyl) glycinu, na které jsou purinové a pyrimidinové báze navázány methylkarbonylovou vazbou (obr. 12). Díky flexibilní polyamidové páteři mají PNA sondy unikátní hybridizační charakteristiky.



Obr.12 Srovnání řetězců DNA a PNA (Pellestor et al., 2004)

Fyzikálně-chemické vlastnosti PNA zahrnují:

- a) Neutralitu
- b) Vysokou stabilitu v širokém rozmezí teplot a pH
- c) Vysokou vazebnou specifitu
- d) In situ rezistenci vůči nukleázám a proteázám
- e) Dlouhou životnost

Tyto charakteristiky jsou optimálně využívány v diagnostice (Obr. 13). Díky své struktuře mají PNA sondy schopnost hybridizovat s vysokou afinitou a specifitou ke komplementárním DNA nebo RNA sekvencím. Na rozdíl od DNA a RNA, PNA páteř je neutrální, takže nevzniká žádný elektrický odpor mezi PNA a cílovými sekvencemi. Duplexy PNA-DNA nebo PNA-RNA mají tedy vyšší stabilitu než přirozené homo- nebo heteroduplexy (DNA-DNA nebo DNA-RNA duplexy). Tato vysoká stabilita vede k vyšší T_m teplotě tání než je u DNA-DNA nebo DNA-RNA duplexů (Jensen et al., 1997).

Dalším důsledkem polyamidové páteře je, že PNA hybridizují nezávisle na koncentraci solí. To znamená, že hybridizují s cílovou DNA již při jejich velmi nízkých koncentracích. PNA hybridizují k cílovým DNA nebo RNA sekvencím na základě Watson-Crickova pravidla o párování bazí. Na rozdíl od DNA, flexibilní PNA se může vázat paralelně i antiparalelně a hybridizovat s jednořetězcovou (ss) i dvouřetězcovou (ds) DNA. Preferenčně se váží antiparalelně (Rasmussen et al., 1997).

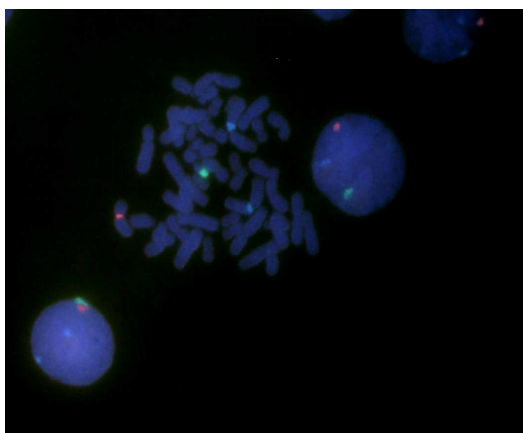
Hybridizace PNA sond ke komplementárním DNA nebo RNA sekvencím probíhá s vysokou afinitou a specifitou. PNA-DNA hybridizace je signifikantně více ovlivněna záměnou 1 báze. Ta má v komplexu PNA-DNA silně destabilizující efekt (záměna jedné báze v 15-merním duplexu PNA-DNA sníží T_m o 15° C, zatímco v duplexu DNA-DNA pouze o 10°C). Tato vysoká hladina diskriminace na úrovni 1 báze znamená, že krátké PNA sondy mají vysokou sekvenční specifitu, což umožňuje rozlišit dvě repetitivní sekvence lišící se pouze v jedné bázi, čehož nelze dosáhnout u FISH sond (Giesen et al, 1998).

Syntetická páteř PNA je rezistentní k degradaci proteázami a nukleázami. Díky této rezistenci mají PNA delší životnost *in vivo* a *in vitro*. Jak bylo uvedeno výše, tato vysoká

biostabilita zvyšuje spolehlivost PNA v diagnostických aplikacích. Vzhledem k tomu, že PNA nejsou rozpoznávány polymerázami, nemohou být použity jako primery pro amplifikaci (Ray et al., 2000).

Pro ISH se používají PNA sondy tvořené krátkými oligonukleotidy (15–25 bp). V současné době jsou dostupné centromerické a telomerické sondy. Jejich hlavními výhodami jsou vysoká rychlost hybridizace (30 – 60 minut), vysoká specifita a tím daná nízká intenzita pozadí signálu a snadné odmytí nespecifických signálů, při kterém nedochází k poškození cílové DNA. To znamená, že na jednom preparátu může být provedeno více „kol“ hybridizace než při standardní FISH.

PNA byly poprvé využity jako ligandy pro rozpoznávání dsDNA. V posledních letech se staly předmětem zájmu díky svému obrovskému potenciálu jako terapeutické agens a nástroj molekulární genetiky. Významnou úlohu hrají i v cytogenetice, kde umožnily rozvoj rychlých, jednoduchých a robustních technik pro in situ analýzu, byly testovány na mnoha typech buněk a v současné době se jejich unikátních fyzikálně-chemických vlastností využívá k různým diagnostickým a výzkumným účelům. Využití PNA sond je podrobněji popsáno v Kapitole 3.

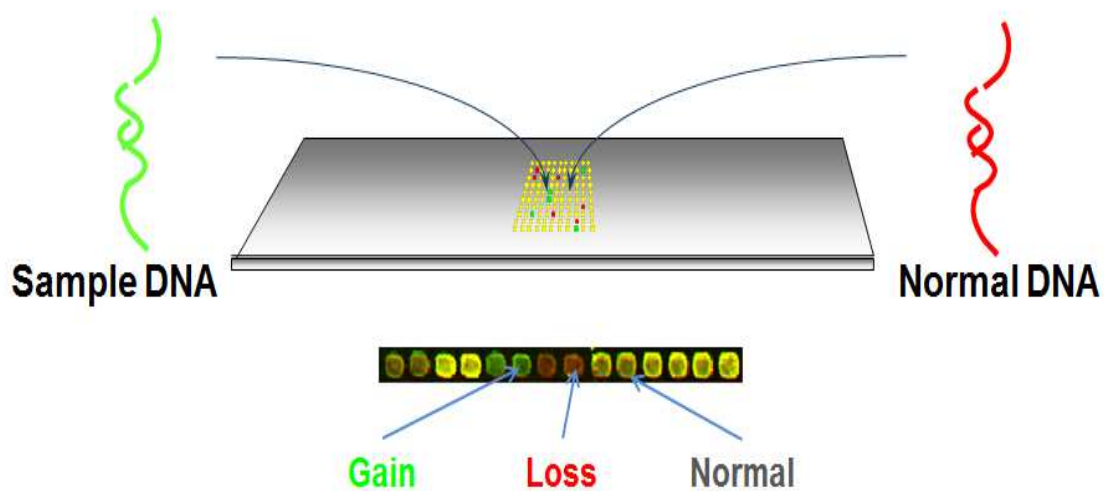


Obr.13 Využití PNA sondy, lymfocyty(archiv autorky)

1.2.2.4 Metoda aCGH a její využití

aCGH (array comparative genomic hybridization) je progresivní molekulární technika založená na hybridizaci referenční a vyšetřované DNA. Jako zdroj genetického materiálu slouží bioptované buňky (blastomery, PB, trofoektoderm), které je nejprve nutno zlyzovat a uvolněnou DNA amplifikovat. Pro lýzu a následnou celogenomovou amplifikaci (dále WGA, whole genome amplification) jsou standardně používány komerční kity. Vyšetřovaná DNA je fluorescenčně značená odlišným barvivem než referenční DNA, nejčastěji pomocí fluorescenčních barviv Cy3 a Cy5 (deriváty na bázi Cyaninu 3 a Cyaninu 5).

Fluorescenčně označený vzorek a referenční vzorek jsou následně hybridizovány s mikročipem (obr. 14). Mikročip představuje zmapované DNA sekvence lidského genomu, roboticky nanesené na povrch skla. Získaná data pak představují poměry intenzit signálů fluorescenčních značek (Cy3 a Cy5) na jednotlivých klonech BAC. Signifikantní odchylky od očekávaného poměru jsou výsledkem ztráty nebo zisku kopií DNA v poměru k referenční DNA. Software automaticky vyhodnotí odchylky od fluorescence a umožní tak automatickou vizualizaci nalezených aberací (trisomie, monosomie atd.). Tyto genomické imbalance (a tak i CA) mohou být ověřeny jinými cytogenetickými a molekulárně-genetickými metodami, jako jsou metafázní nebo interfázní FISH analýza, kvantitativní PCR metody, technika multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) případně jinými arrayCGH platformami s vyšším rozlišením.

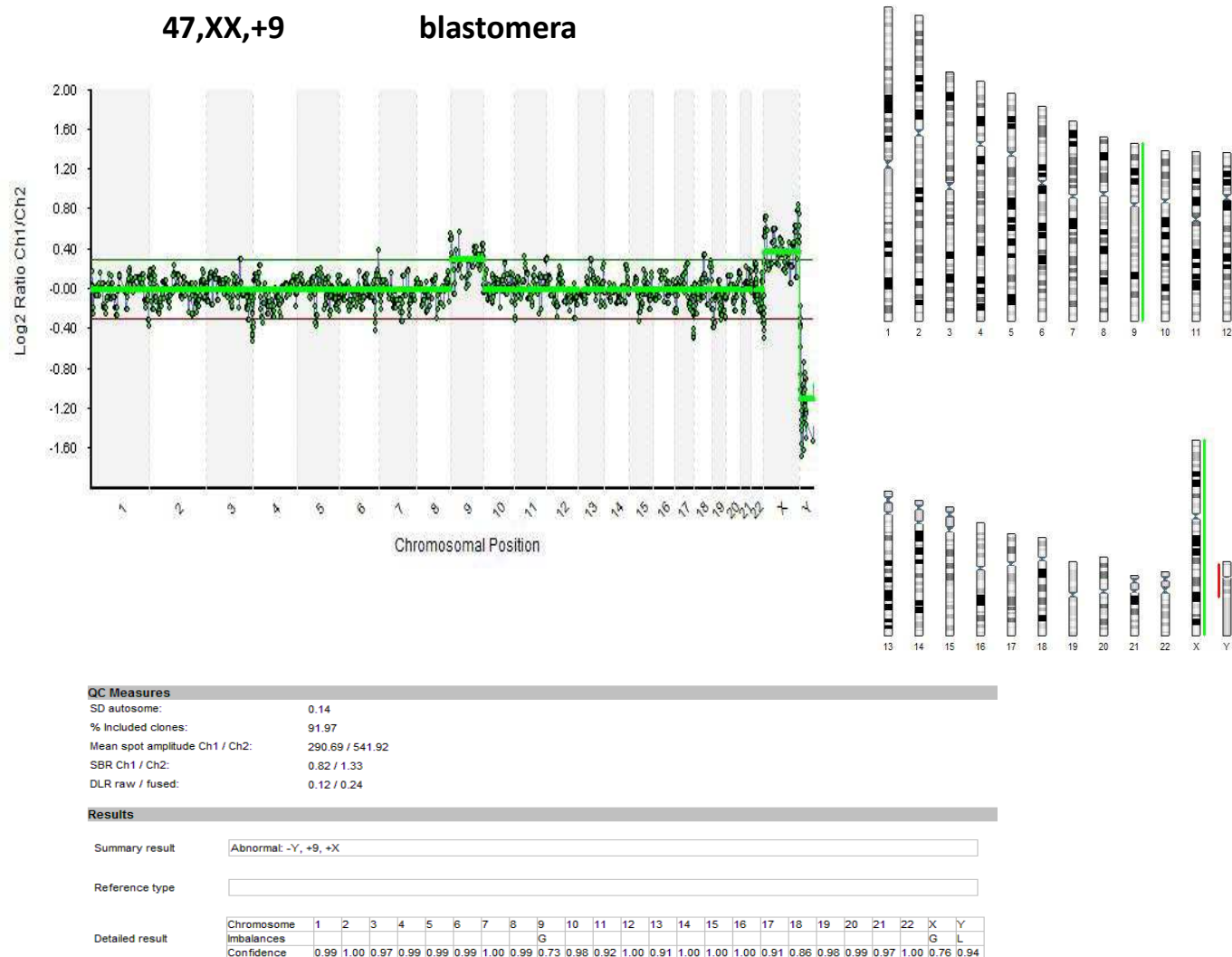


Obr.14 Princip metody aCGH (zdroj: BlueGnome)

Výhodou arrayCGH oproti metodám specifickým pro konkrétní oblasti DNA je screening celého genomu, který umožňuje odhalení i klinicky neočekávaných strukturních a početních imbalancí v genomu, včetně detekce mosaicismů při biopsii více buněk současně (trofektoderm). Nevýhodou arrayCGH technologie je především neschopnost identifikovat balancované strukturní aberace, jako jsou balancované translokace a inverze. To vyplývá z principu metody, který je založen na detekci zisku nebo ztráty množství DNA v porovnání s referenčním vzorkem. Další nevýhodou metody je její časová náročnost, která v případě vyšetření trofoektodermu neumožňuje získat výsledek v požadovaném časovém intervalu a vyžaduje zamrazení (vitifikaci) vyšetřovaných embryí a provedení kryoembryotransferu až v některém z dalších cyklů.

Pro potřeby PGS/PGD jsou v klinické praxi nejpoužívanější čipy od firmy BlueGnome 24sure/24sure+Tm (www.cambridgebluegnome.com/products/24sure/). Umožňují screening všech 24 chromosomů z jedné buňky a výběr euploidního embrya pro transfer. Do té doby všechny dostupné metody umožňovaly screening pouze omezeného počtu chromosomů. Četné studie prokázaly, že screening maximálního počtu osmi chromosomů neměl žádný benefit pro frekvenci živě narozených dětí po IVF (Fragouli and Wells, 2012).

Komerční metoda 24sure[™] v kombinaci s biopsií PB nebo trofoektodermu zvyšuje úspěšnost IVF výběrem kvalitního (euploidního) embrya na transfer, podporuje elektivní single embryo transfer (SET) a tím omezuje riziko vícečetných těhotenství. Snižuje riziko potratu, redukuje riziko narození dítěte s CA a redukuje počet cyklů IVF.



Obr.15 Příklad vyšetření blastomer metodou aCGH v naší laboratoři (nález trisomie chromosomu 9)(archiv autorky)

2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Epidemiologická data prokazují, že CA jsou hlavní příčinou VVV a významnou příčinou poruch fertility u obou pohlaví. Infertilitou je v současné době postiženo 10-15% párů. Proto jsem se ve své disertační práci zaměřila na studium chromosomových aberací a genových mutací, zejména ve vztahu k poruchám lidské fertility. Ke svému studiu jsem využila optimalizovaných molekulárně cytogenetických metod, které jsem zavedla v Centru reprodukční genetiky Ústavu biologie a lékařské genetiky v posledních deseti letech.

Základní cíle mé disertační práce zahrnují:

1/ Stanovení úrovně aneuploidie v gametách, PB a preimplantačních embryích pomocí PNA sond a komparativní analýza technik PNA-FISH versus PRINS.

Prvním cílem mé disertační práce bylo adaptovat uvedené metody pro potřeby diagnostického vyšetření v reprodukční genetice u lidských gamet a preimplantačních embryí v rámci *in situ* identifikace chromosomů a detekci jejich numerických chromosomových abnormalit a ověřit jejich účinnost v rámci PGD ve srovnání s „klasickými“ DNA sondami.

2/ Studium chromosomových aneuploidií ve spermiích nosičů zárodečné mutace v genu TP53.

Druhým cílem mé disertační práce bylo studium vlivu zárodečné mutace v genu TP53 na frekvenci chromosomové aneuploidie ve spermiích pacientů se syndromem Li-Fraumeni (dále LFS).

3/ Studium varianty rs6836703: G>A v ART3 genu a její vliv na spermatogenezi u české populace mužů s oligozoospermií a azoospermií.

Třetím cílem mé disertační práce bylo studium dopadu varianty rs6836703:G>A v genu pro ADP-ribosyltransferázu a jejího vlivu na spermatogenezi u české populace mužů s oligozoospermií a azoospermií pomocí metody HRM.

3. VÝSLEDKY A DISKUZE K PŘILOŽENÝM PUBLIKACÍM

3.1 Stanovení úrovně aneuploidií v gametách, PB a preimplantačních embryích pomocí PNA sond a komparativní analýza technik PNA-FISH versus PNA

Během prvních let mého postgraduálního studia jsem se zaměřila na rozvoj a adaptaci nových technik pro detekci CA gamet a embryí jako alternativu ke „klasické“ metodě FISH. Pro tyto účely jsem zvolila metody PRINS a zejména pak PNA sondy.

PNA sondy jsou syntetické oligomery, které hybridizují s DNA v krátkém čase, s vysokou afinitou a specifitou (viz výše, kapitola 1.2.2.3). PNA sondy byly doposud využívány k identifikaci chromosomů a testovány pro diagnostické aplikace v bakteriologii, virologii a molekulární genetice. Použití v lidské cytogenetice bylo omezeno na ojedinělé testování aneuploidií v lymfocytech. Naším cílem bylo vylepšit metodu PNA-FISH, zavést do humánní molekulární cytogenetiky a rozvinout její použití pro chromosomovou analýzu v reprodukční genetice na spermiích, oocytech, PB a embryích. Dalším cílem bylo prokázat, že tato technika může být kombinována s metodami FISH a PRINS. Obě posledně uvedené metody jsou diagnosticky důležitou alternativou konvenční metodiky FISH v oblasti reprodukční genetiky a ART.

Ověřili jsme, že obě tyto metody jsou vhodné pro *in situ* identifikaci chromosomů v lidských gametách a embryích, které jsou relativně technicky nedostupným cílovým „materiálem“, podobně jako jednotlivé buňky: lidské spermie, PB a blastomery. Základní výhodou těchto technik je vysoká specifita PRINS primerů a PNA sond, rychlost hybridizační reakce, včetně jejich vysoké schopnosti diskriminace na úrovni jedné báze. PRINS primery i PNA sondy jsou krátké nukleotidové sekvence, což usnadňuje jejich průnik k cílovým nukleotidovým sekvencím. To představuje výhodu například ve spermiích, u kterých, jak jsme ověřili, není vyžadována tak striktní dekondezace jader, jako v případě FISH sond. Podařilo se nám zavést robustní a efektivní metody pro *in situ* chromosomovou analýzu lidských gamet a embryí. V případě PRINS primerů i PNA sond jsme zavedli vícebarevný protokol umožňující vyšetření několika chromosomů v reakci pro spolehlivější identifikaci aneuploidií, zvláště u preimplantačních embryí. Demonstrovali jsme, že PRINS primery i PNA sondy jsou významným nástrojem pro molekulárně-cytogenetický výzkum a diagnostiku v reprodukční genetice.

Publikace 1

PAULASOVA, P; ANDRÉO, B; DIBLÍK, J; MACEK, M; PELLESTOR, F. The peptide nucleic acids as probes for chromosomal analysis: application to human oocytes, polar bodies and preimplantation embryos.

Mol Hum Reprod, Jun 2004, vol. 10, no. 6, p. 467-472

IF 4.542, citováno 17xj

Vyšetřili jsme celkem 34 oocytů, 17 PB a 27 blastomer z 10 embryí, která z důvodu špatné morfologické kvality nebylo možné použít pro embryo-transfer při IVF. Pro analýzu byly použity přímo značené centromerické PNA sondy specifické pro chromosomy 1, 4, 9, 16, 18, X a Y v jednoduché i sekvenční PNA reakci.

Každá sonda je krátká syntetická sekvence (18-22 bazí) specifická pro centromerické repetitivní sekvence cílových chromosomů. Sondy specifické pro chromosomy 4, 9 a X byly značeny fluoresceinem, sondy pro chromosomy 16, 18 a Y byly značeny rhodaminem a sonda specifická pro chromosom 1 diethylaminocoumarinem. Každou sondu jsme nejprve otestovali na lidských metafázních chromosomech, přičemž byla prokázána specifita značení každé sondy v rozmezí 96 až 100%.

U 27 ze 34 oocytů byla provedena jednoduchá vícebarevná PNA reakce. U 5 oocytů byla provedena kombinovaná sekvenční PNA reakce. U 2 oocytů jsme úspěšně provedli reakci s kombinací PNA a FISH sond. Po nezávislé denaturaci byla provedena hybridizace s PNA sondou pro chromosom 9 a FISH sondou pro chromosom 16 (Vysis). V 17 případech bylo vyšetření oocytů doplněno chromosomovou analýzou korespondujících PB pomocí PNA sond.

Ověřili jsme účinnost PNA sond na spermiích, izolovaných lidských oocytech, PB a blastomerech a umožnili tak rychlejší a přesnější diagnostiku chromosomových aneuploidí u gamet. To je důležité zejména v případě preimplantačního vyšetření, kdy rychlost vyšetření a stanovení diagnózy hraje velkou roli, neboť embryo je nutné transferovat do dělohy maximálně pátý den kultivace *in vitro*. To znamená, že v případě vyšetření trofoektodermu

metodou FISH je nutné embrya kryokonzervovat a transferovat pacientce do dělohy až v některém z dalších cyklů. To v případě bioptovaných embryí představuje komplikaci, neboť embrya poškozená biopsií nemusí proces zamražení a rozmražení přežít. Další výhodou je vysoká specifita PNA sond a tudíž nízká intenzita pozadí signálu, což snižuje riziko falešné diagnózy, jako v případě FISH sond. Nespornou výhodou je také to, že PNA sondy hybridizují nezávisle na koncentraci solí, což umožňuje snadnější odmytí signálů, při nižší stringenci roztoku a celkově nižší teplotě. To je důležité zejména v případě sekvenční reakce, kdy při odmývání sond navázaných v předchozí reakci může dojít k poškození vyšetřovaného materiálu a chybné interpretaci výsledků, což je v případě, kdy vyšetřovaným materiálem je jediná buňka, zásadní.

Studie ukázala možnosti využití PNA sond pro vyšetření aneuploidií oocytů, PB a blastomer. Frekvence a typy nalezených abnormalit byly v souladu s nálezy FISH studií. Prokázali jsme, že díky svým unikátním fyzikálně-chemickým vlastnostem a snadnému použití mohou být PNA sondy významným doplňkem FISH pro vyšetření gamet a preimplantačních embryí v rámci PGD/PGS.

The peptide nucleic acids as probes for chromosomal analysis: application to human oocytes, polar bodies and preimplantation embryos

P.Paulasova¹, B.Andréo², J.Diblik¹, M.Macek¹ and F.Pellestor^{2,3}

¹Laboratory of Assisted Reproduction, Motol Hospital, Václavská 84, 150 06 Praha 5, Czech Republic and ²CNRS UPR 1142, Institut de Génétique Humaine, 141 rue de la Cardonille, F-34396 Montpellier Cedex 5, France

³To whom correspondence should be addressed. E-mail: franck.pellestor@igh.cnrs.fr

Peptide nucleic acids (PNA) are synthetic DNA mimics based on an uncharged polyamide backbone, which hybridize with complementary DNA with high affinity and specificity. PNA have recently become recognized as efficient tools for *in situ* chromosomal identification. In the present study, this new approach has been tried on isolated human oocytes, polar bodies and blastomeres. Using centromeric PNA probes specific for chromosomes 1, 4, 9, 16, X and Y, we tested multicolour labelling PNA reaction on 27 oocytes and 23 blastomeres. Sequential PNA hybridization was performed on five oocytes and combined PNA and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) reactions on two oocytes. Both the rates and the types of abnormalities observed are in agreement with results from previous FISH studies. This preliminary study indicates that PNA probes allow a reliable chromosomal analysis in isolated human oocytes and blastomeres and consequently might provide an interesting adjunct to FISH for diagnostic analysis.

Key words: aneuploidy/blastomere/oocyte/peptide nucleic acids/polar body

Introduction

The advent of molecular cytogenetic techniques and their adaptation to *in situ* analysis of isolated cells have led to the development of preimplantation chromosomal analysis. The ability to investigate chromosomal content of preimplantation embryos has offered an important option to couples at risk of transmitting chromosomal abnormalities to their offspring (Handyside *et al.*, 1998). The procedure has also been extended to the *in situ* analysis of mature oocytes and polar bodies prior to IVF (Munné *et al.*, 1995; Dyban *et al.*, 1996; Petit *et al.*, 2000), in order to select chromosomally normal oocytes and then increase the efficiency of the *in vitro* reproductive procedure. To date, two techniques have been adapted to the chromosomal investigation of isolated cells, i.e. fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and primed *in situ* labelling (PRINS) (Munné *et al.*, 1993; Pellestor *et al.*, 1996; Delhanty *et al.*, 1997). They constitute two distinct procedures for *in situ* chromosomal identification and each presents advantages and disadvantages. Because of its relative simplicity and the commercial availability of numerous DNA probes, FISH has been adopted by most preimplantation genetic diagnosis (PGD) centres as the method of choice for chromosomal diagnosis. The FISH methodology has essentially been used for the sexing of embryos, the assessment of trisomy and the detection of unbalanced segregation of translocations (Scriven *et al.*, 1998; Harper and Wells, 1999).

A new technical approach has been recently introduced in cytogenetics, based on the use of peptide nucleic acids (PNA) as probes for the *in situ* detection of human chromosomes. PNA constitute a new class of synthetic DNA mimics in which the deoxyribose phosphate backbone supporting the nucleic acid bases is replaced by a non-charged peptide backbone, thus conferring more

stability and affinity to the PNA probes than to the DNA probes (Nielsen *et al.*, 1991). The efficiency of PNA probes has been demonstrated in the studies of telomeric and centromeric repeat sequences (Lansdorp *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1999), and more recently for the specific *in situ* identification of human chromosomes on lymphocytes, amniocytes and sperm (Taneja *et al.*, 2001; Pellestor *et al.*, 2003). Because PNA probes present advantages in terms of efficiency and specificity, we have conducted a study to test this new type of probe on isolated human oocytes, polar bodies and blastomeres, in order to assess the possibility of using it for preimplantation diagnosis of aneuploidy. Simple and sequential multicolour PNA labelling procedures were experimented on both human oocytes and blastomeres. PNA probes were also tested in combination with DNA probes. In the present study, we describe these new procedures and report preliminary results of the chromosomal screening performed on 34 oocytes and 23 blastomeres.

Materials and methods

Sample preparation

The present research programme was approved by the local Research Ethics Committee at the Motol Hospital. Metaphase chromosomes were freshly prepared from peripheral blood lymphocytes by standard cytogenetic methods, fixed in methanol:glacial acetic acid (3:1) and spread on cleaned slides (Verma, R.S. and Babu, H., 1995). Slides were passed through an ethanol series (70%, 90%, 100%), 2 min each step, and air-dried. Slides were then stored at room temperature until use for PNA labelling reactions.

Human oocytes were obtained from patients participating in the IVF programme. All women involved in this study were counselled about the procedure and gave consent for their unfertilized oocytes to be donated for this analysis. The oocytes used in the present study were those that had failed to

fertilize when examined 16–18 h after being incubated with sperm. These oocytes were maintained in culture for a further 24 h. After this additional culture, oocytes were observed in detail for the presence of pronuclei and polar bodies, using a phase contrast microscope. Oocytes showing no fertilization were prepared for chromosomal analysis. Fixation was performed according to the air-drying method of Tarkowski (1966). After fixation and air-drying, the slides were scanned under a phase contrast microscope. The presence of metaphase spreads and polar bodies, their quality and position on the slide were noted. This assisted in locating and photographing the material under the fluorescence microscope. Slides were then stored at room temperature.

Embryos used in the present study were donated embryos, obtained after informed consent from patients participating in IVF programmes. Embryos that had abnormal development (i.e. with unequally sized blastomeres, degenerate blastomeres, fragmentation) and were not involved in IVF procedure, were used for the present study. Embryos were biopsied on day 3. The zona pellucida was opened by laser, and two to four blastomeres were aspirated by micropipette and fixed individually on clean glass slides following the protocol of Harper *et al.* (1994). After fixation and microscopic scanning, slides were kept at room temperature.

PNA probes

PNA probes specific for chromosomes 1, 4, 9, 16, 18, X and Y were kindly provided by Applied Biosystems (formerly Boston Probes Inc., USA). Each probe consists of a mixture of several short synthetic sequences (18–22 base units) specific for the centromeric repeat sequence of the targeted chromosomes. The probes specific for chromosomes 4, 9 and X were labelled with fluorescein. The probes specific for chromosomes 16, 18 and Y were labelled with rhodamine and the chromosome 1-specific probe was labelled in blue with diethylaminocoumarine. The PNA probes were supplied ready to use in hybridization buffer.

PNA hybridization and post-hybridization washes

Before the PNA hybridization procedure, the fixed oocytes were denaturated by immersion in 70% formamide, 2× standard saline citrate (SSC) at 73°C for 3 min and then dehydrated in a series of ice-cold ethanol washes (70%, 90%, 100%) before being allowed to air-dry. Probe aliquots of 3 µl were mixed and denaturated for 6 min in a waterbath pre-heated to 73°C. The probe solution was applied to the preparation slide, covered with a 22×22 mm coverslip and placed in a humidified hybridization chamber 60 min at 37°C.

For lymphocyte and blastomere preparations, both formamide and heat denaturation were tested. In heat denaturation, the PNA hybridization mixture was added to the slide under a coverslip, sealed with rubber cement, and the preparation and PNA probes were denaturated simultaneously at 75°C for 3 min and left to hybridize at 37°C for 60 min in a moist chamber. After hybridization, the coverslips were removed by washing of slides in 1× phosphate-buffered saline (PBS), 0.1% Tween 20 for 2 min. The slides were then transferred to 58°C pre-warmed 1× PBS, 0.1% Tween 20 for 10 min and rinsed in 2× SSC, 0.1% Tween 20 for 1 min. The excess fluid was drained from the slides, which were then mounted in Vectashield antifade solution (Vector Laboratories, USA) containing 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0.3 µg/ml).

For sequential PNA hybridization on oocyte preparations, a first round of hybridization was performed with a mixture of PNA probes specific for chromosomes 1, 4 and 16. Following hybridization as described above, the coverslip was removed and the slide was washed for 3 min in 0.4× SSC at 72°C, and then in 2× SSC–0.05% Tween 20 at room temperature. The slide was counterstained with DAPI mounted in Vectashield antifade solution, and examined under an epifluorescence microscope equipped with specific filters. After recording of the results of the first labelling round, the slide was washed twice in 2× SSC–0.05% Tween 20 for 2×15 min at room temperature in order to remove immersion oil, coverslip and antifade solution. The slide was briefly rinsed in 1× PBS and distilled water before being dehydrated in an ethanol series and incubated for 2.5 min at 73°C in denaturation solution. This short denaturation step allowed removal of previously hybridized probes and gently denaturing of chromosomes. Then the second round of PNA hybridization was performed as described for the first round, using PNA probes for chromosomes 9 and 18. After hybridization, slides were washed as described above, counterstained with DAPI mounted in Vectashield antifade solution, and observed under the epifluorescence microscope.

FISH hybridization

In three embryos, the FISH technique was utilized as a control. In parallel with the PNA hybridizations performed on blastomeres, FISH assays were performed on one blastomere from each embryo, using satellite Yvis probes targeting the same chromosomes as the PNA probes. The FISH procedure was carried out according to the manufacturer's protocol for hybridization and washing.

Combined PNA and FISH assay

In two oocyte spreads, the two labelling techniques were associated. To proceed, after independent denaturation, a 5 µl PNA probe mixture specific for chromosome 9 was combined with a 5 µl Yvis hybridization mixture for chromosome 16 labelling (CEP 16 satellite II Spectrum Orange). This mixture was applied to the slides, sealed under a coverslip with rubber cement and the slides were incubated at 37°C for 60 min in a humidified box. After hybridization, the slides were washed twice 5 min in 2× SSC, 0.1% Tween 20 at room temperature, counterstained with DAPI and mounted in Vectashield antifade solution.

Microscopic analysis and scoring criteria

Slides were analysed using a Leica DMRB microscope (Leica SARL, France), equipped with a DAPI single band-pass filter (filter A, no. 513804), a fluorescein isothiocyanate (FITC) single band-pass filter (filter I3, no. 513808), a tetramethylrhodamine B isothiocyanate (TRITC) single band-pass filter (filter N2.1, no. 513812), a FITC/TRITC double band-pass filter (filter G/R, no. 513803), and a triple filter (filter B/G/R, no. 513836) for simultaneous observation of DAPI/coumarine, FITC and TRITC signals.

Previously described criteria were used for the interpretation of probe labelling in chromosome spreads and interphasic nuclei (Munné *et al.*, 1994; Anahory *et al.*, 2003). A clearly uniform and distinct spot was considered to be one single signal for one chromosome. On chromosome spreads from oocytes and polar bodies, two homologues from one univalent were considered as separated when their centromeric fluorescent signals were separated by more than the diameter of two centromeric signals. On blastomeres, two signals represented two homologous chromosomes when their distances apart were at least two centromeric signal diameters. A double-split signal was considered as one signal for one chromosome when two adjacent signals, smaller than the diameter of the other homologous signal, had no more than one relevant diameter in between the two.

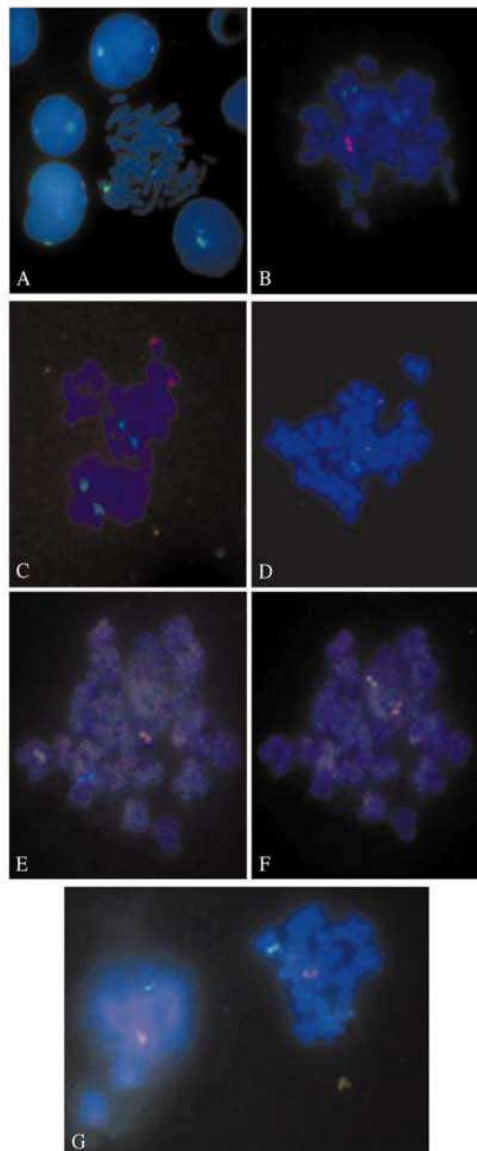
Results

PNA probes for chromosomes 1, 4, 9, 16, 18, X and Y were used in various combinations for double and triple *in situ* labelling reactions and sequential labelling procedures. Specificity and intensity of PNA probes were first evaluated on both metaphases and interphase nuclei. Specific localizations of the signals for each probe on each relevant chromosome were visualized. The PNA efficiency was tested by the recording of clearly visible fluorescent signals in 100 lymphocyte nuclei. According to the probes, the efficiency rate ranged from 96 to 100%. The resulting fluorescent signals were bright and well distinct. In double and triple colour experiments, the signals were always easily accountable without cross-hybridization or significant background (Figure 1A).

PNA assays on human oocytes were performed on a sample of 34 isolated oocytes (Table I). In 27 of them, simple multicolour PNA assays were done, and a sequential PNA procedure was experimented in five oocytes, by combining two rounds of chromosome labelling (Figure 1E, F). Two other oocytes were utilized to test the combined PNA and FISH protocol, with the PNA probe for chromosome 9 and the FISH probe for chromosome 16 (Figure 1G).

In 17 cases (14 in the group of simple PNA assay, two in the group of sequential PNA reaction, and one in a combined PNA–FISH reaction), corresponding polar bodies were obtained through the fixation procedure. Twenty-six oocytes (76.5%) displayed a normal pattern of signal according to the probes used (Figure 1B). These data

were confirmed by a similar labelling in 16 corresponding polar bodies (Figure 1C, G). In one case (P13, oocyte no. 2), a discordance between labelling in metaphase II and polar body was observed: signals for chromosomes 4 and 18 were absent in the polar body whereas the associated oocyte metaphase showed distinct spots for these two chromosomes. This discrepancy was blamed on the low quality of the polar body material, which hindered efficient hybridization of probes. Eight oocytes (23.5%) displayed numerical abnormalities for the targeted chromosomes. One case of whole chromosome hyperhaploidy was observed for chromosome 16. The non-disjunction was confirmed by the lack of this chromosome in the corresponding first polar body. Four other cells displayed supernumerary single chromatids, for chromosomes 9 (two cases), 16 and 18 respectively.



Balanced chromatid separation was observed in three oocytes, involving chromosomes 4, 16 and X (Figure 1D). Although the implication of balanced chromatid separation in the formation of aneuploidy was controversial, we chose to distinguish these events and involve them in the description of abnormal chromosomal constitution because of the significant separation of the two homologous chromatids in the three cases.

Twenty-seven blastomeres from 10 embryos were processed for PNA experiments (Table II). Four nuclei (two from embryo E5, one from embryo E7 and one from embryo E8) were lost during the fixation procedure. Consequently, successful PNA experiments were achieved on 23 nuclei. In three cases (E8, E9, E10), the FISH technique was used as control in one blastomere.

Satisfactory results were obtained with a hybridization timing of PNA probes similar to that for oocytes (i.e. 60 min). The quality of the *in situ* labelling, in terms of intensity and specificity, remained excellent (Figure 2A–D). Based on the combinations of PNA probes used, three types of chromosome patterns were observed, i.e. diploidy, aneuploidy and mosaicism. Only three embryos (E4, E7 and E10) appeared to be diploid for the chromosomes tested (Figure 2A). Three others displayed single aneuploidy: embryo E1 was found to be trisomic for chromosome 9 in the two nuclei, embryo E3 showed an extra chromosome 16, and embryo E8 displayed a monosomy for chromosome 16, confirmed by the FISH labelling of one nucleus. Embryo E5 was aneuploid for two chromosomes, with an additional chromosome 18 and a missing X chromosome. Embryos E2 and E6 displayed diploid/aneuploid mosaic pattern (Figure 2B–D). In embryo E9, an unbalanced labelling pattern was also observed in the two nuclei analysed by PNA and FISH respectively. The nucleus analysed by PNA showed monosomy 1 whereas the nucleus labelled by FISH exhibited a more complex constitution with trisomy 1 and trisomy 18. This unbalanced pattern could reflect a chaotic chromosomal constitution.

Discussion

The present study describes the first use of PNA on isolated human oocytes and blastomeres for *in situ* chromosomal identification. PNA oligomers already function efficiently in many molecular genetic methods (Nielsen, 2001), but their introduction in cytogenetics is relatively recent. PNA technology was first used for telomere *in situ* detection in cancer and ageing research, using consensus telomeric probes (Lansdorp *et al.*, 1996; Rufer *et al.*, 1998; Boei *et al.*, 2000). Subsequently, PNA has proven successful for *in situ* identification of

Figure 1. (A) *In situ* labelling of chromosomes 1, X and Y on human lymphocyte metaphase and interphase nuclei, by using multicolour peptide nucleic acid (PNA) procedure. Chromosomes 1 are labelled in blue, the X chromosome in red and the Y chromosome in green. (B) Triple target PNA labelling performed on a metaphase II human oocyte, using specific PNA probes for chromosome 1 (blue), chromosome 4 (green) and chromosome 16 (red). (C) *In situ* PNA labelling of a polar body chromosome complement using centromeric specific PNA probes for chromosomes 1 (blue), 9 (green) and 16 (red). (D) Balanced separation of the two sister chromatids of chromosomes 16 and a chromosome 9 detected by PNA *in situ* labelling. (E) Example of specific chromosome labelling obtained by using the sequential PNA labelling procedure on an oocyte metaphase II. The first reaction (E) was performed on chromosome 1 (blue signal), chromosome 4 (green signal) and chromosome 16 (red signal); the second round (F) was performed on chromosome 9 (green signal) and chromosome 18 (red signal). (G) Combined PNA and FISH labelling on an oocyte metaphase II and corresponding polar body, by using a satellite PNA probe specific for chromosome 9 (green signal) and a satellite FISH probe (CEP 16 Vysis) specific for chromosome 16 (red signal). (Magnification $\times 2000$.)

Table I. Summary of the peptide nucleic acid (PNA) analysis in 34 human oocytes and 17 polar bodies

Patient	Age (years)	Oocyte no.	PB	Labelled chromosomes						Results	Observed abnormalities
				1	4	9	16	18	X		
Simple multicolour PNA assay											
P1	32	1	N			✓		✓		Normal [9,18]	
		2	N			✓	✓		Normal [9,16]		
		3	Y	✓	✓				Normal [1,4,16]		
P2	28	1	Y	✓				✓	✓	Abnormal [1,18,chtX,chtX]	Balanced chromatids X separation
P3	33	1	N		✓				✓	Normal [4,18]	Extra chromatid 9
		2	N	✓		✓	✓		Abnormal [1,9,16,+cht9]		
P4	26	1	Y	✓			✓		✓	Normal [1,16,X]	Extra chromosome 16
P5	25	1	Y					✓	✓	Normal [18,X]	
P6	30	1	Y	✓		✓	✓			Normal [1,9,16]	
		2	N		✓			✓		Normal [4,18]	
		3	Y		✓		✓			Abnormal [4,16,16]	
P7	36	4	Y				✓		✓	Normal [16,X]	
		1	Y	✓		✓	✓		Normal [1,9,16]		
		2	N	✓			✓		✓	Normal [1,16,X]	
P8	32	1	N	✓		✓	✓			Normal [1,9,16]	Extra chromatid 18
		2	N	✓	✓			✓	Abnormal [1,4,18,+cht18]		
		3	Y		✓		✓		Normal [4,16]		
P9	28	1	N	✓				✓	✓	Normal [1,18,X]	Extra chromatid 16
P10	28	1	Y			✓	✓			Abnormal [1,9,16,+cht16]	
		2	N	✓		✓	✓		Abnormal [1,9,cht16,cht16]		
P11	29	3	Y	✓	✓					Normal [1,4,16]	Balanced chromatids 16 separation
		4	Y	✓			✓		✓	Normal [1,16,X]	
		1	N	✓	✓			✓	✓	Abnormal [1,cht4,cht4, 16]	
P12	30	2	N					✓	✓	Normal [18,X]	Balanced chromatids 4 separation
		1	Y	✓			✓		✓	Normal [1,16,X]	
		2	Y			✓	✓			Normal [9,16]	
		3	N	✓				✓	✓	Normal [1,18,X]	
Sequential multicolour PNA assay											
P13	35	1	N	✓	✓	✓	✓	✓		Abnormal [1,4,9,16,18,+cht9]	Extra chromatid 9
		2	Y	✓	✓	✓	✓	✓		Normal [1,4,9,16,18]	
P14	27	1	N	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Normal [1,4,9,16,18]	
P15	33	1	Y	✓	✓	✓	✓	✓		Normal [1,4,9,16,18]	
		2	N	✓	✓	✓	✓	✓		Normal [1,4,9,16,18]	
Combined PNA and FISH assay ^a											
P16	28	1	Y			✓	✓			Normal [9,16]	
		2	N			✓	✓			Normal [9,16]	

^aIn these experiments, chromosome 9 was labelled with a PNA probe and chromosome 16 with a satellite fluorescence *in situ* hybridization probe. PB = polar body; Y = yes; N = no; cht = chromatid.

several human chromosomes and detection of numerical abnormalities on lymphocytes, fibroblasts, amniocytes and sperm, using specific satellite PNA probes (Chen *et al.*, 2000; Taneja *et al.*, 2001; Pellestor *et al.*, 2003). The present results indicate that PNA probes can also be used for chromosomal screening on human oocytes and blastomeres. However, our study was restricted by the difficulty of obtaining sufficient numbers of oocytes and embryos, and the difficulty of performing experiments in two separate laboratories, while taking into consideration the constraints of an IVF programme.

To validate the efficiency of the PNA procedure, we used the FISH technique as control in three labelling experiments. The FISH assays confirmed the results obtained with PNA. Of course, no technique can guarantee a total labelling efficiency. To date, in FISH studies of human oocytes, the rate of FISH errors has been estimated at 10% (Dailey *et al.*, 1996; Munné *et al.*, 1996), and a review of the various FISH-based procedures applied on human oocytes and blastomeres (CGH, M-FISH, multilocus FISH) shows that all these approaches present pitfalls limiting their efficiency. The results obtained with the PNA method in our small series indicate that PNA probes are at least as efficient as FISH probes. A confirmation of this efficiency is provided by the confirmatory results obtained in polar bodies, since only one case of discordance was observed between signals in metaphase II oocytes and first polar bodies.

To evaluate the suitability of the PNA technique, we have tested various procedures using PNA probes, such as a sequential labelling procedure or in combination with FISH labelling. The sequential labelling procedure constitutes a simple and economical approach for scoring several chromosomes. The elementary hybridization protocol of PNA probes lends itself well to this type of procedure, and the PNA binding does not lose its efficiency. Using the described intermediate washing procedure, no significant residual signals from previous hybridization were seen, and the background signals remained low, probably because of the high binding specificity of the PNA probes which limited the illegitimate binding of probes, and the short time of *in situ* hybridization.

Also, the possibility of combining PNA and FISH on a same preparation opens up interesting possibilities for multiplex assays, with larger combinations of fluorochromes. The PNA are compatible with a wide range of reporter molecules and fluorochromes. The present data describe the use of PNA combined with the most currently used fluorochromes (fluorescein, rhodamine and coumarine), but the procedure of PNA synthesis allows labelling of the PNA molecules with other fluorochromes such as Cyanine and Alexa dyes, available in a wide variety of colours. Because the introduction of PNA into cytogenetics is recent, the commercial availability of PNA probes is still limited to consensus telomeric and human-specific

Table II. Summary of the peptide nucleic acid analysis on 10 preimplantation embryos

Embryo no.	Maternal age	No. of nuclei analysed	Labelled chromosomes							Results
			1	4	9	16	18	X	Y	
E1	28	2			✓	✓				Abnormal [9,9,9,16,16]
E2	31	3	✓			✓				Abnormal [1,1,X,Y] [1,1,X] [1,1,Y]
E3	39	2	✓	✓		✓				Abnormal [1,1,4,4,16,16,16]
E4	26	2						✓	✓	Normal [1,1,X,Y]
E5	31	1	✓				✓	✓		Abnormal [1,1,18,18,18]
E6	34	3	✓					✓	✓	Abnormal [1,1,9,9,16,16] [1,1,9,9,9,16,16] [1,1,9,16,16]; normal [1,1,9,9,18,18]
E7	30	2	✓		✓		✓			Abnormal [1,1,9,9,16]
E8*	32	3	✓		✓	✓				Abnormal [1,9,9,18,18]
E9*	31	2	✓		✓		✓			Abnormal [1,9,9,18,18] [1,1,1,9,9,18,18,18]
E10*	27	3	✓			✓		✓		Normal [1,1,16,16,X,X]

*Chromosomal pattern confirmed by fluorescence *in situ* hybridization probe.

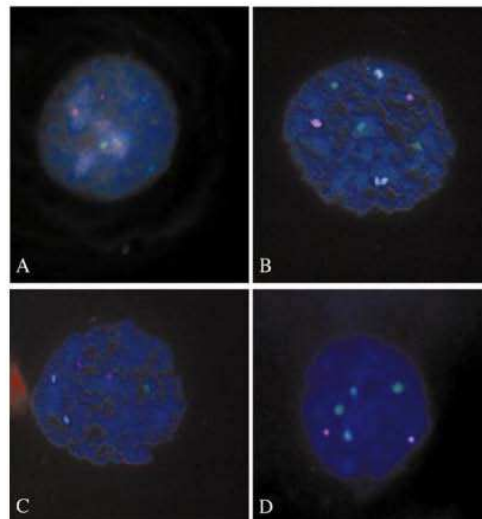


Figure 2. (A) *In situ* peptide nucleic acid (PNA) labelling of a normal blastomere using centromere specific probes for chromosomes 1, 9 and 18. (B D) Three nuclei from an abnormal embryo displaying a mosaic for chromosomes 9. Chromosomes 1, 9 and 16 are labelled in blue, green and red respectively. The first nucleus (B) shows a trisomy 9 and the second (C) a monosomy 9 whereas the third nucleus (D) presents a normal diploid chromosome pattern. (Magnification $\times 2000$.)

satellite probes, and their prices remain 20% more expensive than the FISH probes. One may hope that the success of the first generation of centromeric PNA probes will stimulate the future production of an extended variety of PNA probes and a decrease in their cost. Custom-made PNA molecules for unique sequences can already be obtained from manufacturers.

Both rates and types of abnormalities scored in oocytes and blastomeres are in good agreement with the data of previous FISH studies. The incidence of abnormalities observed in our oocyte sample is within the range of the aneuploid rates currently found in FISH studies (Dailey *et al.*, 1996; Mahmood *et al.*, 2000; Pujol *et al.*, 2003), with the identification of chromosome non-disjunction, extra single

chromatid and balanced chromatid separation (Table I). In the same way, PNA assays revealed the occurrence of frequent chromosomal abnormalities, such as aneuploidy and mosaicism, in preimplantation embryos, in accordance with data from other molecular cytogenetic analyses (Delhanty *et al.*, 1997; Marquez *et al.*, 2002).

The PNA technology possesses undeniable advantages for *in situ* recognition of complementary DNA sequences. The unique chemical make-up of these probes confers numerous beneficial properties, including enhanced hybridization rate, *in situ* resistance to nucleases and proteases and high stability over a wide pH range. Hybridization of DNA probes to DNA is destabilized by electrostatic repulsion between the negatively charged phosphate backbones of complementary strands. On the contrary, the neutral backbone of PNA oligomers provides very strong binding between PNA and DNA strands. Unlike DNA probes, which require high salt concentration to bind, PNA probes can bind to DNA targets under low ionic strength conditions which disfavour reannealing of complementary strands. This advantage is particularly interesting for targeting repetitive sequences, since both their length and their repetitive nature facilitates *in situ* renaturation over hybridization with probes. These properties mean that it is not necessary to design long PNA probes. PNA oligomers from 15 to 25 units, like those used in the present study, constitute efficient probes for fast *in situ* detection of specific DNA sequences, without generating significant background.

The present study indicates the feasibility of using PNA probes on isolated cells such as human oocytes and blastomeres. Because of the simplicity and the rapidity of the PNA procedure, these preliminary results shows that PNA provides a new and interesting approach for basic chromosomal analysis, particularly when chromosome identification must be performed on limited amounts of material and in a limited time-period, such as in preimplantation diagnosis. Further studies are needed to validate this approach and assess its limitations before clinical application can be considered. We hope that this preliminary presentation of the emergent PNA technology will encourage larger scale follow-up studies. One can predict that *in situ* PNA methodology is going to make significant progress, and if future work demonstrates the accuracy of PNA, the procedure may act as a valuable complement to FISH for *in situ* cytogenetic investigations.

Acknowledgements

Supported by a European grant COPERNICUS 2 (Contract ICA CT 2000 10012, proposal ICA2 1999 20007).

References

- Anahory T, Andréo B, Régner-Vigouroux G, Soulié JP, Baudouin M, Demaille J and Pellestor F (2003) Sequential multiple probe fluorescence in-situ hybridisation analysis of human oocytes and polar bodies by combining centromeric labelling and whole chromosome painting. *Mol Hum Reprod* 9,577–585.
- Boei JJWA, Vermeulen S and Natarajan AT (2000) Analysis of radiation-induced chromosomal aberrations using telomeric and centromeric PNA probes. *Int J Rad Biol* 76,136–167.
- Chen C, Hong YK, Ontiveros SD, Egholm M and Strauss WM (1999) Single base discrimination of CENP-B repeats on mouse and human Chromosomes with PNA-FISH. *Mamm Genome* 10,13–18.
- Chen C, Wu B, Wei T, Egholm M and Strauss WM (2000) Unique chromosome identification and sequence-specific structural analysis with short PNA oligomers. *Mamm Genome* 11,384–391.
- Dailey T, Dale B, Cohen J and Munné S (1996) Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes. *Am J Hum Genet* 59,176–184.
- Delhanty JD, Harper JC, Ao A, Handyside AH and Winston RM (1997) Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet* 99,755–760.
- Dyban A, Freidine M, Severova E, Cieslak J, Ivakhnenko V and Verlinsky Y (1996) Detection of aneuploidy in human oocytes and corresponding first polar bodies by fluorescent in situ hybridization. *J Assist Reprod Genet* 13,73–78.
- Handyside AH, Scriven PN and Ogilvie CM (1998) The future of preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 13(Suppl. 4),249–255.
- Harper JC and Wells D (1999) Recent advances and future developments in PGD. *Prenat Diagn* 19,1193–1199.
- Harper JC, Coonen E, Ramaekers PC, Delhanty JD, Handyside AH, Winston RM and Hopman AH (1994) Identification of the sex of human preimplantation embryos in two hours using an improved spreading method and fluorescent in-situ hybridization (FISH) using directly labelled probes. *Hum Reprod* 9,721–724.
- Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, Raap AK and Tanke HJ (1996) Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 5,685–691.
- Mahmood R, Brierley CH, Faed MJ, Mills JA and Delhanty JD (2000) Mechanisms of maternal aneuploidy: FISH analysis of oocytes and polar bodies in patients undergoing assisted conception. *Hum Genet* 106,620–626.
- Marquez C, Sandalinas M, Hahçe M, Alikani M and Munné S (2002) Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *RBMOnline* 1,17–26.
- Munné S and Weier HUG (1996) Simultaneous enumeration of chromosomes 13, 18, 21, X and Y in interphase cells for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Cytogenet Cell Genet* 75,263–270.
- Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J and Cohen J (1993) Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 8,2185–2191.
- Munné S, Grifo J, Cohen J and Weier H-UG (1994) Chromosome abnormalities in arrested human preimplantation embryos: a multiple probe fluorescence in situ hybridization (FISH) study. *Am J Hum Genet* 55,150–159.
- Munné S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J and Cohen J (1995) The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod* 10,1014–20.
- Nielsen PE (2001) Peptide nucleic acid: a versatile tool in genetic diagnostics and molecular biology. *Curr Opin Biotechnol* 12,16–20.
- Nielsen PE, Egholm M, Berg RH and Buchardt O (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254,1497–1500.
- Pellestor F, Girardet A, Coignet L, Andréo B and Charlier JP (1996) Assessment of aneuploidy for chromosomes 8, 9, 13, 16 and 21 in human sperm by using primed in situ labelling technique. *Am J Hum Genet* 58,797–802.
- Pellestor F, Andréo B, Taneja K and Williams B (2003) PNA on human sperm: a new approach for in situ aneuploidy estimation. *Eur J Hum Genet* 11,337–341.
- Petit C, Martel-Petit V, Fleurentin A, Monnier-Barbarino P, Jonveaux P and Gérard H (2000) Use of PRINS for preconception screening of polar bodies for common aneuploidies. *Prenat Diagn* 20,1067–1071.
- Pujol A, Boiso I, Benet J, Veiga A, Durban M, Campillo M, Egozcue J and Navarro J (2003) Analysis of nine chromosome probes in first polar bodies and metaphase II oocytes for the detection of aneuploidies. *Eur J Hum Genet* 11,325–336.
- Rufer N, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E and Lansdorp PM (1998) Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat Biotechnol* 16,743–747.
- Scriven PN, Handyside AH and Ogilvie CM (1998) Chromosome translocations: segregation modes and strategies for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 18,1437–1449.
- Taneja KL, Chavez EA, Coull J and Lansdorp PM (2001) Multicolor fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for enumeration of specific chromosomes in human cells. *Genes Chromosomes Cancer* 30,57–63.
- Tarkowski A (1966) An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs. *Cytogenetics* 5,394–400.
- Verma RS and Babu H (1995) *Human Chromosomes. Principles and Techniques*. 2nd Edition, McGraw-Hill Inc, New York, USA.

Submitted on February 2, 2004; resubmitted on February 18, 2004; accepted on February 25, 2004

Publikace 2

PELLESTOR F, PAULASOVA P, ANDRÉO B, LEFORT G, HAMAMAH S.

Multicolor PRINS and multicolor PNA.

Cytogenet Genome Res 2006; 114: 263-269

IF 1.885, citováno 5x

Cílem této práce byla komparativní analýza technik PRINS a PNA, které jsme rozvinuli a adaptovali na lidské gamety a embrya. Obě metody jsou významnou alternativou konvenční FISH metody. Ověřili jsme, že obě tyto metody představují výhody pro in situ identifikaci chromosomů lidských gamet a embryí, které jsou technicky náročným cílovým vyšetřovacím materiálem, jako jsou lidské spermie, PB a blastomery. Největší výhodou těchto technik je vysoká specifita PRINS primerů a PNA sond, rychlost hybridizační reakce a jejich vysoká schopnost diskriminace.

PRINS primery i PNA sondy jsou krátké nukleotidové sekvence, což usnadňuje jejich průnik k cílovým nukleotidovým sekvencím. To představuje výhodu například ve spermiích, u kterých, jak jsme ověřili, není vyžadována tak striktní dekondezace jader, jako v případě FISH sond. Podařilo se nám zavést robustní, rychlé a efektivní metody pro in situ chromosomální analýzu lidských gamet a embryí. V případě PRINS i PNA jsme zavedli vícebarevný protokol umožňující vyšetření několika chromosomů v reakci pro spolehlivější identifikaci aneuploidií, zvláště u preimplantačních embryí. Demonstrovali jsme, že PRINS i PNA jsou významným nástrojem pro molekulárně-cytogenetický výzkum a diagnostiku.

Multicolor PRINS and multicolor PNA

F. Pellestor^a P. Paulasova^b B. Andréo^a G. Lefort^c S. Hamamah^d^aCNRS UPR 1142, Institute of Human Genetics, Montpellier (France);^bCentre of Assisted Reproduction and Reproductive Genetics, Motol Hospital, Praha (Czech Republic);Departments of ^cCytogenetics, and ^dReproductive Biology B, Arnaud de Villeneuve Hospital, Montpellier (France)

Manuscript received 3 November 2005; accepted in revised form for publication by T. Liehr, 7 December 2005.

Abstract. Both PRImed IN Situ (PRINS) and Peptide Nucleic Acid (PNA) technologies have emerged as research techniques, but they have quickly evolved to applications in biological diagnosis assays. The two procedures now constitute efficient alternatives to the conventional fluorescence in situ hybridization (FISH) procedure for in situ chromosome identification and aneuploidy detection. They present several ad-

vantages (specificity, speed, discriminating ability) that make them very attractive for a number of cytogenetic purposes. Multicolor PRINS and PNA protocols have been described for the specific identification of human chromosomes. Various applications have already been developed in human genetics and new adaptations are ongoing.

Copyright © 2006 S. Karger AG, Basel

Since its introduction, fluorescence in situ hybridization (FISH) has found multiple applications in molecular research and diagnosis, due to its unique capability of visualizing nucleic acid sequences without altering the cell's cytological and chromosomal integrity. The use of FISH has led to the development of new methodologies for chromosomal screening in both metaphases and interphase nuclei, and consequently FISH has rapidly found increasing applications in cytogenetics (Levsky and Singer, 2003). However, for the identification of human chromosomes and aneuploidy detection, FISH can be hampered by the lack of specificity of some centromeric probes and the occurrence of arte-

factual binding sites (Eastmond et al., 1995). Thus, in FISH studies performed on human preimplantation embryos, labeling errors have been estimated to be around 10% (Dailey et al., 1996). In their recent study on human oocytes, Pujol et al. (2003) estimated that 25.8% of their FISH data were artefactual, on the basis of metaphase II/first polar body comparison.

Alternative cytogenetic methods to FISH have been introduced and have been shown to be valuable in detecting chromosomes and quantifying aneuploidies. These alternative procedures are the PRImed IN Situ (PRINS) labeling and the Peptide Nucleic Acid (PNA) probes. This article provides a brief overview of both PRINS and PNA procedures. Some of the latest innovative improvements of these techniques and their practical applications in the field of cytogenetics are presented.

Supported by the French research project PHRC (N° 7732) from the C.H.U. of Montpellier and the European INTAS project N° 03-51-4060. P. Paulasova is recipient of a Czech research grant (VZ FNM 00000064203).

Request reprints from Dr. Franck Pellestor
IGH, CNRS UPR 1142
141 rue de la Cardonille
FR-34396 Montpellier Cedex 5 (France)
telephone: +33 (0)4 99 61 99 12; fax: +33 (0)4 99 61 99 01
e-mail: Franck.Pellestor@igh.cnrs.fr

The PRINS technique

Principles and methodology

Based on the use of chromosome-specific primers, the PRINS reaction combines the high sensitivity of the PCR reaction with the cytological localization of DNA sequences

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com© 2006 S. Karger AG, Basel
1424-8581/06/1144-0263\$23.50/0Accessible online at:
www.karger.com/cgr

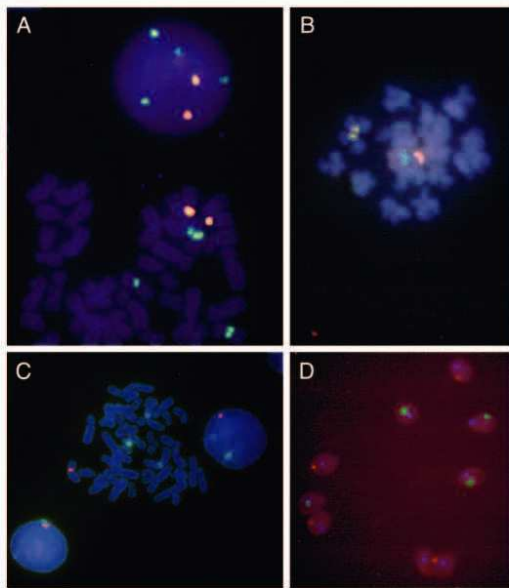


Fig. 1. Examples of multicolor PRINS and PNA in situ labeling. (A) Human metaphase and interphase nucleus labeled by triple color PRINS reaction. Centromeres of chromosomes 1 are labeled in yellow, centromeres of chromosomes 7 in green and centromeres of chromosomes 9 in red. (B) Triple color PRINS labeling of human oocyte chromosomes with chromosome 1 in yellow, chromosome 7 in green and chromosome 16 in red. (C) In situ PNA labeling of chromosomes 1 (blue), X (red) and Y (green) on human lymphocyte metaphase and interphase nuclei, using the multicolor PNA procedure. (D) Fast detection of chromosome 1 (blue spots), X (red spots) and Y (green spots) in human sperm nuclei using multicolor PNA technique.

(Koch et al., 1989). The chromosomal identification is performed by in situ annealing of specific and unlabeled oligonucleotide primers to complementary sites on denatured chromosome spreads, nuclei or tissue sections. Cells or tissue samples are fixed and denatured before PRINS reaction, both to preserve morphology and to permit access of the reagents to the target sequence. The annealed primers provide initiation sites for chain elongation catalyzed by a Taq DNA polymerase in the presence of free nucleotides, of which at least one is labeled. The in situ visualization of generated fragments results from the incorporation of the labeled nucleotide.

PRINS labeling of human chromosomes is obtained using primers for repeated DNA sequences. An advantage of primers is their ability to differentiate between closely related sequences. This feature has been utilized for generating chromosome-specific primers from the alpha-satellite DNA motif. These centromeric repeats are made up of a variable number of monomers of 171 bp in length and are organized as alpha-

satellite subfamilies. The DNA sequences of monomers slightly deviate among subfamilies and individual chromosomes (Wevrick and Willard, 1989). The chromosome specificity of PRINS labeling is based on the use of primers generated from these chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences. The lengths of the PRINS primers range from 18 to 35 nucleotides. Compared to the size of DNA repetitive probes (250 to 600 bp), this small size greatly facilitates their in situ accessibility to their genomic target sequences. This is particularly significant in cells with highly condensed nuclei, such as nucleated fetal cells or spermatozoa. Because they are unlabeled, high amounts of primers can also be used in PRINS reaction without inducing background signals. The complementation process between the primer and its centromeric target will be so specific that a simple mismatch between the 3'-end of the primer and the genomic sequence will prevent initiation of the in situ elongation by the Taq DNA polymerase (Bottema and Sommer, 1993). Thus, it has been possible to define specific alpha-satellite primers for some chromosomes undistinguishable by FISH with centromeric probes, such as chromosomes 13 and 21 which share 99.7% homology in their alpha-satellite DNA sequences (Pellestor et al., 1994; Yang et al., 2001).

Initially, PRINS reactions were performed either on a hotplate or a waterbath, but these procedures did not allow precise and durable temperature control. The PRINS protocol has been considerably improved and simplified by the introduction of programmable temperature cyclers equipped with a flat plate block. The use of automatic thermocyclers allows an optimization of both annealing and extension conditions. Thus, semi-automatic PRINS protocols have been developed offering a high reproducibility in labeling reactions.

An additional improvement was the direct use of fluorochromes in sequential PRINS reactions (Gosden and Lawson, 1994; Pellestor et al., 1995a). Recently, a new multicolor PRINS protocol has been reported (Fig. 1A), allowing us to perform ultra-rapid detection of several chromosomes, by only mixing different fluorochromes during the chain elongation reaction (Yan et al., 2001; Pellestor et al., 2002a). Each PRINS reaction consists of a unique 4-minutes step for annealing and elongation of each chromosome-specific primer. This new sequential procedure simplifies PRINS and provides an easy way to carry out multicolor labeling.

Applications and perspectives

The PRINS procedure combines several features that make it very attractive for a number of cytogenetic purposes. Various applications of PRINS have already been developed in humans, mammals (Russo et al., 1996; Pinton et al., 1998; Lavoie et al., 2003), fish (Martins and Galetti, 1999), insects (Gu et al., 1997), and plants (Abbo et al., 1993; Pich et al., 1995; Kubalakova et al., 1997), demonstrating that PRINS could be easily adapted to various types of cells.

In humans, PRINS has been successfully tested for the assessment of aneuploidy in lymphocytes (Werner et al., 1997), amniocytes (Velagelati et al., 1998; Mennicke et al., 2003), oocytes (Fig. 1B) and preimplantation embryos (Pellestor et

al., 1996a, 2004; Petit et al., 2000). The use of PRINS has also been reported for analysis of structural aberrations such as translocations, marker chromosomes and ring chromosomes (Brandt et al., 1993; Hindkjaer et al., 1995; Velagaleti et al., 1997). Since the PRINS reaction with Alu primers results in high quality R-like banding on human chromosomes, the procedure has been adapted for the cytogenetic screening of somatic hybrid cell lines and identification of euchromatin in aberrant short arms of acrocentric chromosomes and small ring chromosomes (Callen et al., 1997). Thanks to the high specificity of the PRINS reaction, Krejci and Koch (1998) were able to detect individual variations in the human telomeric repeat domains, and then to study the organization of all the individual chromosome ends. They utilized PRINS primers, specific for the G-rich strands and the C-rich strands of telomeric repeats, and an original procedure of dideoxy-PRINS, eliminating background staining due to cross-hybridization and breaks in the chromosomal DNA. The clinical efficiency of this PRINS method for detecting rearrangements of telomeric regions was demonstrated in the cytogenetic study of 65 children with unexplained mental retardation (Bonifacio et al., 2001).

Also, PRINS has been tested to detect fetal cells among maternal nucleated cells from peripheral venous blood of pregnant women (Orsetti et al., 1998). Thus, using PRINS, Krabchi et al. (2001) determined the number of fetal cells in maternal blood between 18 and 22 weeks of gestation. Further applications of PRINS have also been found in tumor cytogenetics, opening new possibilities for cytogeneticists and pathologists (Wilkins et al., 1997; Pellestor et al., 1999). All these applications point out the potential efficiency of PRINS for diagnostic use.

Some research studies have reported the use of PRINS for the direct estimation of disomy and diploidy rates in human sperm (Pellestor et al., 1996b, 2002b). The assessment of aneuploidy rates in human gametes is of critical importance because nondisjunctions make a major contribution to the chromosomal abnormalities found in humans. The FISH strategy using centromeric probes has been first adapted to human spermatozoa. However, FISH analysis of male gametes is hampered by the strong condensation of sperm nuclei. To date, FISH studies of human sperm have reported considerable variations in the frequency of chromosome disomy (Egozcue et al., 1997). In PRINS reactions, decondensation of the sperm head is a less limiting factor than in FISH because of the small size of the oligonucleotide primers. This greatly facilitates their penetration into sperm nuclei resulting in a more homogeneous and more rapid labeling of sperm nuclei. Using PRINS, diploidy and disomy frequencies have been estimated for autosomes and sex chromosomes in sperm samples from several normal fertile donors (Pellestor et al., 2002b). The PRINS procedure has also been used to directly investigate the meiotic segregation patterns of reciprocal translocations in sperm (Pellestor et al., 1997).

The adaptation of PRINS to in situ detection of unique sequences remains an important challenge. Indeed, with PRINS simple primers are used for in situ labeling of chro-

somal loci. This approach would circumvent the difficulties linked to the preparation of DNA probes, and could rapidly map newly discovered genes on chromosomes by using synthetic oligonucleotides derived from sequenced DNA. The advantage of the PRINS approach is that it does not rely on the possession of a cloned probe for the target. As long as the sequence of the gene is known, oligonucleotides can be synthesized for use as primers. Several teams have been working on this project. Preliminary results have been obtained on porcine chromosomes (Troyer et al., 1994) and efficient PRINS localizations of several genes have been performed on human metaphases. Thus, in situ detections of single copy genes have been reported in constitutional abnormalities (Tharapel et al., 2002), sex chromosome abnormalities (Kadandale et al., 2000; Cinti et al., 2002), and abnormalities in cancer (Tharapel and Kadandale, 2002). This opens new and promising perspectives for PRINS in the area of physical mapping. However, the use of PRINS for unique sequence detection again needs to be improved. Further studies are required to validate this approach and assess its limitations before clinical applications can be considered.

The PNA technique

Definition and properties

Over the last decade, the development of modified oligonucleotides has known a significant upsurge of interest because of the tremendous potential of modified oligonucleotides as therapeutic agents and tools in molecular genetics. Among all the synthetic nucleic acid analogs designed, the peptide nucleic acids (PNAs) constitute a remarkable class of nucleic acid mimics (Nielsen et al., 1991).

PNAs are synthetic mimics of DNA in which the deoxyribose phosphate backbone supporting the nucleic acid bases is replaced by a non-charged peptide backbone (Pellestor and Paulasova, 2004). The unique chemical makeup of these molecules confers a number of beneficial properties. Unlike DNA and RNA, the PNA backbone is not charged. Consequently, there is no electrostatic repulsion when PNA hybridizes to its target nucleic acid sequence, giving a higher stability to the PNA-DNA or PNA-RNA duplexes than the natural homo- or heteroduplexes (Jensen et al., 1997). An additional consequence of the polyamide backbone is that PNAs hybridize virtually independently of the salt concentration. Thus, the formation of PNA-DNA duplex is barely affected by low ionic strength. This significantly facilitates the hybridization with the PNAs. The synthetic backbone of PNAs also means that PNAs are particularly resistant to protease and nuclease degradation (Demidov et al., 1993). Because of this resistance to enzyme degradation, the lifetime of PNAs is extended both in vivo and in vitro. Finally, PNA molecules are not recognized by polymerases and therefore cannot be copied or used directly as primers, nor can PNA oligomers be enzymatically incorporated into amplicons (Ray and Norden, 2000).

PNAs hybridize to complementary DNA or RNA in a sequence dependent manner, according to the Watson-Crick

hydrogen bonding scheme. In contrast to DNA, PNA can bind in either parallel or anti-parallel fashion, and hybridize with either single-stranded DNA or double-stranded DNA. Homopyrimidine PNAs, as well as PNAs containing a high proportion of pyrimidine residues, bind to complementary DNA sequences to form highly stable (PNA)₂-DNA triplex helices. In these structures, one PNA strand hybridizes to DNA through standard Watson-Crick base pairing rules, while the other PNA strand binds to DNA through Hoogsteen hydrogen bonds. The resulting structure is an unusual helix conformation called D-loops (Nielsen and Egholm, 1999).

Finally, PNA-DNA hybridization is significantly more affected by base mismatches than DNA-DNA hybridization. A single mismatch in a mixed PNA-DNA 15-mer duplex decreases the melting temperature (*T_m*) by up to 15°C, whereas in the corresponding DNA-DNA complex, a single mismatch decreases the *T_m* by only 11°C (Giesen et al., 1998). This high level of discrimination at single base level has indicated that short PNA probes (from 17 to 22 base units) could offer high specificity.

Applications and perspectives

PNA was originally conceived of as a reagent for sequence-specific recognition of double-stranded DNA via triple helix formation (Nielsen et al., 1991). However, the unique properties of PNA as a DNA mimic have quickly led to the development of various applications. Most notably, PNAs find current uses in molecular biological techniques as specific and sensitive probes for complementary nucleic acids. PNA oligomers are powerful probes in Southern and Northern blotting but also for mutation research. Polymerization of PNA oligomers into polyacrylamide gels creates a medium in which the unique properties of PNA/DNA interactions are utilized to achieve hybridization with single-stranded target DNA during affinity electrophoresis. Such a procedure has been used to identify single point mutations (Corey, 1997). However, the greatest benefit of PNA comes from the development of new diagnostic assays. For example, PNA technology drastically reduces assay times compared to standard methods for bacterial analysis, by using PNA probes that target specific ribosomal RNA sequences (Von Wintzingerode et al., 2000). Because of their high affinity and stability, PNA oligomers are also employed in transcription inhibition (antigene strategy) and translation inhibition (antisense strategy) (Vickers et al., 1995; Larsen et al., 1999; Doyle et al., 2001).

The introduction of PNA probes in cytogenetics as an efficient variation to FISH for chromosome identification is recent. Thanks to its high binding specificity, a single 15-mer PNA probe can substitute for a set of longer DNA probes. Also, the neutral backbone of PNAs allows them to bind to DNA under low ionic strength conditions, which discourage reannealing of complementary genomic strands. This is particularly advantageous for *in situ* targeting of repeat sequences for which both the length and the repetitive nature can favor renaturation over hybridization with probes. Additional benefits of using PNAs are lower background signals

and unlimited stability of the probe mixture (Williams et al., 2002). Also, PNAs are compatible with a wide range of reporter molecules and fluorochromes. Because the introduction of PNA in human cytogenetics is recent, the availability of PNA probes is still limited to consensus telomeric and human-specific alphoid probes. Their prices remain 20% more expensive than the FISH probes. However, one can hope that the success of the first generation of centromeric specific PNA probes will stimulate the future production of an extended variety of PNA probes and a decrease in their costs.

The PNA-FISH technique was first used for quantitative telomere analysis. The study of telomere behavior has become a sensitive subject because of telomere involvement in the processes of cancer evolution and cellular senescence. FISH has been successfully utilized for the *in situ* detection of telomeric repeat sequences in chromosomes of various species, using synthetic oligonucleotide probes, but the efficiency of these probes has not been sufficient to extend this procedure beyond qualitative analysis of repeat telomeric sequences. To monitor telomere length quantitatively, Lansdorp et al. (1996) utilized fluorescein-labeled PNA probes. By comparing fluorescein-labeled DNA, RNA and PNA probes, they first showed that PNA probes yielded superior staining of telomeres. The PNA-FISH approach allowed the distinction of fluorescence of individual sister chromatid ends and the accurate estimate of individual and global telomere length in metaphase chromosomes of various cultured human hematopoietic cells. Subsequently, telomere PNA probes were used in several *in situ* studies of cancer and ageing (Zijlman et al., 1997; Boei et al., 2000; Mathioudakis et al., 2000). The employment of the PNA method for *in situ* detection and sizing of telomeric repetitive sequences was compared to PRINS. The two techniques were used on mouse, hamster and human cell lines and the results were identical in terms of labeling efficiency and sensitivity (Serakinci and Koch, 1999).

Further developments of PNA technology were focused on the improvement of the specificity of PNA probes and the *in situ* detection of numerical chromosome abnormalities. Chen et al. (1999) reported that PNA probes could discriminate between two centromeric DNA repeat sequences that differ by only a single base pair. Identical results were obtained with PRINS primers (Pellestor et al., 1995b) and oligonucleotide probes (O'Keefe et al., 1996), but never with standard DNA probes. The identification of chromosomal variation and the analysis of polymorphisms could greatly benefit from the discrimination power of PNAs. The procedure of PNA synthesis allows us to consider the further production of allele-specific probes. This will constitute an evident improvement to the current labeling techniques.

Several chromosome-specific PNA probes were designed and tested. Chen et al. (2000) defined specific PNA probes for alpha-satellite domains of nine chromosomes (chromosomes 1, 2, 7, 9, 11, 17, 18, X and Y) and used them successfully on metaphases and interphase nuclei. To demonstrate the potential utility of PNA probes in clinical application, cultured and uncultured amniocyte preparations were also analyzed, giv-

ing rates of hybridization efficiency of 90–97%. Taneja et al. (2001) tested other PNA probes for chromosomes 1, X and Y, directly labeled with fluorochromes, on normal human lymphocytes and fibroblasts with abnormal chromosome contents. A fast and simple multicolor PNA protocol was utilized (Fig. 1C), demonstrating the easy use of PNA probes for in situ labeling assays.

Recently, Pellestor et al. (2003) tested PNA on human sperm (Fig. 1D). The adaptation of PNA technology to human spermatozoa constituted an interesting challenge because of the particularities of the sperm nucleus in terms of genomic compaction and accessibility of DNA sequences. To estimate and validate the efficiency of PNA labeling on human sperm, comparative estimates of nondisjunctions for chromosomes X, Y and 1 were performed on sperm preparations from healthy subjects using multicolor FISH, PRINS and PNA procedures. An equivalent quality of in situ nuclear labeling and similar disomy rates were obtained with the three methods. However, the hybridization timing of PNA probes (i.e. 45 minutes) was considerably shortened in comparison with FISH reaction, which requires an overnight hybridization in order to be efficiently completed on sperm preparations (Downie et al., 1997). The fast hybridization kinetics of PNAs on sperm was comparable to the kinetics of PRINS reactions. This similarity might be due to the small size of both PNA probes and PRINS primers. This data pointed out the great potential of PNA probes for chromosomal screening on difficult biological material.

Lastly, the PNA strategy has been applied on isolated human oocytes, polar bodies and blastomeres in order to assess the possibility of using PNA probes for preimplantation cytogenetic diagnosis (Paulasova et al., 2004). Using directly labeled satellite PNA probes for chromosomes 1, 4, 9, 16, 18, X and Y, simple and sequential multicolor PNA labeling procedures were tested on in vitro unfertilized oocytes and blastomeres. Both rates and types of chromosomal abnormalities scored were in good agreement with results of previous FISH studies. PNA probes have also been utilized in combination with FISH probes for improving chromosomal labeling on human blastomeres, by using a strategy of competitive displacement of labeled PNA probes (Agerholm et al., 2005). These first uses of PNA probes on isolated cells have confirmed the efficiency of PNA technology for in situ chromosomal analysis and have indicated that PNAs could become an efficient complement of FISH for PGD.

New contributions of PNAs could come from the development of applications that cannot be performed using DNA probes. The remarkable hybridization properties of PNAs suggest that PNA oligomers may be efficiently incorporated into microarrays and probably could improve the timing of the whole procedure, especially when applied on single cells (Weiler et al., 1997). Another promising feature of PNAs might be linked to the development of in vivo fluorescence imaging. The capability to introduce fluorescent probes in living cells will allow deeper study of live gene expression and mRNA transfer (Tyagi and Kramer, 1996). This innovative approach will be more easily applied than non hybridization-based GFP-fusion protein systems, and the new multi-photon

microscopy will provide efficient tools to visualize multiple gene expression patterns in single living cells (Konig, 2000). Due to their high in vivo stability and resistance to enzymes and the flexibility of their synthesis procedure, PNA oligomers conjugated to cell-permeable peptides or liposomes, have a great potential for the future of non-invasive medical imaging.

Conclusion

The fast hybridization, penetration and discrimination of PRINS primers and PNA probes make them valuable tools for in situ chromosomal screening. The techniques are already being implemented in research protocols and medical assays of increasing diagnostic value, adding both the sensitivity and the specificity to standard procedures. With the availability of reagents and the development of rapid and simplified protocols producing reliable and reproducible results, both PRINS and PNA could become powerful tools for cytogenetic investigations and diagnosis. They have a great potential for clinical applications, particularly when chromosomal identification must be performed on limited amounts of material and in a limited time period. Both these techniques can advantageously be used to complement FISH and PCR for the physical mapping of the human genome and one can predict that they are going to make still significant progress during the next few years.

References

- Abbo S, Dunford RP, Miller TE, Reader SM, King IP: Primer-mediated in situ detection of the B-hordein gene cluster on barley chromosome 1H. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11821–11824 (1993).
- Agerholm JE, Ziehe S, Williams B, Berg C, Crüger DG, Bruun Petersen G, Kolvraa S: Sequential FISH analysis using competitive displacement of labelled peptide nucleic acid probes for eight chromosomes in human blastomeres. *Hum Reprod* 20:1072–1077 (2005).
- Boei JJWA, Vermeulen S, Natarajan AT: Analysis of radiation-induced chromosomal aberrations using telomeric and centromeric PNA probes. *Int J Rad Biol* 76:163–167 (2000).
- Bonifacio S, Centrone C, Da Prato L, Scordo MR, Estienne M, Torricelli F: Use of primed in situ labeling (PRINS) for the detection of telomeric deletions associated with mental retardation. *Cytogenet Cell Genet* 93:16–18 (2001).
- Bottema CDK, Sommer SS: PCR amplification of specific alleles: rapid detection of known mutations and polymorphisms. *Mutat Res* 288:93–102 (1993).
- Brandt CA, Kierkegaard O, Hindkjaer J, Jensen PKA, Pedersen S: Ring chromosome 20 with loss of telomeric sequences detected by multicolour PRINS. *Clin Genet* 44:26–31 (1993).
- Callen DF, Yip MY, Eyre HJ: Rapid detection of euchromatin by Alu-PRINS: use in clinical cytogenetics. *Chromosome Res* 5:81–85 (1997).
- Chen C, Hong YK, Ontiveros SD, Egholm M, Strauss WM: Single base discrimination of CENP-B repeats on mouse and human chromosomes with PNA-FISH. *Mamm Genome* 10:13–18 (1999).
- Chen C, Wu B, Wei T, Egholm M, Strauss WM: Unique chromosome identification and sequence-specific structural analysis with short PNA oligomers. *Mamm Genome* 11:384–391 (2000).
- Cinti C, Stuppia L, Maradi NM: Combined use of PRINS and FISH in the study of the dystrophin gene. *Am J Med Genet* 107:115–118 (2002).
- Corey DR: Peptide nucleic acids: expanding the scope of nucleic acid recognition. *Trends Biotechnol* 15:224–229 (1997).
- Dailey T, Dale B, Cohen J, Munné S: Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes. *Am J Hum Genet* 59:176–184 (1996).
- Demidov V, Frank-Kamenetskii MD, Egholm M, Buchard O, Nielsen PE: Sequence selective double strand DNA cleavage by peptide nucleic acid (PNA) targeting using nuclease S1. *Nucleic Acids Res* 21:2103–2107 (1993).
- Downie SE, Flaherty SP, Matthews CD: Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 3:585–598 (1997).
- Doyle DF, Braasch DA, Simmons CG, Janowski BA, Corey DR: Inhibition of gene expression inside cells by peptide nucleic acids: effect of mRNA target sequence, mismatched bases, and PNA length. *Biochemistry* 40:53–64 (2001).
- Eastmond DA, Schuler M, Rupa DS: Advantages and limitations of using fluorescence in situ hybridization for the detection of aneuploidy in interphase human cells. *Mutat Res* 348:153–162 (1995).
- Egozcue J, Blanco J, Vidal F: Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update* 3: 441–452 (1997).
- Giesen U, Kleider W, Berding C, Geiger A, Orum H, Nielsen PE: A formula for thermal stability (T_m) prediction of PNA/DNA duplexes. *Nucleic Acids Res* 26:5004–5006 (1998).
- Gosden J, Lawson D: Rapid chromosome identification by oligonucleotide-primed in situ DNA synthesis (PRINS). *Hum Mol Genet* 3:931–936 (1994).
- Gu HF, Lind MI, Wieslander L, Landegren U, Söderhäll K, Melefors O: Using PRINS for gene mapping in polytene chromosomes. *Chromosome Res* 5:463–465 (1997).
- Hindkjaer J, Hammoudah SAFM, Hansen KB, Jensen PD, Koch J, Pedersen B: Translocation (1;16) identified by chromosome painting and primed in situ labeling (PRINS). *Cancer Genet Cytogenet* 79:15–20 (1995).
- Jensen KK, Orum H, Nielsen PE, Norden B: Hybridization kinetics of peptide nucleic acids (PNA) with DNA and RNA studied with BIAcore technique. *Biochemistry* 36:5072–5077 (1997).
- Kadandale JS, Wachtel SS, Tunca Y, Wilroy RS Jr, Martens PR, Tharapel AT: Localization of SRY by primed in situ labeling in XX and XY sex reversal. *Am J Med Genet* 95:71–74 (2000).
- Koch JE, Kolvraa S, Petersen KB, Gregersen N, Bolund L: Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labeling of alpha satellite DNA in situ. *Chromosoma* 98:259–265 (1989).
- König K: Multiphoton microscopy in life sciences. *J Microsc* 200:83–104 (2000).
- Krabchi K, Gros-Louis F, Yan J, Bronsard M, Masse J, Forest JC, Drouin R: Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques. *Clin Genet* 60:145–150 (2001).
- Krejci K, Koch J: Improved detection and comparative sizing of human chromosomal telomeres in situ. *Chromosoma* 107:198–203 (1998).
- Kubalaková M, Macas J, Dolezel J: Mapping of repeated DNA sequences in plant chromosomes by PRINS and C-PRINS. *Theor Appl Genet* 94: 758–763 (1997).
- Landsdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, et al: Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 5:685–691 (1996).
- Larsen HJ, Bentin T, Nielsen PE: Antisense properties of peptide nucleic acid. *Biochim Biophys Acta* 1489:159–166 (1999).
- Lavoie J, Bronsard M, Lebel M, Drouin R: Mouse telomere analysis using an optimized primed in situ (PRINS) labeling technique. *Chromosoma* 111:438–444 (2003).
- Levsky JM, Singer RH: Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J Cell Sci* 116: 2833–2838 (2003).
- Martins C, Galetti PM: Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res* 7:363–367 (1999).
- Mathioudakis G, Storb R, McSweeney PA, Torok-Storb B, Landsdorp PM, et al: Polyclonal hematopoiesis with variable telomere shortening in human long-term allogeneic marrow graft recipients. *Blood* 96:3991–3994 (2000).
- Mennicke K, Yang J, Hinrichs F, Müller A, Diercks P, Schwinger E: Validation of primed in situ labeling for interphase analysis of chromosomes 18, X and Y in uncultured amniocytes. *Fetal Diagn Ther* 18:114–121 (2003).
- Nielsen PE, Egholm M: An introduction to peptide nucleic acid. *Curr Issues Mol Biol* 1:89–104 (1999).
- Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O: Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254:1497–1500 (1991).
- O'Keefe CL, Warburton PE, Matera AG: Oligonucleotide probes for alpha satellite DNA variants can distinguish homologous chromosomes by FISH. *Hum Mol Genet* 5:1793–1799 (1996).
- Orsetti B, Lefort G, Boulot P, Andreo B, Pellestor F: Fetal cells in maternal blood: the use of primed in situ (PRINS) labelling technique for fetal cell detection and sex assessment. *Prenat Diagn* 18: 1014–1022 (1998).
- Paulasova P, Andréo B, Diblík J, Macek M, Pellestor F: The Peptide Nucleic Acids (PNAs) as probes for chromosomal analysis: application to human oocytes, polar bodies and preimplantation embryos. *Mol Hum Reprod* 10:467–472 (2004).
- Pellestor F, Paulasova P: The peptide nucleic acids (PNAs): introduction to a new class of probes for chromosomal investigation. *Chromosoma* 112: 375–380 (2004).
- Pellestor F, Girardet A, Andréo B, Charlieu JP: A polymorphic alpha satellite sequence specific for human chromosome 13 detected by oligonucleotide primed in situ labelling (PRINS). *Hum Genet* 94:346–348 (1994).
- Pellestor F, Girardet A, Lefort G, Andréo B, Charlieu JP: Selection of chromosome specific primers and their use in simple and double PRINS techniques for rapid in situ identification of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 70:138–142 (1995a).
- Pellestor F, Girardet A, Lefort G, Andréo B, Charlieu JP: Rapid in situ detection of chromosome 21 by PRINS technique. *Am J Med Genet* 56:393–397 (1995b).
- Pellestor F, Girardet A, Andréo B, Lefort G, Charlieu JP: The PRINS technique: potential use for rapid preimplantation embryo chromosome screening. *Mol Hum Reprod* 2:135–138 (1996a).
- Pellestor F, Girardet A, Coignet L, Andréo B, Charlieu JP: Assessment of aneuploidy for chromosomes 8, 9, 13, 16, and 21 in human sperm by using primed in situ labeling technique. *Am J Hum Genet* 58:797–802 (1996b).
- Pellestor F, Girardet A, Coignet L, Andréo B, Lefort G, Charlieu JP: Cytogenetic analysis of meiotic segregation in sperm from two males heterozygous for reciprocal translocations using PRINS and humster techniques. *Cytogenet Cell Genet* 78:202–208 (1997).
- Pellestor F, Andréo B, Coullin P: Interphase analysis of aneuploidy in cancer cell lines using primed in situ labeling. *Cancer Genet Cytogenet* 111:111–118 (1999).
- Pellestor F, Malki S, Andréo B, Lefort G: Ultra-rapid multicolour PRINS protocol for chromosome detection in human sperm. *Chromosome Res* 10: 359–367 (2002a).
- Pellestor F, Imbert I, Andréo B: Rapid chromosome detection by PRINS in human sperm. *Am J Med Genet* 107:109–114 (2002b).
- Pellestor F, Andréo B, Taneja K, Williams B: PNA on human sperm: a new approach for in situ aneuploidy estimation. *Eur J Hum Genet* 11:337–341 (2003).
- Pellestor F, Anahory T, Andréo B, Régnier-Vigouroux G, Soulié JP, Baudouin M, Demaille J: Fast multicolor primed in situ protocol for chromosome identification in isolated cells may be used for human oocytes and polar bodies. *Fertil Steril* 81: 408–415 (2004).

- Petit C, Martel-Petit V, Fleurentin A, Monnier-Barbarino P, Jonveaux P, Gérard H: Use of PRINS for preconception screening of polar bodies for common aneuploidies. *Prenat Diagn* 20:1067–1071 (2000).
- Pich U, Meister A, Macas J, Dolezel J, Lucretti S, Schubert I: Primed in situ labelling facilitates flow sorting of similar sized chromosomes. *Plant J* 7:1039–1044 (1995).
- Pinton A, Ducos A, Séguéla A, Berland HM, Darré R, et al: Characterization of reciprocal translocations in pigs using dual-colour chromosome painting and primed in situ DNA labelling. *Chromosome Res* 6:361–366 (1998).
- Pujol A, Boiso I, Benet J, Veiga A, Durban M, et al: Analysis of nine chromosome probes in first polar bodies and metaphase II oocytes for the detection of aneuploidies. *Eur J Hum Genet* 11:325–336 (2003).
- Ray A, Norden B: Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *FASEB J* 14:1041–1060 (2000).
- Russo A, Priante G, Tommasi AM: PRINS localization of centromeres and telomeres in micronuclei indicates that in mouse splenocytes chromatid non-disjunction is a major mechanism of aneuploidy. *Mutat Res* 372:173–180 (1996).
- Serakinci N, Koch J: Detection and sizing of telomeric repeat DNA in situ. *Nat Biotechnol* 17:200–201 (1999).
- Taneja KL, Chavez EA, Coull J, Lansdorp PM: Multicolor fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for enumeration of specific chromosomes in human cells. *Genes Chromosomes Cancer* 30:57–63 (2001).
- Tharapel AT, Kadandale JS, Martens PR, Wachtel SS, Wilroy RS Jr: Prader Willi/Angelman and DiGeorge/Velocardiofacial syndrome deletions: diagnosis by primed in situ labeling (PRINS). *Am J Med Genet* 107:119–122 (2002).
- Tharapel SA, Kadandale JS: Primed in situ labeling (PRINS) for evaluation of gene deletions in cancer. *Am J Med Genet* 107:123–126 (2002).
- Troyer DL, Xie H, Goad DW, Skinner DZ: Use of a new technique to map the porcine alpha interferon gene to chromosome 1. *Mamm Genome* 5:112–114 (1994).
- Tyagi S, Kramer FR: Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* 14:303–308 (1996).
- Velagaleti GVN, Tharapel SA, Martens PR, Tharapel AT: Rapid identification of marker chromosomes using primed in situ labeling (PRINS). *Am J Med Genet* 71:130–133 (1997).
- Velagaleti GVN, Shulman LP, Phillips OP, Tharapel SA, Tharapel AT: Primed in situ labeling for rapid prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol* 178:1313–1320 (1998).
- Vickers TA, Griffith MC, Ramasamy K, Risen LM, Freier SM: Inhibition of NF-kappaB specific transcriptional activation by PNA stand invasion. *Nucleic Acids Res* 23:3003–3008 (1995).
- Von Wintzingerode F, Landt O, Ehrlich A, Gobel UB: Peptide nucleic acid-mediated PCR clamping as a useful supplement in the determination of microbial diversity. *Appl Environ Microbiol* 66:549–557 (2000).
- Weiler J, Gausepohl H, Hauser N, Jensen ON, Hoheisel JD: Hybridisation based DNA screening on peptide nucleic acid (PNA) oligomer arrays. *Nucleic Acids Res* 25:2792–2799 (1997).
- Werner M, Wilkens L, Nasarek A, Tchinda J, Komminoth P: Detection of karyotype changes in interphase cells: oligonucleotide-primed in situ labelling versus fluorescence in situ hybridization. *Virchows Arch* 430:381–387 (1997).
- Weyrick R, Willard HF: Long-range organization of tandem arrays of alpha satellite DNA at the centromeres of human chromosomes: high-frequency array-length polymorphism and meiotic stability. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9394–9398 (1989).
- Wilkens L, Komminoth P, Nasarek A, Von Wasielewski R, Werner M: Rapid detection of karyotype changes in interphase bone marrow cells by oligonucleotide primed in situ hybridization (PRINS). *J Pathol* 181:368–373 (1997).
- Williams B, Stender H, Coull JM: PNA fluorescent in situ hybridization for rapid microbiology and cytogenetic analysis, in Nielsen PE (ed): *Peptide Nucleic Acids: Methods and Protocols*, pp 181–193 (Humana Press Inc, Totowa 2002).
- Yan L, Bronsard M, Drouin R: Creating a new color by omission of 3' end blocking step for simultaneous detection of different chromosomes in multi-PRINS technique. *Chromosoma* 109:565–570 (2001).
- Yang J, Schwinger E, Mennicke K: Primed in situ labeling: sensitivity and specificity for detection of alpha-satellite DNA in the centromere regions of chromosomes 13 and 21. *Cytogenet Cell Genet* 95:28–33 (2001).
- Zijlman MJM, Martens UM, Poon SSS, Raap AK, Tanke HJ, Ward RK, Lansdorp PM: Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7423–7428 (1997).

Publikace 3

PELLESTOR F, PAULASOVA P, MACEK M, HAMAMAH S

Peptide nucleic acids (PNAs) as diagnostic devices for genetic and cytogenetic analysis

Curr Pharma Design 2008; 14: 2439-2444

IF 3.696, citováno: 19x

V této práci jsme shrnuli výsledky a poznatky předchozích studií týkajících se využití PNA sond v reprodukční medicíně a doplnili o poznatky týkající se vývoje této technologie a jejich aplikace v jiných oblastech molekulární genetiky a cytogenetiky. Rovněž jsme shrnuli výhody diagnostického využití PNA sond. V současné době jsou PNA sondy využívány např. pro detekci jednonukleotidových změn v microarray konfiguraci. V molekulární cytogenetice jsme demonstrovali jejich výhody pro chromosomovou analýzu spermií, oocytů a blastomer.

Výhodou je také možnost uplatnění těchto sond in vivo, kdy pomocí fluorescenčního značení je možná přímá analýza genové lokalizace a exprese. Díky své stabilitě a rezistenci mají PNA oligomery velký potenciál pro rozvoj těchto nových neinvazivních metod v in vivo studiích a diagnostice PGD/PGS. Kromě jejich využití jako hybridizačních sond, se v současné době využívají k mapování genů, v antigenní terapii, k detekci mutací. V molekulární cytogenetice jsou využívány pro různé výzkumné aplikace, kde byla prokázána výrazně vyšší efektivita než u FISH sond. Takovým příkladem je analýza telomer. Řada prací také hodnotí vysokou spolehlivost PNA sond pro studium jaderné topologie (Nagele et al, 2001), kinetiky distribuce chromosomů během buněčného cyklu, stejně jako pro mnoho jiných klinických a diagnostických aplikací.

Peptide Nucleic Acids (PNAs) as Diagnostic Devices for Genetic and Cytogenetic Analysis

Franck Pellestor^{1,2,3,*}, Petra Paulasova⁴ and Samir Hamamah^{1,2,3}

¹INSERM U847, Institute for Research in Biotherapy, Hôpital St Eloi, Montpellier, France; ²Université Montpellier I, UFR de Médecine, Montpellier, France; ³Service de Biologie de la Reproduction, Hôpital Arnaud de Villeneuve, CHRU Montpellier, France and ⁴Centre of Assisted Reproduction and Reproductive Genetics, Institut of Biology and Medical Genetics, Motol Hospital, Praha, Czech Republic

Abstract: The peptide nucleic acids (PNAs) constitute a remarkable new class of synthetic nucleic acids analogs, based on peptide-like backbone. This structure gives to PNAs the capacity to hybridize with high affinity and specificity to complementary RNA and DNA sequences, and a great resistance to nucleases and proteinases. Originally conceived as ligands for the study of double stranded DNA, the unique physico-chemical properties of PNAs have led to the development of a large variety of research and diagnostic assays in the field of genetics, including genome mapping and mutation detection. Over the last few years, the use of PNAs has also proven its powerful usefulness in cytogenetics for the rapid *in situ* identification of human chromosomes and the detection of aneuploidies. Recent studies have reported the successful use of chromosome-specific PNA probes on human lymphocytes, amniocytes, spermatozoa as well as on isolated oocytes and blastomeres. Multicolor peptide nucleic acid-fluorescence *in situ* hybridization (PNA-FISH) protocols have been described for the identification of several human chromosomes, indicating that PNAs could become a powerful tool for *in situ* chromosomal investigation.

Key Words: PNA, PNA-DNA Duplex, PNA-PCR, PNA-FISH, Mutation, Chromosome, Aneuploidy.

INTRODUCTION

Recent advances in genomic technologies have opened up new avenues in the diagnoses and the management of genetic diseases. Molecular genetic techniques are used increasingly in diagnostic and research laboratories to supplement or replace traditional assay, and the application of these new procedures for fast, simple and reliable DNA analyses have significantly simplified the routine assessment of patients in the genetic clinic. In this way, the development of modified oligonucleotides has known a significant upsurge of interest and has become a central feature of biotechnology because of their tremendous potential as therapeutic agents and tools in molecular genetics. Over the last decade, nucleic acid tools have been extensively modified, by replacing the phosphodiester linker or the sugar-phosphodiester backbone by various neutral or charged structures [1, 2].

Among all the synthetic nucleic acid analogs designed so far, the peptide nucleic acids (PNAs) constitute a remarkable class of synthetic nucleic acid analogs with important properties [3]. Thus, PNAs display neutral backbone which significantly increase the binding strength to complementary nucleic acids. In addition, these molecules are stable under acidic conditions, resistant to nucleases and proteases, and permit hybridization under low or no salt condition. Consequently, an expanding variety of PNA-based sensitive methods have been developed in the field of genetics, including genome mapping and detection of genomic polymorphisms and mutations [4]. Recently, this new type of oligomers has also been introduced in cytogenetics. The properties of PNAs have allowed the development of fast, simple and robust PNA-FISH assays for *in situ* chromosomal investigations, and the efficiency of PNA probes has been demonstrated on various types of cells.

The present review provides an overview of PNAs properties and highlights the techniques exploiting PNA technology in molecular genetics and cytogenetics.

PNA CHEMISTRY AND PROPERTIES

PNAs are synthetic DNA analogs in which the phosphodiester backbone is replaced by repetitive units of N-(2-aminoethyl) glycine to which the purine and pyrimidine bases are attached *via* a methyl carbonyl linker [4]. The procedures for PNA synthesis are similar to those employed for peptide synthesis, using standard solid-phase manual or automated synthesis [5]. A subsequent generation of PNAs could involve modification of the N-(2-aminoethyl) glycine backbone (PNA analogs) or chimeric architecture, like PNA-peptide chimeras or PNA-DNA chimeras developed in order to improve the solubility and the cellular uptake of PNAs or to exhibit new biological properties [6,7]. The unique chemical makeup provides PNA with unique hybridization characteristics. Unlike DNA and RNA, the PNA backbone is not charged. Consequently, there is no electrostatic repulsion when PNA hybridizes to its target nucleic acid sequence, giving a higher stability to the PNA-DNA or PNA-RNA duplexes than the biological homo- or heteroduplexes. This greater stability results in higher thermal melting temperature (T_m) values than is observed for DNA-DNA or DNA-RNA duplexes [8]. An additional consequence of the polyamide backbone is that PNAs hybridize virtually independently of the salt concentration. Thus, the T_m of PNA-DNA duplex is barely affected by low ionic strength. This significantly facilitates the hybridization with the PNAs. The unnatural backbone of PNAs also means that PNAs are particularly resistant to protease and nuclease degradation [9]. Because of this resistance to the enzyme degradation, the lifetime of PNAs is extended both *in vivo* and *in vitro*. This high biostability increases the reliability of PNAs in diagnostic applications. As a further consequence of their synthetic backbone, PNA molecules are not recognized by polymerases and therefore cannot be copied or used directly as primers, nor can PNA oligomers be enzymatically incorporated into amplicons [10].

PNAs hybridize to complementary DNA or RNA in a sequence dependent manner, according to the Watson-Crick hydrogen bonding scheme. In contrast to DNA, PNA can bind in either parallel or anti-parallel fashion, and hybridize with either single stranded DNA or double stranded DNA [11]. However, the anti-parallel binding is favoured over the parallel one. Structural informations on the PNA binding modes have been obtained by nuclear magnetic resonance

*Address correspondence to this author at the Service de Biologie de la Reproduction, Hôpital Arnaud de Villeneuve, CHRU Montpellier, 371 avenue du Doyen Gaston Giraud, F-34295 Montpellier Cedex 5, France; Tel: 00 33 4 67 33 59 52; Fax: 00 33 4 67 33 62 90; E-mail: f-pellestor@chu-montpellier.fr

and by X-ray crystallography [12]. Homopyrimidine PNAs, as well as PNAs containing a high proportion of pyrimidine residues, bind to complementary DNA sequences to form highly stable (PNA)₂-DNA triplex helices with high *T_m*. In these triplexes, one PNA strand hybridizes to DNA through standard Watson-Crick base pairing rules, while the other PNA strand binds to DNA through Hoogsteen hydrogen bonds (Fig. 1). The resulting structure is an unusual helix conformation, called D-loop [13].

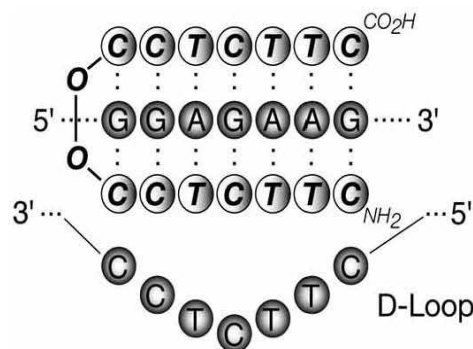


Fig. (1). Triplex (PNA)₂-DNA structure formed with cytosine-rich homopyrimidine PNAs binding to complementary homopurine DNA target. The PNA invades the DNA double stranded helix, thus displacing a DNA strand into a "D-loop". In this triplex structure, one PNA strand hybridizes to DNA through standard Watson-Crick base pairing rules, while the other PNA strand binds to DNA strand through Hoogsteen hydrogen bonds. Base pairing interactions are denoted by dots between the bases. The linkers used to connect the two halves of the PNA oligomer are abbreviated as "O".

Also, PNA-DNA hybridization is significantly more affected by base mismatches than DNA-DNA hybridization [14]. A single mismatch in a mixed PNA-DNA 15-mer duplex decreases the *T_m* by up to 15°C, whereas in the corresponding DNA-DNA complex, a single mismatch decreases the *T_m* by only 11°C [15]. This value depends on the nature and the position of the linker molecule between PNA and DNA bases. This high level of discrimination at single base level has indicated that short PNA probes could offer high sequence specificity and thus has allowed the further development of several efficient PNA-based strategies for molecular investigations and diagnosis of single nucleotide polymorphisms (SNPs).

USE OF PNAs IN MOLECULAR GENETIC ASSAYS

Use of PNAs for Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Detection

Naked PNAs have no direct interaction with DNA polymerase but can terminate the elongation of oligonucleotide primers by binding to the template or competing with the primers. Moreover, PNA-DNA chimeras can be recognized by the DNA polymerase and can thus be used as primers for PCR reactions [16]. PNA-DNA chimeras are covalently bonded hybrids where a PNA oligomer is fused to a DNA oligomer to give rise to a new architecture exhibiting biological properties typical of DNA, such as the ability to act as substrate for enzymes.

The high affinity binding of PNAs and the strong stability of hybrid duplex have also been used for detecting single base pair mutations by PCR. This strategy, named PNA directed PCR clamping, uses PNAs to inhibit the amplification of a specific target by direct competition of the PNA targeted against one of the PCR primer sites and the conventional PCR primer. This step is carried out at a temperature higher than that for conventional PCR primer

annealing. Consequently, the PNA-DNA complex formed at one of the primer sites effectively blocks the formation of the PCR product [17,18]. The procedure is so powerful that it can be used to detect single base-pair gene variants for mutation screening and gene isolation, as reported in neoplastic diseases and mitochondrial DNA mutation detection [19,20]. More recently, novel automated real-time PCR has been developed using PNAs. In this method, named quencher-labelled peptide nucleic acid-PCR (Q-PNA PCR), a generic quencher labelled PNA (Q-PNA) is hybridized to the 5'tag sequence of a fluorescent dye-labelled DNA primer in order to quench the fluorescence of the primer. During PCR, the Q-PNA is displaced by incorporation of the primer into duplex amplicons and the fluorescence of the dye label is liberated. The fluorescence of the labelled dye increases proportionately with the concentration of amplicons in the reactions mixture [21]. This Q-PNA procedure has also been combined with rolling-circle amplification assay for increased detection sensitivity [22]. PNA probes in which one base has been replaced by a thiazole orange dye molecule can also be used in real-time PCR analysis, because of the fluorescence emitted by matched probe-target duplexes. The usefulness of this probes, called FIT (forced intercalation) probes has been demonstrated for the detection of SNPs in the CFTR gene [23]. Over the last years, various diagnostic uses of PNA-directed PCR clamping method have been developed. Thus, Prix *et al.* [24] designed a diagnostic biochip array for the detection of K-ras proto-oncogene in stool, using PCR-clamped PNA probes. The method was also applied to the detection of Ki-ras mutations in pancreatic cancer [25] and the detection of mutations of the GNAS gene in peripheral blood cells in McCune-Albright syndrome [26].

The high-affinity binding of PNA oligomers might lead to faster and easier procedures in most standard hybridization techniques, such as Southern and Northern blotting. An alternative to Southern analysis is the PNA-pre-gel hybridization process, which significantly simplifies the procedure of Southern hybridisation. Labelled PNAs are then used as probes, allowing hybridization to a denatured dsDNA sample at low ionic strength prior to loading on the gel. This is different from conventional Southern blotting where hybridization occurs after gel electrophoresis and membrane transfer. Here, the mixture is directly subjected to electrophoresis for separation of bound and unbound PNA probes. Because of their neutral charge, excess unbound PNA probes don't migrate in an electrical field. The PNA-DNA hybrids are then blotted onto a nylon membrane and detected using standard chemiluminescent techniques. The method is sensitive enough to detect a single mismatch in a DNA sample [27]. Various procedures for automated detection of point mutations by electrophoresis using PNA-containing gels have been described [28,29]. This allows sequence-specific hybridization of a complementary DNA during electrophoretic passage. In this method, known as affinity electrophoresis, the slowdown of DNA during electrophoretic passage is related to its hybridization with a complementary PNA probe entrapped in the gel matrix. Instead using electrophoretic method for separation, the bound PNA can be separated by using capillary electrophoresis, which allows a fast separation process and the analysis of tiny amounts of sample. The method was applied for detecting single-base mutations in cystic fibrosis and allowed the discrimination among heterozygous, mutated homozygous, and normal homozygous subjects [30,31].

PNA-Based Microarrays and Biosensors

Likewise hybridization PNA-based biosensor procedures have been developed in which a single-stranded PNA probe is immobilized onto optical or mass-sensitive transducers to detect the complementary strand or corresponding mismatch in a DNA sample solution. The hybridization events are converted in electric signals by the transducers. Jensen *et al.* [8] reported the real-time analysis of the kinetics of PNA-DNA and PNA-RNA hybridizations using the BIAcore (biomolecular interaction analysis) technique. Several

others laboratories have successfully used the BIAcore principles to develop PNA-based biosensor assay. [32,33]. Also, MALDI-TOF mass spectrometry was successfully used with mass-labelled PNA probes for the detection of single nucleotide polymorphisms [34, 35].

Due to their extraordinary properties, PNAs provide a powerful tool to produce microarrays with high performance. Thus, a genetic screening based on the colorimetric variations of cyanine dye binding to DNA-PNA hybrid has been proposed as a general method for genetic analysis [36]. Several strategies have been designed for the production of PNA microarrays. PNAs can be directly synthesised on porous support media by the Spot method, but the quality of elongated PNA oligomers is variable and the number of spots per array is unsufficient for high definition analysis [37]. Alternatively to *in situ* synthesis, pre-fabricated and purified PNA molecules can be spotted onto an appropriate support medium but the procedure remains expensive. In 2003, Brandt *et al.* [38] presented a new strategy based on the automated synthesis of PNAs on filter-bottom microtitre plates. The resulting oligomers are transferred to microarray surface without any purification. Only the full-length synthesised molecules are attached to the microarray surfaces, by their terminal amino groups or terminal modifications introduced during synthesis. This new approach allowed to produce very robust and complex microarray. The combination of such PNA microarrays with time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS) which detect the phosphates integrated into the nucleic acids but completely missing in PNAs, provided a highly sensitive procedure for specific and sensitive detection of biomolecules without the introduction of a label [39].

More recently, Liu *et al.* [40] described a light-directed synthesis of PNA microarray based on the use of PNA monomers protected by photolabile protecting groups and a maskless technique, which could open the way for the fabrication of PNA microarrays with high densities.

Use of PNAs for Nucleic Acid Capture

The neutral backbone of PNAs significantly increases the rate of hybridization in assays where either the target or the probe is immobilized. Thus, PNAs can be used for sequence specific capture of single stranded nucleic acids taking advantage of the tight complex formation at low ionic strength which destabilizes nucleic acid secondary structure. Several studies have reported such applications of PNAs. Short PNA probes can then be used as generic capture probes for purification of nucleic acids [41]. A system for capture of double stranded DNA was also experimented using (PNA)₂-DNA openers creating a large single strand DNA loop to which a biotinylated oligonucleotide can hybridize. This complex allows the capture of the DNA *via* streptavidin beads [42]. Analogous to the padlock hybridization system, such a procedure may be used for detecting specific DNA sequence, for example on chromosomes, by enzymatic primer extension of the bound oligonucleotide [43,44].

USE OF PNAs IN MOLECULAR CYTOGENETICS ASSAYS

During the last few years, the bulk of the interest in PNAs has focused on their exploitation as probes for *in situ* hybridization assays. Thanks to its high binding specificity, a single 15-mer PNA probe can substitute to a set of longer DNA probe. Also, the neutral backbone of PNAs allows them to bind to DNA or RNA under low ionic strength conditions, which discourage reannealing of complementary genomic strands. This is particularly advantageous for *in situ* targeting of repeat sequences for which both the length and the repetitive nature can favour renaturation over hybridization with probes. Additional benefits of using PNAs are lower background signals and unlimited stability of the probe mixture [45]. PNAs are compatible with a wide range of reporter molecules and fluorochromes including fluoresceine, rhodamine as well as cyanine and Alex dyes available in a large variety of colours [46].

The PNA-FISH technique was first used for quantitative telomere analysis. The study of telomere behaviour has become a sensitive subject because of telomere involvement in the processes of cancer evolution and cellular senescence. The FISH technique has been successfully utilized for the *in situ* detection of telomeric repeat sequences in chromosomes of various species, using synthetic oligonucleotide probes, but the efficiency of these probes has not been sufficient to extend this procedure beyond qualitative analysis of repeat telomeric sequences. To monitor telomere length quantitatively, Lansdorp *et al.* [47] utilized fluoresceine-labelled PNA probes. By comparing fluoresceine-labelled DNA, RNA and PNA probes for the detection of telomeric repeat sequences on human metaphase chromosomes, they first showed that PNA probes yielded superior staining of telomeres. The PNA-FISH approach allowed the distinction of fluorescence of individual sister chromatid ends and the accurate estimate of individual and global telomere length in metaphase chromosomes of various cultured human hematopoietic cells. Subsequently, telomere PNA probes were used in several *in situ* studies of cancer, ageing, and cell growth [48-52]. The PNA-FISH technique was also used for measuring the extent of change of telomeric length before and after treatment with different mutagens, indicating that this fast method could be used as a first-hand "data tool" for the treatment of patients with anti-cancer agents [53]. The performance of PNA method for *in situ* detection and sizing of telomeric repetitive sequences was compared to the primed *in situ* (PRINS) labelling technique. The 2 techniques were used on mouse, hamster and human cell lines and the results were identical in terms of labelling efficiency and sensitivity [54]. Some recent advancement combines PNA-FISH procedure with flow cytometry for measuring telomere length in interphasic cells [55, 56].

Further developments of PNA technology were focused on the improvement of the specificity of PNA probes and the *in situ* detection of numerical chromosome abnormalities. Chen *et al.* [57] reported that PNA probes could discriminate between 2 centromeric DNA repeat sequences that differ by only a single base pair. Identical results were obtained with PRINS primers [58] and oligonucleotide probes [59], but never with standard DNA probes. The identification of chromosomal variation and the analysis of polymorphisms could greatly benefit from the discrimination power of PNAs. The procedure of PNA synthesis allows to consider the further production of allele-specific probes. This will constitute an evident improvement over the current labelling techniques.

Several chromosome-specific PNA probes were designed and tested. Chen *et al.* [60] defined short (15-18 mer) and specific PNA probes for alpha-satellite domains of 9 chromosomes (chromosomes 1, 2, 7, 9, 11, 17, 18, X and Y) and successfully used them on metaphases and interphase nuclei. To demonstrate the potential utility of PNA probes in clinical application, cultured and uncultured amniocytes preparations were also analysed, giving rates of hybridization efficiency of 90-97%. Taneja *et al.* [61] tested other PNA probes for chromosomes 1, X and Y, 18-22 mer of size and directly labelled with fluorochromes, on normal human lymphocytes and fibroblasts with abnormal chromosome contents. A fast and simple multicolour PNA protocol was utilized, demonstrating the easy use of PNA probes for *in situ* labelling assays.

Pellestor *et al.* [62] have experimented the PNA technology on human sperm. The adaptation of PNA technology to human spermatozoa constituted an interesting challenge because of the particularities of sperm nucleus in term of genomic compaction and accessibility of DNA sequences. To estimate and validate the efficiency of PNA labelling on human sperm, comparative estimates of disomy X, Y and 1 were performed on sperm preparations from healthy subjects using multicolour FISH, PRINS and PNA procedures in parallel. An equivalent quality of *in situ* nuclear labelling and similar disomy rates were obtained with the 3 methods. However, the hybridization timing of PNA probes (i.e. 45 minutes) was

considerably shortened in comparison with FISH reaction, which requires an overnight hybridization in order to be efficiently completed on sperm preparations [63]. The fast hybridization kinetics of PNAs on sperm was comparable to the kinetics of PRINS reaction (20-30 minutes). This similarity might be due to the small size of both PNA probes and PRINS primers. The 2 techniques can also be advantageously combined on a same cell preparation for *in situ* multiplex chromosomal detection [64]. These data pointed out the great potential of PNA probes for chromosomal screening on difficult biological material.

The PNA strategy has also been experimented on isolated human oocytes, polar bodies and blastomeres in order to assess the possibility of using PNA probes for preimplantation cytogenetic diagnosis [65]. Using directly labelled satellite PNA probes for chromosomes 1, 4, 9, 16, 18, X and Y, simple and sequential multi-colour PNA labelling procedures were tested on 34 *in vitro* unfertilized oocytes and 23 blastomeres. The combined use of PNA and FISH was also experimented on these materials. Both rates and types of chromosomal abnormalities scored were in good agreement with results of previous FISH studies. This first use of PNA probes on isolated cells confirms the efficiency of PNA technology for *in situ* chromosomal analysis and demonstrates the feasibility of using PNAs on unique cells. This procedure could become an efficient complement of FISH for PGD because of its simplicity, its fast kinetics and the high affinity of PNA probes. Finally, PNA probes were involved in sequential FISH procedures in order to eliminate the undesired background staining caused by repetitive DNA sequences. Unlabelled PNA probes directed towards the Alu repeat sequences were efficiently used as blocking mixture in FISH reactions with various DNA probes (HER2 gene, MLL gene) on either cytogenetic preparations or tissue sections. The PNA blocking mixture was also used to suppress the unspecific staining when detecting genetic translocations [66]. Another way of using PNA for *in situ* suppression is based on the sequential FISH assay using PNA probes and competitive displacement. In this approach, unlabelled PNA probes with the same composition as already bound and labelled PNA probes will compete for annealing at the same sequence of the target DNA. Excess unlabelled probes will destabilize the already bound probes, resulting in a reduction of the denaturation temperature necessary for dissociation of already bound probes before the next FISH step in a sequential FISH set-up. This method appears to be particularly interesting for sequential FISH procedure in connection with PGD where repeated FISH cycles on only one or two blastomere nuclei are necessary for the enumeration of several chromosomes [67,68].

FUTURE DEVELOPMENTS

The PNAs are already being implemented in research protocols and medical assays of increasing diagnostic value, adding both the sensitivity and the specificity of PNA probes to the standard procedures. New chemical modifications of the original PNA backbone might contribute to increase the efficiency of PNA molecules and to develop novel applications.

Interesting new contributions of PNAs could come from the development of applications that cannot be performed using DNA probes. Because of their remarkable sequence discrimination, PNA oligomers have great potential in the growing area of whole genome analysis. It is now evident that future genetic and chromosomal investigations will feature increasingly higher-order multiplexing, as indicated by the rapid development of DNA microarrays. The microarray technology appears to be a very powerful and realistic new diagnostic procedure that may be applied to isolated cells [69]. The remarkable hybridization properties of PNA suggest that the use of PNA oligomers may probably improve the timing of the whole procedure, especially when applied on single cells [70]. In association with different fluorochromes, short PNA sequences can constitute a new class of genomic biomarkers for microarray plat-

forms and contribute to the next challenge of extending microarray technology to preimplantation genetic diagnosis.

Another promising feature of PNAs might be linked to the development of *in vivo* fluorescence imaging. The capability to introduce fluorescent probes in living cells will allow deeper study of live gene expression and mRNA transfer [71]. This innovative approach will be more easily applied than non hybridization based GFP-fusion protein systems, and the new multi-photon microscopy will provide efficient tools to visualize multiple gene expression patterns in single living cells [72]. Due to their high *in vivo* stability and resistance to enzymes and the flexibility of their synthesis procedure, PNA oligomers conjugated to cell-permeable peptides or liposomes, have a great potential for the future of non-invasive medical imaging.

CONCLUSION

Since their invention, PNAs have quickly evolved from basic research to the application of PNA technology to diagnostic procedures. PNA-based applications benefit from the unique physico-chemical properties of PNA molecules, enabling development of simple and robust assays. The data presented here illustrates the large number of PNA applications in genetics and cytogenetic assays. Very powerful applications of PNAs have also emerged in microbiology, virology and parasitology [73-76]. New chemical modifications of the original PNA backbone might contribute to increase the efficiency of PNA molecules and lead to the development of novel applications and PNA-dependent projects in many areas of biology and therapy [77,78].

ACKNOWLEDGEMENTS

P. Paulasova was supported by a Czech fellowship VZ FNM 00064203. This work was partially supported by Ferring Pharmaceuticals and Organon France.

REFERENCES

References 79-81 are related articles recently published.

- [1] Micklefield J. Backbone modification of nucleic acids: synthesis, structure and therapeutic applications. *Curr Med Chem* 2001; 8: 1157-79.
- [2] Elayadi AN, Corey DR. Application of PNA and LNA oligomers to chemotherapy. *Curr Opin Investig Drugs* 2001; 2: 558-61.
- [3] Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 1991; 254: 1497-500.
- [4] Nielsen PE, Egholm M. An introduction to peptide nucleic acid. *Curr Issues Mol Biol* 1999; 1: 89-104.
- [5] Porcheddu A, Giacomelli G. Peptide nucleic acids (PNAs), a chemical overview. *Curr Med Chem* 2005; 12: 2561-99.
- [6] Gangamani B, Kumar VA, Ganesh KN. 2-Aminopurine peptide nucleic acids (2apPNA): intrinsic fluorescent PNA analogues for probing PNA-DNA interaction dynamics. *Chem Commun* 1997; 23: 1913-4.
- [7] Corey DR. Peptide nucleic acids: expanding the scope of nucleic acid recognition. *Tib Tech* 1997; 15: 224-9.
- [8] Jensen KK, Orum H, Nielsen PE, Norden B. Hybridization kinetics of peptide nucleic acids (PNA) with DNA and RNA studied with BIAcore technique. *Biochemistry* 1997; 36: 5072-7.
- [9] Demidov V, Frank-Kamenetskii MD, Egholm M, Buchardt O, Nielsen PE. Sequence selective double strand DNA cleavage by peptide nucleic acid (PNA) targeting using nuclease S1. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 2103-7.
- [10] Ray A, Norden B. Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *FASEB J* 2000; 14: 1041-60.
- [11] Pfeffer NJ, Hanvey JC, Bisi JE, Thomson SA, Hassman CF, Noble SA, *et al.* Strand-invasion of duplex DNA by peptide nucleic acid oligomers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10648-52.
- [12] Rasmussen H, Kastrop JS, Nielsen JN, Nielsen JM, Nielsen PE. Crystal structure of a peptide nucleic acid (PNA) duplex at 1.7 Å resolution. *Nat Struct Biol* 1997; 7: 98-101.

- [13] Nielsen PE. Peptide nucleic acid: a versatile tool in genetic diagnostics and molecular biology. *Curr Opin Biotechnol* 2001; 12: 16-20.
- [14] Ray A, Norden B. In: Pellestor F Ed, Peptide nucleic acid (PNA): a seminal tool for biotechnical applications. PRINS and PNA technologies in chromosomal investigations, NY, Nova Biomedical 2006; 97-142.
- [15] Giesen U, Kleider W, Berding C, Geiger A, Orum H, Nielsen PE. A formula for thermal stability (T_m) prediction of PNA/DNA duplexes. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 5004-6.
- [16] Misra HS, Pandey PK, Modak MJ, Vinayak R, Pandey VN. Polyamide nucleic acid-DNA chimera lacking the phosphate backbone are novel primers for polymerase reaction catalyzed by DNA polymerases. *Biochemistry* 1998; 37: 1917-25.
- [17] Orum H, Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, Stanley C. Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 5332-6.
- [18] Murdock DG, Wallace DC. PNA-mediated PCR clamping. Applications and methods. *Methods Mol Biol* 2002; 208: 145-64.
- [19] Behn M, Thiede C, Neubauer A, Pankow W, Schuermann M. Facilitated detection of oncogene mutations from exfoliated tissue material by a PNA-mediated "enrichedPCR" protocol. *J Pathol* 2000; 190: 69-75.
- [20] Murdock DG, Christacos NC, Wallace DC. The age-related accumulation of a mitochondrial DNA control region mutation in muscle, but not brain, detected by a sensitive PNA-directed PCR clamping based method. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 4350-5.
- [21] Fiandaca MJ, Hyldig-Nielsen JJ, Gildae BD, Coull JM. Self-reporting PNA/DNA primers for PCR analysis. *Genome Res* 2001; 11: 609-13.
- [22] Alsmadi OA, Bormarth CJ, Song W, Wisniewski M, Du J, Brockman JP, *et al.* High accuracy genotyping directly from genomic DNA using a rolling circle amplification based assay. *BMC Genomics* 2003; 30: 4-21.
- [23] Socher E, Jarikote DV, Knoll A, Röglin L, Burmeister J, Seitz O. FIT probes: peptide nucleic acid probes with a fluorescent base surrogate enable real-time DNA quantification and single nucleotide polymorphism discovery. *Anal Biochem* 2008; 375: 318-30.
- [24] Prix L, Uciechowski P, Bockmann B, Giesing M, Schuetz AJ. Diagnostic biopchip array for fast and sensitive detection of -ras mutations in stool. *Clin Chem* 2002; 48: 428-35.
- [25] Dabritz J, Hanfler J, Preston R, Stieder J, Oettle H. Detection of Ki-ras mutations in tissue and plasma samples of patients with pancreatic cancer using PNA-mediated PCR clamping and hybridization probes. *Br J Cancer* 2005; 92: 405-12.
- [26] Lietman SA, Ding C, Levine MA. A highly sensitive polymerase chain reaction method detects activating mutations of the GNAS gene in peripheral blood cells in McCune-Albright syndrome or isolated fibrous dysplasia. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87: 2489-94.
- [27] Perry-O'Keefe H, Yao XW, Coull JM, Fuchs M, Egholm M. Peptide nucleic acid pre-gel hybridization: an alternative to Southern hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14670-5.
- [28] Igloi GL. Automated detection of point mutations by electrophoresis in peptide-nucleic acid-containing gels. *Biotechniques* 1999; 27: 798-804.
- [29] Igloi GL. Detection of point mutations using PNA-containing electrophoresis matrices. *Methods Mol Biol* 2002; 208: 195-207.
- [30] Basile A, Giuliani A, Pirri G, Chiari M. Use of peptide nucleic acid probes for detecting DNA single-base mutations by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2002; 23: 926-9.
- [31] Tedeschi T, Chiari M, Galaverna G, Sforza S, Cretich M, Corradini R, *et al.* Detection of the R553X DNA single point mutation related to cystic fibrosis by a "chiral box" D-lysine-peptide nucleic acid probe by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2005; 26: 4310-6.
- [32] Masuko M. Hybridization of an immobilized PNA probe with its complementary oligodeoxyribonucleotide on the surface of silica glass. *Nucleic Acids Res* 2003; 3: 145-6.
- [33] Brandt O, Hoheisel JD. Peptide nucleic acids on microarrays and other biosensors. *Trends Biotechnol* 2004; 22: 617-22.
- [34] Ross PL, Lee K, Belgrader P. Discrimination of single-nucleotide polymorphisms in human DNA using peptide nucleic acid probes detected by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* 1997; 69: 4197-202.
- [35] Griffin TJ, Tang W, Smith LM. Genetic analysis by peptide nucleic acid affinity MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 1997; 15: 1368-72.
- [36] Wilhelmsson LM, Norden B, Mukherjee K, Dulay MT, Zare RN. Genetic screening using the colour change of a PNA-DNA hybrid-binding cyanine dye. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(2): E3.
- [37] Matysiak S, Reuthner F, Hoheisel JD. Automating parallel peptide-synthesis for the production of PNA-library arrays. *Biotechniques* 2001; 31: 896-904.
- [38] Brandt O, Feldner J, Stephan A, Schröder M, Schölzer M, Arlinghaus HF, *et al.* PNA microarrays for hybridisation of unlabelled DNA samples. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: E119.
- [39] Brandt O, Hoheisel JD. Peptide nucleic acids on microarrays and other biosensors. *Trends Biotechnol* 2004; 22: 617-22.
- [40] Liu ZC, Shin DS, Shokouhimehr M, Lee KN, Yoo BW, Kim YK, *et al.* Light-directed synthesis of peptide nucleic acids (PNAs) chips. *Biosens Bioelectron* 2007; 22: 2891-7.
- [41] Orum H, Nielsen PE, Jorgensen M, Larsson C, Stanley G, Koch T. Sequence-specific purification of nucleic acids by PNA-controlled hybrid selection. *Biotechniques* 1995; 19: 472-80.
- [42] Bukanov NO, Demidov VV, Nielsen PE, Frank-Kamenetskii MD. PD-loop: a complex of duplex DNA with an oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5516-20.
- [43] Nilsson M, Krejci K, Koch J, Kwiatkowski M, Gustavsson P, Landegren U. Padlock probes reveal single-nucleotide differences, parent of origin and *in situ* distribution of centromeric sequences in human chromosomes 13 and 21. *Nat Genet* 1997; 16: 252-5.
- [44] Larsson C, Koch J, Nygren A, Janssen G, Raap AK, Landegren U, *et al.* *In situ* genotyping individual DNA molecules by target-primed rolling-circle amplification of padlock probes. *Nat Methods* 2004; 1: 227-32.
- [45] Williams B, Stender H, Coull JM. In: Nielsen PE Ed, PNA fluorescent *in situ* hybridization for rapid microbiology and cytogenetic analysis. Peptide Nucleic Acids: Methods and Protocols. Totowa, NY, Humana Press Inc. 2002; 181-93.
- [46] Pellestor F, Paulasova P, Andréo B, Lefort G, Hamamah S. Multicolor PRINS and multicolor PNA. *Cytogenet Genome Res* 2006; 114: 263-9.
- [47] Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, *et al.* Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 685-91.
- [48] Zijlman MJM, Martens UM, Poon SSS, Raap AK, Tanke HJ, Ward RK, *et al.* Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 7423-8.
- [49] Boei JJWA, Vermeulen S, Natarajan AT. Analysis of radiation-induced chromosomal aberrations using telomeric and centromeric PNA probes. *Int J Rad Biol* 2000; 76: 163-7.
- [50] Mathioudakis G, Storb R, McSweeney PA, Torok-Storb B, Lansdorp PM, Brummendorf TH, *et al.* Polyclonal hematopoiesis with variable telomere shortening in human long-term allogeneic marrow graft recipients. *Blood* 2000; 96: 3991-4.
- [51] Shammass MA, Liu X, Gavory G, Raney KD, Balasubramanian S, Shmookler Reis RJ. Targeting the single-strand G-rich overhang of telomeres with PNA inhibits cell growth and induces apoptosis of human immortal cells. *Exp Cell Res* 2004; 295: 204-14.
- [52] Derradji H, Bekaert S, Van Oostveldt P, Baatout S. Comparison of different protocols for telomere length estimation by combination of quantitative fluorescence *in situ* hybridization (Q-FISH) and flow cytometry in human cancer cell lines. *Anticancer Res* 2005; 25: 1039-50.
- [53] Arutyunyan R, Rapp A, Greulich KO, Hovhannisyan G, Haroutiunian S, Gebhart E. Fragility of telomeres after bleomycin and cisplatin combined treatment measured in human leukocytes with the Comet-FISH technique. *Exp Oncol* 2005; 27: 38-42.
- [54] Serakinci N, Koch J. Detection and sizing of telomeric repeat DNA *in situ*. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 200-1.
- [55] Potter AJ, Wener MH. Flow cytometric analysis of fluorescence *in situ* hybridization with dye dilution and DNA staining (flow-FISH-DDD) to determine telomere length dynamics in proliferating cells. *Cytometry A* 2005; 68: 53-8.
- [56] Narath R, Lorch T, Greulich-Bode KM, Boukamp P, Ambros PF. Automatic telomere length measurements in interphase nuclei by IQ-FISH. *Cytometry A* 2005; 68: 113-20.

3.2 Studium chromosomové aneuploidie spermií u nosičů mutace v genu TP53

Lidský gen TP53 je tumor supresorový gen, lokalizovaný na krátkém raménku chromosomu 17 (17p13.1). Celková délka genu je asi 20 kb, skládá se z 11 exonů a 10 intronů.

Jeho produkt, tumor-supresorový protein p53 (transformation-related protein), má klíčovou roli jako transkripční faktor a má schopnost řídit odpověď buňky na poškození DNA. Při jejím poškození zastaví p53 buněčný cyklus v některém z kontrolních bodů a umožní její opravu, popřípadě navodí apoptózu, nebo senescenci. Při fyziologickém stavu je p53 inaktivní a v cytoplasmě je navázán na přenašeč MD2. Při poškození DNA dojde k navození signální kaskády, jejímž výsledkem je fosforylace přenašeče MD2 a uvolnění proteinu p53, čímž se aktivuje (Huang et al., 2012).

Protein p53 je rovněž spjat s apoptózou v zárodečných buňkách během spermatogeneze, což může významně ovlivnit lidskou fertilitu nebo způsobit infertilitu. Doposud byly popsány 3 polymorfizmy – dva v TP53 a jeden v MDM2, genech asociovaných s mužskou infertilitou a předpokládá se, že některé genetické varianty TP53 jsou rizikovým faktorem mužské infertility (Mashayeghi, 2012). Zatím není známo, jak polymorfismy v těchto genech mohou ovlivnit apoptózu v zárodečných buňkách a způsobit mužskou infertilitu (Huang et al., 2012).

Některé studie našly i souvislost mezi genetickou variantou TP53 u žen, ženskou infertilitou, nebo zvýšeným rizikem vícečetných těhotenství, neboť gen TP53 hraje roli v implantaci blastocyst a intrauterinního vývoje embrya (Tagliani-Ribeiro et al., 2012). Bylo prokázáno, že určité polymorfizmy TP53 ovlivňují expresi LIF (leukemia inhibitory factor), cytokinu, který má klíčovou roli pro implantaci blastocyst (Pasculin et al., 2012).

Mutace v genu TP53 jsou spojeny se vznikem více než 50% lidských maligních nádorů a hrají klíčovou roli v patogenezi Li-Fraumeni syndromu (dále LFS). Byla prokázána souvislost mezi mutacemi TP53 a zvýšeným výskytem chromosomových aberací v těchto nádorech. Předpokládalo se, že tyto genomické přestavby vznikají progresivně během vzniku nádoru. Poslední studie však ukazují, že existuje i alternativní mechanismus zahrnující masivní chromosomové přestavby v jednom „katastrofickém“ kroku mechanismem zvaným

chromothripsis. Studie u pacientů s LFS, nesoucích zárodečnou mutaci *TP53* odhalila komplexní chromosomové přestavby. Byla prokázána přímá souvislost mezi *TP53* mutací a chromothripsis v Sonic-Hedgehog meduloblastomu u LFS pacientů. Také studie jiných typů nádorů u LFS pacientů prokázaly přímou asociaci mezi *TP53* mutací a chromothripsis a potvrdily silný vliv p53 v katastrofických DNA přestavbách. Velmi silná vazba byla např. mezi mutací *TP53* a AML (akutní myeloidní leukémií) a dalších nádorů (Rausch et al., 2012) u LFS.

LFS je AD dědičné onemocnění, asociované s vysokou náchylností k nádorům (Li and Fraumeni, 1969). Podstatou onemocnění je zárodečná mutace genu *TP53* kódujícího tumor-supresorový protein p53 (Malkin, 1993). V případě mutantního genu *TP53* nedojde vlivem chybné kontroly buněčného cyklu k reakci na poškození DNA a k zástavě buněčného cyklu a senescenci nebo apoptóze (Vogelstein et al., 2000). Typickým znakem LFS jsou nádorová onemocnění blízkých příbuzných v nízkém věku. Nejčastější jsou sarkomy měkkých tkání a kostí, nádory prsu s časným nástupem, nádory centrálního nervového systému a leukémie. U dětí jsou to hlavně adrenokortikální nádory a nádory choroidálního plexu. Celoživotní riziko vzniku nádoru je u mužů 70%, u žen téměř 100% vlivem vysokého výskytu karcinomu prsu.

Vzhledem k nedávným nálezům účasti genu *TP53* ve spermatogenezi a výskytu dvou případů Turnerova syndromu u dětí s LFS jsme se v naší práci zaměřili na studium výskytu chromosomových aneuploidií ve spermiích nosičů mutace v genu *TP53*, s LFS.

Publikace 4

PAULASOVA P, DIBLIK J, TRKOVA M, MACEK M SR, SEDLACEK Z.

Increased sperm aneuploidy in two male carriers of germline TP53 mutations.

Cancer Genet 2011; 204: 278-81

IF: 1.915

Do naší studie jsme zařadili dva nepostižené nosiče mutace *TP53* ze dvou nepříbuzných rodin postižených LFS, kteří zatím nepodstoupili chemo- ani radioterapii. Pacient A, 41 let, byl nosič mutace Gly245Ser, pacient B, 33 let, nosič p.Arg342-STOP mutace. K nim byli do studie zařazeni čtyři nepříbuzní zdraví jedinci jako kontroly.

Pomocí metody FISH jsme vyšetřili aneuploidie chromosomů ve spermiích těchto pacientů a u zdravých kontrol. Byly použity centromerické sondy pro chromosomy 15, 16, 17, 18, X a Y a lokus-specifické sondy pro chromosomy 13 a 21. Pro každý chromosom bylo vyšetřeno 10.000 spermií. U nosičů mutace v genu *TP53* jsme našli signifikantně zvýšenou frekvenci numerických abnormalit, především disomie pohlavních chromosomů a odhalili riziko chromosomově abnormálního potomstva u těchto pacientů.

Tato studie byla první studií tohoto typu u pacientů s LFS. Prokázali jsme, že zvýšená frekvence chromosomových aneuploidií spermií těchto pacientů může mít potenciální souvislost s mutací v genu *TP53* a jeho role ve spermatogenezi a nález aneuploidie v nádorech. Tento nález může také korelovat s nálezem dvou případů Turnerova syndromu v LFS rodinách popsaných v literatuře, což je vzhledem ke vzácnosti tohoto syndromu výzkumně a diagnosticky signifikantní nález (Pivnick et al., 1998, Krutílková et al., 2005).

Z těchto nálezů vyplývá, že ztráta funkce genu *TP53* nebo *TP53* haploinsuficience může mít za následek zvýšený výskyt aneuploidie v gametách nosičů této mutace vlivem nesprávné chromosomové segregace, nebo chybné apoptózy během gametogeneze.

BRIEF COMMUNICATION

Increased sperm aneuploidy in two male carriers of germline *TP53* mutations

Petra Paulasova, Jan Diblík, Marie Trkova, Milan Macek Sr., Zdenek Sedlacek*

Department of Biology and Medical Genetics, Charles University 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

Li-Fraumeni syndrome is a rare autosomal dominant cancer predisposition syndrome characterized by a broad spectrum of tumors. The disorder is caused by germline mutations in the *TP53* gene. We studied chromosomes in the sperm of two male carriers of *TP53* mutations. We observed increased sperm aneuploidy, mainly concerning the gonosomes when compared to four normal male controls. This observation may correlate with the involvement of the p53 protein in spermatogenesis, with its role in aneuploidy in cancer, and with the occurrence of two cases of Turner syndrome in families with germline *TP53* mutations reported in the literature.

Keywords Li-Fraumeni syndrome, *TP53* gene, fluorescence in situ hybridization
© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

The analysis of aneuploidy in sperm can reveal information about disturbances of chromosome segregation or decreased elimination of cells with chromosome aberrations during male meiosis. The identification of increased rates of gamete aneuploidy in a group of patients may then have important consequences for genetic risks and counseling for these individuals.

We decided to study sperm aneuploidy in males with germline mutations in the *TP53* gene encoding the p53 protein. These mutations cause Li-Fraumeni syndrome (LFS), a rare autosomal dominant disorder characterized by predisposition to a broad spectrum of tumors (mainly sarcomas, breast and brain tumors) and childhood cancers (1–3). This study was prompted by several observations: Firstly, the p53 protein plays a role in spermatogenesis, especially in the production of spermatogonia, and the removal of damaged sperm precursors by apoptosis (4,5). p53-deficient mice exhibit giant-cell degenerative syndrome with tetraploid primary spermatocytes (where p53 expression in normal spermatogenesis is high) that are unable to undergo meiosis (6). The meiotic checkpoint of chromosome synapsis has been proposed to be p53-independent (7), but other observations suggest a role of p53 in the DNA damage checkpoint in the meiotic prophase (8,9). The binding of p53 with homologous recombination factor DMC1 supports the

involvement of p53 in chromosome synapsis or recombinational repair and in the maintenance of overall genomic integrity during meiosis (10). Meiotic recombination has recently been associated with a burst of p53 activation (11). A loss of p53 also leads to the absence of sex body in spermatocytes, presumably due to precocious XY dissociation (12). Second, the progeny of p53-deficient mice have an increased rate of developmental anomalies after irradiation compared to normal mice. This is likely due to increased genetic damage in the gametes of the parental animals (13). There is also a deficiency of female progeny in these mice, indicating a loss of X chromosome-bearing gametes or loss after fertilization (13). Third, the deficiency of p53 is often associated with aneuploidy in cancer, and multiple lines of evidence point to a causal relationship between impaired p53 function and aneuploidy (14). Fourth, among 360 LFS families described in the literature (15), there are two cases of Turner syndrome (TS) (16,17). Given the rarity of both disorders, this co-occurrence is remarkable. From these observations, it may be postulated that the gain-of-function effects of *TP53* mutations or *TP53* haploinsufficiency may increase aneuploidy in the gametes of mutation carriers due to an elevated rate of incorrect chromosome segregation or impaired apoptosis during gametogenesis.

Materials and methods

Two unaffected male germline *TP53* mutation carriers (A and B) from two unrelated LFS families were studied. Male A was individual III.1 from Family 2 (17). This unmarried

Received November 30, 2010; received in revised form March 8, 2011; accepted March 15, 2011.

* Corresponding author.

E-mail address: zdenek.sedlacek@lfmotol.cuni.cz

2210-7762/\$ - see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.cancergen.2011.03.003

and childless 41-year-old man had two brothers with cancer (choroid plexus carcinoma at 2 years of age, liposarcoma at 26 years of age, respectively), an affected father (colon cancer at 34 years of age), and both paternal grandparents (brain tumor at 35 years of age, unspecified cancer at 50 years of age, respectively). He carried the Gly245Ser mutation. Male B was a 33-year-old father of an affected son (adrenocortical tumor at 1.5 years of age, medulloblastoma at 5 years of age). His mother, maternal grandmother, and maternal aunt also were affected (breast cancer at 30 years of age, breast cancer at 28 years of age, and ovarian cancer at 40 years of age, respectively). He carried the Arg342-STOP mutation. Since both males A and B were unaffected, the results of sperm analysis were not influenced by previous anticancer therapy. Males A and B were compared to four healthy male controls of similar age (C, D, E, and F of 41, 33, 34, and 43 years of age, respectively). The institutional ethical committee approved this study, and the participation of all individuals was based on their informed consent.

Sperm concentration was assessed using a Makler chamber after liquefaction. The sperm were fixed and decondensed as described (18) with post-fixation using 3.7% paraformaldehyde. Fluorescence in situ hybridization (FISH) (19) was performed using centromeric probes for chromosomes 15, 16, 17, 18, X, and Y, and locus-specific probes were used for chromosomes 13 and 21 (Vysis, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) in three mixes (13+21, 15+16+17, and 18+X+Y). Ten thousand spermatozoa were scored for each mix. Nuclei were scored as disomic when they showed two signals of one color similar in size and intensity, separated by at least one signal size diameter (20). Nuclei with two signals for each chromosome tested were scored as diploid, as the 15+16+17 mix showed no double disomies, indicating a low frequency of complex aneuploidies. Nuclei with missing signals were scored as nullisomic, although some of these nullisomies can represent artifacts (20). The total diploidy rate was calculated as the number of sperm with diploidy divided by the total number of sperm analyzed on all three slides. Due to the small number of observations, the results were analyzed using a one-sided two-sample *t*-test (Student's *t*-test). The significance threshold of individual findings was adjusted using the Bonferroni correction for multiple testing.

Results

Sperm concentrations of $150 \times 10^6/\text{mL}$ in male A and $90 \times 10^6/\text{mL}$ in male B were within normal range and similar to those of the four normal controls ($26\text{--}144 \times 10^6/\text{mL}$). The mutation carriers exhibited higher rates of numerical chromosome abnormalities, mainly affecting the gonosomes (Figure 1, Table 1), when compared to the controls. The total rate of all numerical aberrations, diploidy, and gonosome disomy were significantly higher in the carriers [0.75 vs. 0.34% ($P = 0.0143$), 0.26 vs. 0.09% ($P = 0.0255$), and 0.66 vs. 0.30% ($P = 0.0208$), respectively]. In the case of individual chromosomes, disomy XX and diploidy with two Y chromosomes were significantly increased, and several other differences reached borderline significance (Table 1).

Discussion

Our analysis showed increased sperm aneuploidy in males with germline *TP53* mutations which may increase their risk of chromosomally aberrant offspring. No increased rate of miscarriages, stillbirths or newborn deaths has been observed in LFS families (21). However, especially in families with cancer onset after the reproductive age, these non-cancer phenotypes are unlikely to be the focus of counseling for hereditary cancer predisposition. Thus they may remain under-reported. The aneuploidy observed in our mutation carriers concerned mainly the gonosomes. Sex chromosomes have been reported to have the highest baseline rate of numerical aberrations in sperm (22), and they can be expected to be affected most severely by any impairment in the maintenance of euploidy. Therefore, *TP53* mutations could represent a causal link in the cases of co-morbidity of LFS and TS described in the literature (16,17). The outcomes in these families cannot be blamed on disturbances in female meiosis due to p53 deficiency. In one patient the *TP53* mutation was paternally inherited (16), and the second patient could represent either a paternal transmission (the father refused testing) or a new mutation (17). The *TP53* protein is also expressed during early embryonic development (23) which is associated with high chromosome instability in men (24). The *TP53* deficiency may also be influential at this stage in causing the chromosomal

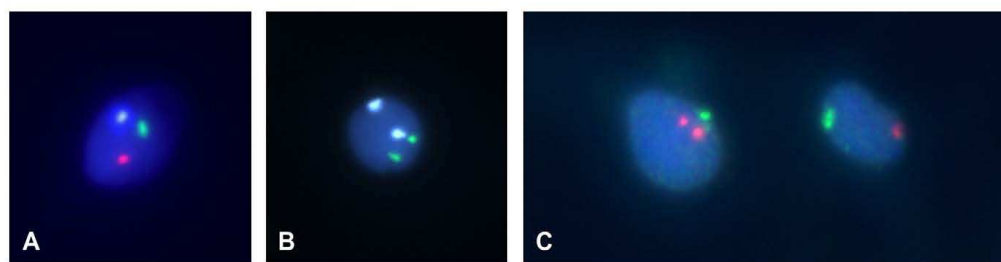


Figure 1 Representative images of FISH with different probe mixes on sperm. (A), a sperm with disomy XY (1 signal of chromosome 18 (aqua), 1 signal of chromosome X (green), and 1 signal of chromosome Y (red)); (B), a sperm with diploidy XX (2 signals of chromosome 18 (aqua), and 2 signals of chromosome X (green)); (C), a sperm with disomy 21 (1 signal of chromosome 13 (green), and 2 signals of chromosome 21 (red)), and a normal sperm (1 signal for each chromosome).

Table 1 Frequencies of sperm disomy and diploidy obtained by FISH analysis of *TP53* mutation carriers and controls

FISH probe (chromosome) mix	FISH finding (signals detected)	Interpretation	TP53 mutation carriers			Controls					P
			A	B	Mean	C	D	E	F	Mean	
13+21	13, 13, 21	Disomy 13	0.28%	0.09%	0.19%	0.12%	0.12%	0.10%	0.17%	0.13%	0.2037
	21	Nullisomy 13	0.11%	0.07%	0.09%	0.04%	0.10%	0.12%	0.04%	0.07%	0.3188
	13, 21, 21	Disomy 21	0.24%	0.04%	0.14%	0.12%	0.23%	0.05%	0.16%	0.14%	0.4982
	13	Nullisomy 21	0.04%	0.03%	0.04%	0.04%	0.10%	0.12%	0.04%	0.07%	0.1381
15+16+17	13, 13, 21, 21	Diploidy	0.37%	0.10%	0.24%	0.06%	0.14%	0.06%	0.05%	0.08%	0.0749
	15, 15, 16, 17	Disomy 15	0.07%	0.19%	0.13%	0.01%	0.08%	0.02%	0.05%	0.04%	0.0566
	16, 17	Nullisomy 15	0.05%	0.10%	0.07%	0.06%	0.04%	0.08%	0.02%	0.05%	0.2105
	15, 16, 16, 17	Disomy 16	0.01%	0.13%	0.07%	0.00%	0.06%	0.03%	0.07%	0.04%	0.2611
	15, 17	Nullisomy 16	0.06%	0.11%	0.08%	0.03%	0.08%	0.02%	0.02%	0.04%	0.0810
	15, 16, 17, 17	Disomy 17	0.03%	0.17%	0.10%	0.12%	0.07%	0.00%	0.03%	0.06%	0.2275
	15, 16	Nullisomy 17	0.05%	0.08%	0.06%	0.05%	0.06%	0.00%	0.02%	0.03%	0.1300
18+X+Y	15, 15, 16, 16, 17, 17 ^a	Diploidy	0.02%	0.12%	0.07%	0.04%	0.14%	0.00%	0.01%	0.05%	0.3468
	18, 18, X or 18, 18, Y	Disomy 18	0.21%	0.10%	0.16%	0.06%	0.09%	0.02%	0.04%	0.05%	0.0326 ^c
	X or Y	Nullisomy 18	0.02%	0.16%	0.09%	0.06%	0.06%	0.01%	0.09%	0.06%	0.2587
	18, X, X	Disomy XX	0.17%	0.17%	0.17%	0.04%	0.04%	0.02%	0.07%	0.04%	0.0006 ^b
	18, Y, Y	Disomy YY	0.25%	0.15%	0.20%	0.07%	0.05%	0.05%	0.17%	0.09%	0.0473 ^c
	18, X, Y	Disomy XY	0.33%	0.25%	0.29%	0.39%	0.14%	0.10%	0.07%	0.18%	0.1790
	18	Nullisomy XY	0.16%	0.16%	0.16%	0.30%	0.02%	0.06%	0.18%	0.14%	0.4180
	18, 18, X, X	Diploidy XX	0.18%	0.04%	0.11%	0.03%	0.03%	0.00%	0.01%	0.02%	0.0530
	18, 18, Y, Y	Diploidy YY	0.13%	0.16%	0.15%	0.00%	0.06%	0.01%	0.00%	0.02%	0.0026 ^b
	18, 18, X, Y	Diploidy XY	0.25%	0.14%	0.20%	0.08%	0.15%	0.07%	0.09%	0.10%	0.0437 ^c

^a double disomies (15, 15, 16, 16, 17 or 15, 15, 16, 17, 17 or 15, 16, 16, 17, 17) were not detected.^b statistically significant difference (the significance threshold was lowered using the Bonferroni correction to $P=0.0035$).^c borderline significance (P between 0.0035 and 0.05).

mosaicism frequently found in TS. Interestingly, fathers of TS patients have also been shown to have higher levels of gonosome aneuploidy in sperm (25).

Due to the rarity of LFS in general and the rarity of unaffected adult male *TP53* mutation carriers in particular, we were only able to analyze 2 patients. This study was also influenced by the high inter-individual and inter-chromosomal variability which is inherent in sperm aneuploidy rates (22,26,27). Our observations thus await confirmation with additional patients. To the best of our knowledge, this is the first suggestion of a possible link between *TP53* mutations and sperm aneuploidy in men. As such, it should stimulate further analysis of the interplay among mechanisms affecting cancer, fertility and chromosome constitution of the offspring.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Roman Krejci for assistance with the statistical analysis. This work was supported by grants MZOFNM2005 and IGA NR 9448-3/2007 from the Ministry of Health, and MSM0021620813 from the Ministry of Education of the Czech Republic.

References

- Li FP, Fraumeni JF Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 1969;71: 747–752.
- Li FP, Fraumeni JF Jr., Mulvihill JJ, et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 1988;48: 5358–5362.
- Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990;250:1233–1238.
- Beumer TL, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, et al. The role of the tumor suppressor p53 in spermatogenesis. *Cell Death Differ* 1998;5:669–677.
- Marty MS, Singh NP, Stebbins KE, et al. Initial insights regarding the role of p53 in maintaining sperm DNA integrity following treatment of mice with ethylnitrosourea or cyclophosphamide. *Toxicol Pathol* 2010;38:244–257.
- Rotter V, Schwartz D, Almon E, et al. Mice with reduced levels of p53 protein exhibit the testicular giant-cell degenerative syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:9075–9079.
- Odorisio T, Rodríguez TA, Evans EP, et al. The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis. *Nat Genet* 1998;18:257–261.
- Schwartz D, Goldfinger N, Kam Z, et al. p53 controls low DNA damage-dependent premeiotic checkpoint and facilitates DNA repair during spermatogenesis. *Cell Growth Differ* 1999;10: 665–675.
- Yin Y, Stahl BC, DeWolf WC, et al. p53-mediated germ cell quality control in spermatogenesis. *Dev Biol* 1998;204:165–171.
- Habu T, Wakabayashi N, Yoshida K, et al. p53 Protein interacts specifically with the meiosis-specific mammalian RecA-like protein DMC1 in meiosis. *Carcinogenesis* 2004;25:889–893.
- Lu WJ, Chapo J, Roig I, et al. Meiotic recombination provokes functional activation of the p53 regulatory network. *Science* 2010;328:1278–1281.
- Paul C, Povey JE, Lawrence NJ, et al. Deletion of genes implicated in protecting the integrity of male germ cells has differential effects on the incidence of DNA breaks and germ cell loss. *PLoS ONE* 2007;2:e989.
- Armstrong JF, Kaufman MH, Harrison DJ, et al. High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice. *Curr Biol* 1995;5:931–936.
- Duensing A, Duensing S. Guilt by association? p53 and the development of aneuploidy in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331:694–700.
- Sedlacek Z, Kodet R, Poustka A, et al. A database of germline p53 mutations in cancer-prone families. *Nucl Acids Res* 1998; 26:214–215.
- Pivnick EK, Furman WL, Velagaleti GV, et al. Simultaneous adrenocortical carcinoma and ganglioneuroblastoma in a child with Turner syndrome and germline p53 mutation. *J Med Genet* 1998;35:328–332.
- Krutikova V, Trkova M, Fleitz J, et al. Identification of five new families strengthens the link between childhood choroid plexus carcinoma and germline TP53 mutations. *Eur J Cancer* 2005;41: 1597–1603.
- Martini E, Speel EJ, Geraedts JP, et al. Application of different in-situ hybridization detection methods for human sperm analysis. *Hum Reprod* 1995;10:855–861.
- Liehr T, Pellestor F. Molecular cytogenetics: the standard FISH and PRINS procedure. In: Liehr T, editor. *Fluorescence in situ hybridisation (FISH) - application guide*. Berlin: Springer; 2009. pp. 23–34.
- Egozcue J, Blanco J, Vidal F. Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update* 1997;3:441–452.
- Hartley AL, Birch JM, Blair V, et al. Foetal loss and infant deaths in families of children with soft-tissue sarcoma. *Int J Cancer* 1994;56:646–649.
- Templado C, Bosch M, Benet J. Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:199–205.
- Chandrasekhar V, Chami O, Stojanov T, et al. Variable expressivity of the tumour suppressor protein TRP53 in cryopreserved human blastocysts. *Reprod Biol Endocrinol* 2007;5:39.
- Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 2009; 15:577–583.
- Martinez-Pasarell O, Nogues C, Bosch M, et al. Analysis of sex chromosome aneuploidy in sperm from fathers of Turner syndrome patients. *Hum Genet* 1999;104:345–349.
- Rubes J, Vozdova M, Oracova E, et al. Individual variation in the frequency of sperm aneuploidy in humans. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:229–236.
- Tempest HG, Ko E, Rademaker A, et al. Intra-individual and inter-individual variations in sperm aneuploidy frequencies in normal men. *Fertil Steril* 2009;91:185–192.

3.3 Studium varianty rs6836703: G>A v ART3 a její vliv na spermatogenezi u české populace mužů s oligozoospermii a azoospermii

Jak již bylo zmíněno v úvodu této práce, neplodnost postihuje v současné době 10 - 15% párů, přičemž asi u přibližně 50% případů mužské neplodnosti nebyla původní příčina doposud identifikována. Bylo publikováno velké množství prací analyzujících genetické příčiny mužské neplodnosti. Publikace zabývající se japonskou populací prokázala, že varianta rs6836703:G>A v genu pro ADP-ribosyltransferázu (ART3) je signifikantně asociována s neobstrukční azoospermii (NOA). Cílem této práce bylo stanovit frekvenci varianty rs6836703:G>A v genu pro ADP-ribosyltransferázu a její vliv na spermatogenezi u české populace mužů s oligozoospermii a azoospermii pomocí metody HRM.

Publikace 5

NORAMBUENA P, DIBLIK J, KRENKOVA P, PAULASOVA P, MACEK M, MACEK M Sr.

ADP-ribosyltransferase 3 (ART3) variant is associated with reduced sperm counts in Czech males: case/control association study replicating results from the Japanese population.

Neuro Endocrinol Lett 2012; 33: 48-52.

IF 1.05, citováno 0x

Do studie bylo zařazeno 257 mužů prokázanou fertilitou a 98 sub-/infertilních pacientů s oligozoospermii (koncentrace spermií pod 15mil/ml) a azoospermii (nepřítomnost spermií v ejakulátu) s prokázanou idiopatickou infertility vyšetřených na našem pracovišti. Pacienti byli vybráni dle přísně stanovených kritérií. Provedli jsme klinickou charakterizaci pacientů dle osobní anamnézy, výsledků laboratorního andrologického a genetického vyšetření. Vyloučili jsme pacienty s obstrukční azoospermii, s chromosomovými aberacemi a dalšími možnými příčinami poruch fertility jako varikokélou, prodělanými infekcemi, kontaktem s chemikáliemi, apod.

Byly nalezeny významné rozdíly v distribuci této varianty rs6836703: G> A mezi fertilními muži a sub-/infertilními muži, jelikož frekvence alely A byla výrazně zvýšena u infertilních mužů (pacientů s oligozoospermii). Tato studie byla první úspěšnou replikací patogenetického potenciálu varianty rs6836703: G> A u poruch spermatogeneze. Zjistili jsme, že tato varianta je asociována s oligozoospermii u českých mužů. Je však potřeba tento nález objektivizovat v dalších populacích a určit klinickou významnost tohoto vyšetření před jejím zavedením do diagnostické praxe.

ADP-ribosyltransferase 3 (*ART3*) variant is associated with reduced sperm counts in Czech males: case/control association study replicating results from a Japanese population

Patricia Alejandra NORAMBUENA, Jan DIBLÍK, Petra KŘENKOVÁ,
Petra PAULASOVÁ, Milan MACEK Sr., Milan MACEK Jr.

Department of Biology and Medical Genetics – Center for Reproductive Medicine & Genetics, Charles University 2nd Medical Faculty and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

Correspondence to: Prof. Milan Macek Jr. MD., PhD.
Department of Biology and Medical Genetics, Charles University
2nd Medical Faculty and University Hospital Motol
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5, Czech Republic.
TEL: +420 2 2443 3501; FAX: +420 2 2443 3520;
E-MAIL: milan.macek.jr@lfmotol.cuni.cz

Submitted: 2011-10-21 Accepted: 2011-11-15 Published online: 2012-00-00

Key words: ADP-ribosyltransferase 3; High Resolution Melting; male infertility; male subfertility; small amplicons

Neuroendocrinol Lett 2012;33(1):101–105 PMID: ----- NEL330112AXX ©2012 Neuroendocrinology Letters • www.nel.edu

Abstract

OBJECTIVES: In about 50% of male infertility the underlying pathogenesis remains unknown. A recent Japanese study provided evidence that the rs6836703: G>A single-nucleotide polymorphism (SNP) from the ADP-ribosyltransferase 3 (*ART3*) gene is significantly associated with non-obstructive azoospermia. However, the functional significance of this association is unknown and replication studies in unrelated populations are thus necessary.

DESIGN: In this study, 257 fertile Czech controls of proven paternity and 98 sub-/infertile patients selected according to stringent exclusion / inclusion criteria were genotyped by High Resolution Melting (HRM) of small amplicons.

Setting: This study was performed at University Hospital Motol – Laboratory of reproductive genetics using routinely analyzed cases.

RESULTS: Significant differences in allele distribution between fertile and sub-/infertile men were found (OR=1.78, 95% CI: 1.17–2.70; $p=0.007$). Following sub-stratification of cases according to their sperm counts we found that observed differences in allele distributions were increased in oligozoospermic men with sperm counts of <15 million sperm/mL (OR=1.98, 95% CI: 1.28–3.07; $p=0.002$). This difference was also reflected in genotype distributions between fertile and sub-/infertile men ($p=0.008$), and fertile versus oligozoospermic men ($p=0.004$).

CONCLUSIONS: Our study serves as a first replication of the original Japanese report and opens new avenues of research. Compared to the Japanese patient cohort, where cases with AZF microdeletions were included, we provided evidence that the analyzed *ART3* variant is associated with quantitative impairment of spermatogenesis.

To cite this article: Neuroendocrinol Lett 2012;33(1):101–105

Abbreviations:

ART3	- ADP-ribosyltransferase 3
ART	- Assisted Reproduction Treatment
ARTs	- mono-ADP-ribosyltransferases
AZF	- Azoospermia Factor
bp	- base pair
χ^2	- chi-square
DNA	- Deoxyribonucleic Acid
HapMap-CEU	- Haplotype Map of Utah residents with ancestry from northern and western Europe
HRM	- High Resolution Melting
HWE	- Hardy-Weinberg Equilibrium
NOA	- Non-Obstructive Azoospermia
OR	- Odds-Ratio
PCR	- Polymerase Chain Reaction
SNP	- Single-Nucleotide Polymorphism
WHO	- World Health Organization

INTRODUCTION

Infertility affects approximately 10–15% of couples in Western countries and in about 50% of male infertility cases the underlying pathogenesis has not been identified (Krausz & Giachini 2007; Ferlin *et al.* 2006). Considering the complexity of spermatogenesis and the increasing number of genes associated with this process, it is likely that molecular alterations in such genes are responsible, at least in part, for the “idiopathic” cases of male infertility (Aston & Carrell 2009). Thus far, there have been multiple attempts to identify associated genetic risk factors (Krausz & Giachini 2007; Ferlin *et al.* 2006; Aston & Carrell 2009).

Recently, a Japanese report provided evidence that the rs6836703: G>A single-nucleotide polymorphism (SNP) of the ADP-ribosyltransferase 3 (*ART3*) gene located into the intron 10 (NCBI database, reference sequence NT016354.18, accessed by 05-25-2010), is significantly associated with non-obstructive azoospermia (NOA; $p=0.027$) (Okada *et al.* 2008). The *ART3* is a single-copy gene located on chromosome 4p15.1-p14, contains 11 exons and spans 33.13 kb of DNA (Glowacki *et al.* 2002; Friedrich *et al.* 2006b). The *ART3* protein is a member of the mono-ADP-ribosyltransferases (ARTs) family (EC 2.4.2.31); they catalyze the reversible post-translational protein modification mono-ADP-ribosylation that can be used as a mechanism to regulate endogenous protein functions (Koch-Nolte 1997; Glowacki *et al.* 2002; Friedrich *et al.* 2006a). Currently, the best characterized ARTs are bacterial toxins, e.g. related to cholera or pertussis, which interfere with signal transduction by attachment of ADP-ribose onto regulatory G-proteins (Koch-Nolte 1997; Glowacki *et al.* 2002; Friedrich *et al.* 2006a). However, the biological function of *ART3* remains unclear since this protein lacks the active site motif (R-S-EXE) that is essential for the catalytic activity of arginine-specific transferases (Friedrich *et al.* 2006a; Friedrich *et al.* 2006b). In humans, the *ART3* protein is expressed predominantly in spermatocytes, suggesting that it could

play an important role in spermatogenesis (Friedrich *et al.* 2006a; Friedrich *et al.* 2006b; Okada *et al.* 2008).

The aim of this study is to replicate the Japanese observation in a representative cohort of Czech sub-/infertile males versus fertile controls in order to substantiate the association of the *ART3* rs6836703: G>A variant with impaired spermatogenesis and open new areas of research which may elucidate the role of *ART3* in spermatogenesis.

MATERIALS AND METHODS

A total of 257 males with proven paternity (i.e. fathered at least one child by natural conception) from a random cohort examined between 2003–2011 at our Department were genotyped for the rs6836703: G>A *ART3* variant. Their results were compared with corresponding data from 98 sub-/infertile men who underwent assisted reproduction treatment (ART) at our Center. Their clinical selection was in accordance with previously published exclusion criteria (Hucklenbroich *et al.* 2005; Wu *et al.* 2007; Yang *et al.* 2008). Patients with foreign origin and known causes of infertility were excluded (e.g. with varicocele, AZF microdeletions, orchitis, cryptorchidism, chromosomal aneuploidies associated with infertility such as aberrations of gonosomes – data not shown, obstructive azoospermia) (Hucklenbroich *et al.* 2005; Wu *et al.* 2007; Yang *et al.* 2008). The sub-/infertile group was further stratified into two groups according to the WHO classification (WHO 2010): a) azoospermic ($n=18$) and b) oligozoospermic ($n=80$, sperm counts <15 million sperm/mL). All cases and controls involved signed the informed consent that was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Motol.

For genotyping we used the previously validated method High Resolution Melting (HRM) of small amplicons (Norambuena *et al.* 2009). Genomic DNA was extracted from leukocytes of peripheral blood using PUREGENE Genomic DNA Purification Kit (Gentra Systems, MN, USA) according to manufacturer's recommendations and stored at -20°C . Before storage, all DNA samples were diluted to a concentration of 10 ng/ μL using the PUREGENE™ DNA Hydration Solution from Gentra Systems as dilution buffer, dilutions were kept at $+4^{\circ}\text{C}$. Primers were designed to amplify a 49bp fragment around the SNP site and to avoid other sequence variations within the primer region (F: 5'-GTTGCTCTGGGTGGTGTGAGC/R: 5'-ACAGTAGTGTCCCAGGCCTTCAC). PCR reaction was performed in a 10 μL reaction volume which consisted in 2 μL of genomic DNA (10 ng/ μL) added to 8 μL of “reaction master mix” consisting of 1X LightCycler® 480 High Resolution Melting Master with 2.5 mM MgCl_2 (Roche Diagnostics, Germany) and 0.5 μM of forward and reverse primers. Rapid two-step PCR cycling, with an initial denaturation of 5 min at 95°C continued by 35 cycles of 5 s at 95°C and 25 s at 69°C for annealing

and extension. Then, the program allowed one step for heteroduplex formation by heating to 95 °C for 10 s and cooling down to 40 °C for 5 s. For HRM, the plate was pre-heated at 72 °C for 10 s and afterward, heated from 72 °C to 95 °C performing 25 acquisitions per °C. The PCR reaction was performed on a 96-well plate in the LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Germany).

For melting curve analysis all samples with late amplification, monitored by real time PCR and/or with a fluorescence <60% of the maximum value, were excluded (Norambuena *et al.* 2009). Following amplification and HRM respective normalized and normalized temperature-shifted difference plots for the rs6836703: G>A variant were analyzed. We were able to perform software-based genotype calls and visually differentiate the three expected melting profiles for each genotype group: G/G, G/A and A/A (Figure 1). HRM of small amplicons was our method of choice for the examination of the rs6836703: G>A SNP since it is a rapid, accurate and cost effective method (Norambuena *et al.* 2009).

Fertile controls are in conformity with Hardy-Weinberg equilibrium (HWE; non-significant results from Pearson's chi-square test / χ^2 / calculated from rs1801133: C>T genotype/allele distributions; data available upon request) which marginalizes sampling bias. Association studies were analyzed by the odds-ratio (OR) and χ^2 (with Yates's correction, where applicable), where *p*-values <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

We observed a marked overall difference in allelic distribution between fertile and sub-/infertile Czech cohorts, since the frequency of allele "A" was significantly increased in infertile males (*p*=0.007; Table 1). This observation was also reflected in the distribution of G/A and A/A genotypes in sub-/infertile men (*p*=0.008; Table 2). When breaking down our aggregate results according to sperm counts (as specified above), we observed that allele "A" was particularly "enriched" in oligozoospermic men, i.e. in group b), compared to fertile controls (*p*=0.002; Table 1).

DISCUSSION

In this study we have replicated the significant association between the *ART3* rs6836703: G>A variant originally detected in the Japanese population in an unrelated Czech cohort. The "A" allele was comparatively "enriched" in oligozoospermic men, while the corresponding reduction of the allele "G" in infertile cases indirectly supports the "protective effect" of this allele on spermatogenesis.

Our observation of the increase of allele "A" frequencies in cases versus controls is not skewed due to insufficient sample size and/or sampling bias as verified by

non significant deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium in control samples. Given the low allele frequency for the "A" allele in the *ART3* variant rs6836703: G>A, we calculated HWE equilibrium from rs1801133: C>T (MTHFR c.677C>T; p.A222V) genotype/allele distributions which has a higher frequency for the recessive allele (data available upon request) minimizing type I error which is the probability of rejecting a true null hypothesis leading to false exclusion of associated markers, usually disease-associated SNPs, in HWE calculations. Tests for HWE presume that genotypes are randomly collected from the general population. In most association studies controls are selected by their apparently health status, thus being relatively "over-represented" compared to the general population. This could be a compounding feature for common diseases but is not applicable to our case (Salanti *et al.* 2005; Li & Li 2008; Wang & Shete 2010). In addition, potential of false positivity in HRM of small amplicons is negligible (Liew *et al.* 2004; Norambuena *et al.* 2009; Wittwer 2009).

Absence of association with azoospermia (Tables 1 and 2) may indicate that the *ART3* variant rs6836703: G>A likely causes a milder, i.e. "quantitative", reduction in spermatogenesis within the Czech population. However, we did not find any homozygous for the "A" allele within the azoospermic cohort most likely due to the lower number of azoospermic patients (*n* = 18) who

Tab. 1. *ART3* rs6836703: G>A allele distribution.

	Allele		OR (95% CI)	<i>p</i> -value
	G	A		
Fertile	442/514 (0.860)	72/514 (0.140)		
Sub-/infertile men (all)	152/196 (0.776)	44/196 (0.224)	1.78 (1.17-2.70)	0.007
Azoospermic	31/36 (0.861)	5/36 (0.139)	0.99 (0.37-2.63)	1
Oligozoospermic	121/160 (0.756)	39/160 (0.244)	1.98 (1.28-3.07)	0.002

Tab. 2. *ART3* rs6836703: G>A genotype distribution.

	Genotype			<i>p</i> -value
	G/G	G/A	A/A	
Fertile	194/257 (0.755)	54/257 (0.210)	9/257 (0.035)	
Sub-/infertile men (all)	58/98 (0.592)	36/98 (0.367)	4/98 (0.041)	0.008
Azoospermic	13/18 (0.722)	5/18 (0.278)	0/18 (0.000)	0.939 ⁽¹⁾
Oligozoospermic	45/80 (0.563)	31/80 (0.388)	4/80 (0.050)	0.004

⁽¹⁾ Yates's correction

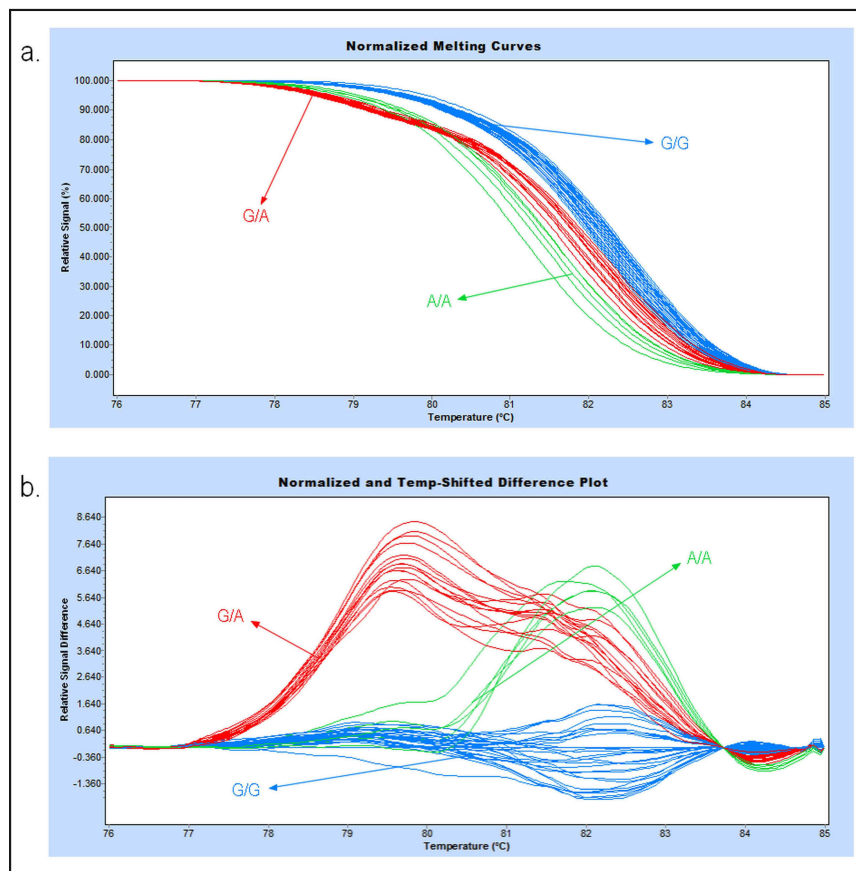


Fig. 1. Genotyping of rs6836703: G>A SNP by HRM of small amplicons. From the normalized melting curves (panel "a") it is possible to recognize both homozygous groups (G/G and A/A) by the difference in their melting temperature (T_m) and the heterozygous group (G/A) by the difference in the melting curve shape. Normalized temperature-shifted difference plot (panel "b") helps to the assignment by eye-inspection increasing the difference of the shape between melting profile groups. Control samples for each genotype (G/G, G/A and A/A) were run in duplicate. Each genotype group is indicated by arrows.

were selected according to stringent exclusion / inclusion criteria (Hucklenbroich *et al.* 2005; Wu *et al.* 2007; Yang *et al.* 2008) from a larger initial cohort of infertile cases. Moreover, there is a particularly low frequency of the "A/A" genotype in the European population (HapMap-CEU: G/G=0.750; G/A=0.250; A/A=0.0; dbSNP accessed by 09-19-2011) which further substantiates its potentially negative evolutionary selection.

It needs to be noted that the Japanese study included only patients with "non-obstructive azoospermia" without any further sub-stratification of cases according to their sperm counts by inclusion of sub-fertile patients (Okada *et al.* 2008). Moreover, the Japanese study group

included patients with AZF microdeletions who could create, compared to the Czech patient cohort, a strong confounding variable. We presume that observed inter-population differences might also reflect alternative study designs (multiple variant versus single variant testing), differences in cohort sizes and/or the role of ethnic background / environmental factors (Tüttelmann *et al.* 2007; Aston & Carrell 2009).

Furthermore, the ethnic background of case-control studies needs to be taken into account. For instance, the previously reported association between a moderate expansion in the CAG repeats in the androgen receptor and reduced spermatogenesis in Asian populations has

not been replicated in European studies (Ferlin *et al.* 2006; Rajender *et al.* 2007). Thus, in this study replication of original Japanese findings in an unrelated Czech cohort markedly increases the likelihood of its "real" functional association.

To date there is no further information on the pathway that disrupts spermatogenesis which could involve the rs6836703: G>A and/or ART3 protein (Glowacki *et al.* 2002; Friedrich *et al.* 2006a; Friedrich *et al.* 2006b; Okada *et al.* 2008). No difference was observed in testicular ART3 protein expression among haplogroups containing the rs6836703: G>A variant (Okada *et al.* 2008). The rs6836703: G>A variation might affect the expression/regulation of ART3 and/or of another protein(-s). In this regard, possible DNA-protein binding-sites for TFII-I, E2F-1 and PEA3 transcription factors were found for the DNA sequence containing the observed variation in ART3 (PROMO – online program; Messeguer *et al.* 2002; Farré *et al.* 2003). Such *in silico* predictions may provide leads into additional studies of function of the ART3 protein in spermatogenesis. In any case, further replication studies in unrelated European-derived populations (Lao *et al.* 2008) are necessary in order to corroborate this difference. Eventual positive associations detected in unrelated populations could provide additional evidence for utilization of the respective ART3 variant in reproductive genetics diagnostics.

In summary, our study provided the first replication of the original Japanese report which suggested that ART3 rs6836703: G>A variant is implicated in impaired spermatogenesis and thus opens new avenues of research.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank to Drs. Tereza Piskáčková, Miroslava Balasčáková for providing patient data, and to Dr. Alexandra Štambergová for technical assistance. This study was supported by MZ0FNM2005 from the Czech Ministry of Health and CZ.2.16/3.1.00/24022OPPK to MM Jr.

REFERENCES

- Aston KI, Carrell DT (2009). Genome-wide study of single-nucleotide polymorphisms associated with azoospermia and severe oligozoospermia. *J Androl.* **30**: 711–725.
- Farré D, Roset R, Huerta M, Adsuar JE, Roselló L, Albà MM, Messeguer X (2003). Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res.* **31**: 3651–3653.
- Ferlin A, Arredi B, Foresta C (2006). Genetic causes of male infertility. *Reprod Toxicol.* **22**: 133–141.
- Friedrich M, Grahner A, Paasch U, Tannapfel A, Koch-Nolte F, Hauschildt S (2006a). Expression of toxin-related human mono-ADP-ribosyltransferase 3 in human testes. *Asian J Androl.* **8**: 281–287.
- Friedrich M, Grahner A, Klein C, Tschöp K, Engeland K, Hauschildt S (2006b). Genomic organization and expression of the human mono-ADP-ribosyltransferase ART3 gene. *Biochim Biophys Acta.* **1759**: 270–280.
- Glowacki G, Braren R, Firner K, Nissen M, Kühl M, Reche P, et al (2002). The family of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and the mouse. *Protein Sci.* **11**: 1657–1670.
- Hucklenbroich K, Gromoll J, Heinrich M, Hohoff C, Nieschlag E, Simoni M (2005). Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis. *Hum Reprod.* **20**: 191–197.
- Koch-Nolte F, Haag F, Braren R, Kühl M, Hoovers J, Balasubramanian S, et al (1997). Two novel human members of an emerging mammalian gene family related to mono-ADP-ribosylating bacterial toxins. *Genomics.* **39**: 370–376.
- Krausz C, Giachini C (2007). Genetic risk factors in male infertility. *Arch Androl.* **53**: 125–133.
- Lao O, Lu TT, Nothnagel M, Junge Q, Freitag-Wolf S, Caliebe A, et al (2008). Correlation between genetic and geographic structure in Europe. *Curr Biol.* **18**: 1241–1248.
- Li M, Li C (2008). Assessing departure from Hardy-Weinberg equilibrium in the presence of disease association. *Genet Epidemiol.* **32**: 589–599.
- Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, et al (2004). Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms by High-Resolution Melting of Small Amplicons. *Clin Chem.* **50**: 1156–1164.
- Messeguer X, Escudero R, Farré D, Núñez O, Martínez J, Albà MM (2002). PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics.* **18**: 333–334.
- Norambuena PA, Copeland JA, Krenková P, Stambergová A, Macek M Jr (2009). Diagnostic method validation: High resolution melting (HRM) of small amplicons genotyping for the most common variants in the MTHFR gene. *Clin Biochem.* **42**: 1308–1316.
- Okada H, Tajima A, Shichiri K, Tanaka A, Tanaka K, Inoue I (2008). Genome-wide expression of azoospermia testes demonstrates a specific profile and implicates ART3 in genetic susceptibility. *PLoS Genet.*
- Rajender S, Singh L, Thangaraj K (2007). Phenotypic heterogeneity of mutations in androgen receptor gene. *Asian J Androl.* **9**: 147–179.
- Salanti G, Amountza G, Ntzani EE, Ioannidis JP (2005). Hardy-Weinberg equilibrium in genetic association studies: an empirical evaluation of reporting, deviations, and power. *Eur J Hum Genet.* **13**: 840–848.
- Tüttelmann F, Rajpert-De Meyts E, Nieschlag E, Simoni M (2007). Gene polymorphisms and male infertility—a meta-analysis and literature review. *Reprod Biomed Online.* **15**: 643–658.
- Wang J, Shete S (2010). Using both cases and controls for testing hardy-weinberg proportions in a genetic association study. *Hum Hered.* **69**: 212–218.
- Wittwer CT (2009). High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Hum Mutat.* **30**: 857–859.
- World Health Organization (2010) WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen 5th ed. Switzerland: WHO Press.
- Wu B, Lu NX, Xia YK, Gu AH, Lu CC, Wang W, et al (2007). A frequent Y chromosome b2/b3 subdeletion shows strong association with male infertility in Han-Chinese population. *Hum Reprod.* **22**: 1107–1113.
- Yang Y, Ma M, Li L, Zhang W, Chen P, Ma Y, et al (2008). Y chromosome haplogroups may confer susceptibility to partial AZFc deletions and deletion effect on spermatogenesis impairment. *Hum Reprod.* **23**: 2167–2172.

4. DISKUZE A ZÁVĚRY

S vyšším věkem matky stoupá riziko výskytu CA v oocytech, které tvoří zhruba 90% podíl všech chromosomových aneuploidií u aberantních embryí. Vysoká frekvence CA tvoří významný podíl na selhání implantace embryí. Četné studie potvrdily, že 15 – 20 % oocytů nese CA způsobené nondisjunkcí chromosomů nebo předčasnou separací chromatid (Angel 1994, Pellestor et al., 2002). Tato data byla potvrzena i výsledky cytogenetických studií lidských preimplantačních embryí, neboť 25-60 % z nich nese CA. Pouze 40% embryí transferovaných v IVF cyklech vede k úspěšnému těhotenství. Problematika mechanismu vzniku CA během zrání oocyty je stále aktuální a nedostatečně prozkoumána, o čemž svědčí i recentní publikace zabývající se touto problematikou. Přímá cytogenetická analýza zralých lidských oocytů představovala významný krok k objasnění výskytu CA u člověka, jejíž výsledek má přímý dopad na úspěšnost umělého oplození (Pellestor et al. 1988, 1995, 2005).

V nedávné době bylo nejrozšířenější diagnostické vyšetření chromosomových aneuploidií embryí vzniklých technikou IVF molekulárně-cytogenetické vyšetření blastomer metodou FISH s cílenými sondami na specifické markery, které ovšem neposkytuje kompletní informaci o celém karyotypu. Další nevýhodou v tomto přístupu je rozsáhlý mozaicismus ve vyvíjejícím se raném embryu, vedoucí ke špatné interpretaci embryonálního karyotypu získaného na základě informace z jedné blastomery. Mnohem komplexnější metoda, která se v současné době uplatňuje v diagnostických cytogenetických postupech vyšetření aneuploidií, je technika arrayCGH.

V současné době se vede diskuze o zavedení arrayCGH do rutinní diagnostické praxe a proplácení výkonu zdravotními pojišťovnami (prof. M. Macek, jr. DrSc, osobní sdělení). Tyto aspekty předurčují důležitost preimplantačního cytogenetického vyšetření, zejména PB technikou aCGH, jakožto relativně bezpečné a nízkoinvazivní metody PGS. Molekulárně-cytogenetické vyšetření obou PB během jednoho IVF cyklu pomocí arrayCGH by zatím bylo finančně náročné, a proto je důležité zavést indikační kritéria pro toto vyšetření. S rozvojem moderních cytogenetických metod, založených na principu mikročipů, dochází k výraznému posunu v diagnostice a výzkumu aneuploidií i strukturních abnormalit v lidských gametách a embryích.

Mezi nejperspektivnější technologie v současnosti patří metoda arrayCGH, která umožňuje studovat početní i nebalancované strukturní změny v celém genomu při velmi dobrém rozlišení, včetně vyšetření pomocí mikročipů na bázi jednonukleotidových polymorfismů (SNP; single nucleotide polymorphism) umožňující rozlišení až na úrovni jednotlivých nukleotidů. Metoda arrayCGH se již klinicky využívá i v PGD/PGS. Mikročipové technologie dnes mají důležitou úlohu jako nástroj pro screening aneuploidií a detekci strukturních nebalancovaných abnormalit v PB, blastomerách nebo trofektodermu a umožňují následný výběr geneticky normálních embryí vhodných k transferu při IVF. S vývojem těchto technologií rostou možnosti jejich uplatnění v klinické diagnostice CA a významně doplňují a postupně nahrazují klasické cytogenetické i molekulárně cytogenetické metody.

Při léčbě neplodnosti pomocí metod ART máme možnost odhalit CA, které u člověka vznikají v průběhu gametogeneze, oplození a časného vývoje *in vitro* i *in vivo* a vybrat pouze zdravá (euploidní) embrya pro transfer. Proto je kladen velký důraz na objasnění původu těchto jevů a jejich co možná nejlepší diagnostiku.

Díky svým unikátním fyzikálně-chemickým vlastnostem PNA sondy představují efektivní alternativu nové technologie na poli molekulární cytogenetiky, stejně tak jako zajímavou alternativu metody FISH pro molekulárně cytogenetické vyšetření a *in situ* detekci CA. Aplikace PNA v lidské reprodukční genetice je zajímavým příkladem efektivnosti těchto sond. Úspěšně jsme adaptovali PNA techniku na lidské spermie, oocyty, PB a preimplantační embrya. Pomocí centromerických specifických PNA sond jsme demonstrovali jejich účinnost pro rychlou detekci CA na lidských oocytech, polárních těliscích a blastomerách. To znamenalo náročný úkol vzhledem ke specifitě těchto buněk. Naše experimenty prokázaly, že tento nový typ sond lze použít i na specifický typ biologického materiálu, a to *jednotlivé buňky*. Rychlost *in situ* značení, vysoká specifita PNA sond a jejich stability jsou signifikantní výhody pro jejich použití pro klinické aplikace, obzvláště tehdy, když chromosomová analýza musí být provedena v limitovaném čase (jako v případě PGD/PGS) nebo u vysoce kondenzovaných jader jako u lidských spermií, na limitovaném množství materiálu, jako v případě lidských oocytů nebo blastomer.

Nicméně, rozvoj PNA technologie v oblasti lidské genetiky byl konfrontován s některými problémy, které se nakonec staly limitujícím faktorem pro rutinní použití PNA sond v klinické diagnostice. Především vývoj a komerční distribuce FISH - DNA sond byl mnohem intenzivnější díky vytvoření rozsáhlé knihovny sond, zjednodušení jejich výrobního procesu, poklesu prodejní ceny a rozvoj firem distribuujících FISH sondy (např. Abbott-Vysis, Oncor). Oproti tomuto rozsáhlému marketingu jsou PNA sondy distribuovány pouze několika firmami (AppliedBiosystem, Dako, Panagene) (www.dako.com, www.panagene.com). V neposlední řadě, PNA protokol pro in situ značení chromosomů je podobný FISH protokolu, a proto byly PNA sondy považovány velkou většinou laboratoří pouze jako varianty „klasické“ FISH. V současné době jsou na trhu PNA sondy telomerické a firma Applied Biosystems nabízí program „The PNA Probe Designer“, přes který je možné si navrhnout vlastní PNA sondy (www6.appliedbiosystems.com/support/pnadesigner.cfm).

PNA sondy jsou v molekulární cytogenetice nejčastěji využívány pro různé výzkumné aplikace, kde byla prokázána výrazně vyšší efektivita než u standardních FISH sond. Takovým příkladem je analýza telomer. Řada prací hodnotí vysokou spolehlivost PNA sond pro studium jaderné topologie (Nagele et al, 2001), kinetiky distribuce chromosomů během buněčného cyklu, stejně jako pro mnoho jiných klinických a diagnostických aplikací. Zřejmě nejvýznamnější je v současné době využití PNA pro regulaci genové exprese pomocí microRNA. PNA mohou inhibovat transkripci i translaci cílových genů (antigene, antisense therapy) (Fabbri et al., 2011).

V souhrnu byla má disertační práce zaměřena na využití metod molekulární cytogenetiky, a to zejména využití PNA sond v diagnostice aneuploidií lidských gamet, PB. Prezentovala jsem přehled metod studia CA v lidských gametách a embryích a shrnula jejich výhody a limitace. Tyto metody dosud nejsou obsoletní a ve vhodných indikacích doplňují rychle se rozšiřující vyšetření aCGH v diagnostické praxi v reprodukční genetice.

V experimentální části své práce jsem se věnovala především studiu CA ve spermiích nosičů zárodečné mutace TP53, pacientů s LFS. Tato studie byla první studií tohoto typu a podařilo se nám prokázat signifikantně zvýšenou frekvenci chromosomových aneuploidií, zejména gonozomů, u těchto pacientů. To představuje zvýšené riziko chromosomových aneuploidií pro potomstvo těchto mužů. Nález je zajímavý i z hlediska nedávného odhalení účasti genu TP53 ve spermatogenezi (Mashayeghi, 2012). Asi 15% případů mužské infertility je způsobeno definovanými genetickými faktory jako, chromosomovými abnormalitami,

mikrodelecemi chromosomu Y a mutacemi v genech, které hrají důležitou roli ve spermatogenezi. Velký podíl mužské infertility však tvoří idiopatická infertility. V posledních letech byla identifikována řada genů a genetických variant, souvisejících s mužskou infertility a tyto studie dále pokračují. V poslední části své experimentální práce jsem se proto účastnila studie zkoumající vliv varianty rs6836703:G>A v genu pro ADP-ribosyltransferázu na spermatogenezi u české populace subfertilních a infertilních mužů pomocí metody HRM.

5. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

Abruzzo MA, Hassold TJ. Etiology of nondisjunction in humans
Environ Mol Mutagen. 1995;25 Suppl 26:38-47. Review

Angell R.R Meiosis I in human oocytes. Cytogen Cell Genet 69:266-272 1991

Antonarakis SE, Blouin JL, Maher J, Avramopoulos D, Thomas G, Talbot CC Jr. Maternal uniparental disomy for human chromosome 14, due to loss of chromosome 14 from somatic cells.

Am J Hum Genet. 1993 Jun;52(6):1145-52.

Baart EB, Martini E, van den Berg I, Macklon NS, Galjaard RJ, Fauser BC, Van Opstal D.: Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos.

Hum Reprod. 2006 Jan;21(1):223-33.

Braude P, Pickering S, Flint F, Ogilvie CM.: Preimplantation genetic diagnosis

Nat Rev Genet. 2002 Dec;3(12):941-53.

De Braekeleer M., Perrin A., Morel F., Chromosomal abnormalities in male fertility.

Cytogenetics and Fertility, 2006, 27-52

Coonen E, Dumoulin JC, Ramaekers FC, Hopman AH.

Optimal preparation of preimplantation embryo interphase nuclei by FISH

Hum Reprod. 1994 Mar;9(3):533-7.

Delhanty JD. Mechanisms of aneuploidy induction in human oogenesis and early embryogenesis

Cytogenet Genome Res. 2005;111(3-4):237-44

Duzcan F, Aybek Z, Tepeli E, Caner V, Cetin GO, Aybek H, Bagci H.: Sex chromosome aneuploidy rates in the somatic cells of infertile men

J Reprod Med. 2006 Jun;51(6):489-92.

Egozcue S, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Egozcue J.: Increased incidence of meiotic anomalies in OAT males preselected for intracytoplasmic sperm injection

J Assist Reprod Genet. 2000 Jul;17(6):307-9.

Escudero T, Estop A, Fischer J, Munne S. : Preimplantation genetic diagnosis for complex chromosome rearrangements

Am J Med Genet A. 2008 Jul 1;146A(13):1662-9.

Fabbri E, Brognara E, Borgatti M, et al.: miRNA therapeutics: delivery and biological activity of peptide nucleic acids targeting miRNAs
Epigenomics. 2011 Dec;3(6):733-45

Ferlin A, Vinanzi C, Garolla A, Selice R, Zuccarello D, Cazzadore C, Foresta Infertility and androgen receptor gene mutations:clinical features and identification of seven novel mutations
Clin Endocrinol (Oxf). 2006 Nov;65(5):606-10.

Fisher JM, Harvey JF, Morton NE, Jacobs PA.Trisomy 18: studies of the parent and cell division of origin and the effect of aberrant recombination on nondisjunction
Am J Hum Genet. 1995 Mar;56(3):669-75.

Fragouli E, Bianchi V, Patrizio P, Obradors A, Huang Z, Borini A, Delhanty JD, Wells D. Transcriptomic profiling of human oocytes:association of meiotic aneuploidy and altered oocyte gene Mol Hum Reprod. 2010 Aug;16(8):570-82

Fragouli E, Wells D, Delhanty JD.: Chromosomal abnormalities in the human oocyte
Cytogenet Genome Res. 2011;133(2-4):107-18

Fragouli E, Wells D. Aneuploidy screening for embryo selection
Semin Reprod Med. 2012 Aug;30(4):289-301

Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Jaroudi S, Sarasa J, Enciso M, Wells D.: The origin and impact of embryonic aneuploidy
Hum Genet. 2013 Apr 26.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP.: The in vivo and in vitro efficiency and efficacy of PGD for aneuploidy
Mol Cell Endocrinol. 2001 Oct 22;183

Giesen U, Kleider W, Berding C, Geiger A, Orum H, Nielsen PE.
A formula for thermal stability T_m prediction of PNA/DNA duplexes
Nucleic Acids Res. 1998 Nov 1;26(21):5004-6.

Handel MA, **Schimenti JC**.: Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility
Nat Rev Genet. 2010 Feb;11(2):124-36

Harvey JC, Pfeffer NJ, Bisi JE, Thomson SA, Cadilla R, Josey JA, Ricca DJ, Hassman CF, Bonham MA, Au KG, et al. Antisense and antigene properties of PNA
Science. 1992 Nov 27;258(5087):1481-5.

Harper J.Preimplantation genetics and diagnosis
Prenat Diagn. 2000 Dec;20(13):

Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, Saker D, Shen J, Zaragoza M. Human aneuploidy: incidence, origin and etiology *Environ Mol Mutagen*. 1996;28(3):167-75.

Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy *Nat Rev Genet*. 2001 Apr;2(4):280-91

Hassold T, Hall H, Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going *Hum Mol Genet*. 2007 Oct 15;16

Huang C, Liu W, Ji GX, Gu AH, Qu JH, Song L, Wang XR. Genetic variants in TP53 and MDM2 associated with male infertility in Chinese population *Asian J Androl*. 2012 Sep;14(5):691-4.

Hunt PA, Hassold TJ. Sex matters in meiosis *Science*. 2002 Jun 21;296(5576):2181-3.

Jensen KK, Orum H, Nielsen PE, Nordén B. Kinetics for hybridization of PNA with DNA and RNA studied with the BIAcore technique *Biochemistry*. 1997 Apr 22;36(16):5072-7.

Kaiser P. Pericentric inversions. Problems and significance for clinical genetics. *Hum Genet* 1984, 68 1-47

Kamiguchi Y, Rosenbusch B, Sterzik K, Mikamo K. Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes prepared by a gradual fixation-air drying method *Hum Genet*. 1993 Jan;90(5):533-41.

Koch J. Principles and application of PRINS in cytogenetics *Curr Protoc Hum Genet*. 2004 Sep;

Krutilkova V, et al: Identification of five new families strengthens the link between childhood choroid plexus carcinoma and germline TP53 mutations *Eur J Cancer*. 2005 Jul;41(11):1597-603.

Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E. Klinefelter's syndrome *Lancet*. 2004 Jul 17-23;364(9430):273-83.

Li FP, Fraumeni JF Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med*. 1969 Oct;71(4):747-52.

Liehr T, Claussen U. Current developments in human molecular cytogenetic techniques *Curr Mol Med*. 2002 May;2(3):283-97

Loup V, Bernicot I, Janssens P, Hedon B, Hamamah S, Pellestor F, Anahory T.: Combined FISH and PRINS sperm analysis of complex chromosome rearrangement t(1;19;13): an approach facilitating PGD
Mol Hum Reprod. 2010 Feb;16(2):111-6.

Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP. Chromosomal aneuploidy in embryos
Mol Cell Endocrinol. 2001 Oct 22;183

Malkin D. p53 and the Li-Fraumeni syndrome
Cancer Genet Cytogenet. 1993 Apr;66(2):83-92.

Mantzouratou A, Delhanty JD.
Aneuploidy in the Human Cleavage Stage Embryo
Cytogenet Genome Res. 2011;133(2-4):141-8.

Martin R.
A detailed method for obtaining preparations of human sperm chromosomes
Cytogenet Cell Genet. 1983;35(4):252-6.

Martin R., Ko E., Chan K.: Detection of aneuploidy in human interphase spermatozoa by fluorescence in situ hybridization Cytogenet Cell Genet 1993, 64:23-6,

Martin R., H. Cytogenetic determinants of male fertility. Hum Reprod Update 14(4) 2000, 379-90

Mashayekhi F, Hadiyan SP. A single nucleotide polymorphism in TP53 may be a genetic risk factor for Iranian patients with idiopathic male infertility
Andrologia. 2012 May;44 Suppl 1:560-4.

Mau-Holzmann UA.: Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women
Cytogenet Genome Res. 2005;111(3-4):317-36.

Montag M, van der Ven K, Delacrétaiz G, Rink K, van der Ven H. Laser-assisted microdissection of the zona pellucida facilitates polar body biopsy
Fertil Steril. 1998 Mar;69(3):539-42.

Munné S, Grifo J, Cohen J, Weier HU. Chromosome abnormalities in human arrested preimplantation embryos: a multiple probe FISH study
Am J Hum Genet. 1994 Jul;55(1):150-9.

Munné S, Sandalinas M, Magli C, Gianaroli L, Cohen J, Warburton D. Increased rate of aneuploid embryos in young women with previous aneuploid conceptions
Prenat Diagn. 2004 Aug;24(8):638-43.

Nagele RG, Velasco AQ, Anderson WJ, McMahon DJ, Thomson Z, Fazekas J, Wind K, Lee H.: Telomere association in interphase nuclei: possible role in maintenance of interphase chromosome topology
J Cell Sci. 2001 Jan;114(Pt 2):377-88

Nicolaidis P., Petersen M: Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies Hum Rep 13: 313-319, 1998

Nielsen J and Wohler M, 1991: Chromosome abnormalities found among 34.910 newborn children: results from a 13year incidence study in Arhus, Denmark, 1991, Hum genet 87, 81-3

Nielsen P., Egholm R., Berg H., Buchardt O, 1991: Sequence –selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine –substituted polyamide, 1991 Science 191.(254), 1497-500

Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1969 Oct;64(2):600-4.

Paskulin Dd, Paixão-Côrtes VR, Hainaut P, Bortolini MC, Ashton-Prolla P. TP53 fertility network
Genet Mol Biol. 2012 Dec;35(4 (suppl)):939-46. Epub 2012 Dec 18.

Pellestor F, Girardet A, Lefort G, Andréo B, Charlieu JP. Selection of chromosome-specific primers and their use in simple and double PRINS techniques for rapid in situ identification of human chromosomes
Cytogenet Cell Genet. 1995;70(1-2):138-42.

Pellestor F, Girardet A, Lefort G, Andréo B, Charlieu JP. Rapid chromosome detection in human gametes, zygotes and preimplant embryos using the PRINS technique
J Assist Reprod Genet. 1996 Sep;13(8):675-80.

Pellestor F, Girardet A, Coignet L, Andréo B, Lefort G, Charlieu JP.: Cytogenetic analysis of meiotic segregation in sperm from two males heterozygous for reciprocal translocations using PRINS and humster techniques.
Cytogenet Cell Genet. 1997;78(3-4):202-8.

Pellestor F, Andréo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J. Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes
Hum Genet. 2003a Feb;112(2):195-203.

Pellestor F, Andréo B, Taneja K, Williams B.: PNA on human sperm: a new approach for in situ aneuploidy estimation
Eur J Hum Genet. 2003b Apr;11(4):337-41.

Pellestor F, Anahory T, Hamamah S. The chromosomal analysis of human oocytes
Hum Reprod Update. 2005 Jan-Feb;11(1):15-32.

Pellestor F, Anahory T, Lefort G, Puechberty J, Liehr T, Hédon B, Sarda P. Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior
Hum Reprod Update. 2011 Jul-Aug;17(4):476-94.

Pettenati M., Rao N., Phelan M.C., Grass F., Rao K.W., Cosper P., Carroll A.J., Elder F., et al., 1995: Paracentric inversions in humans . Am J Med Genet 55(2):171-87

Pivnick EK, Furman WL, Velagaleti GV, Jenkins JJ, Chase NA, Ribeiro RC. Simultaneous adrenocortical carcinoma and ganglioneuroblastoma in child with Turner syndrome and germline p53 mutation
J Med Genet. 1998 Apr;35(4):328-32.

Rasmussen H, Kastrup JS, Nielsen JN, Nielsen JM, Nielsen PE. Crystal structure of a peptide nucleic acid (PNA) duplex at 1.7 Å resolution
Nat Struct Biol. 1997 Feb;4(2):98-101

Rausch et al.: Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations
Cell. 2012 Jan 20;148(1-2):59-71

Ray A, Nordén B.: PNA: its medical and biotechnical applications and promise for the future
FASEB J. 2000 Jun;14(9):1041-60.

Rudak E., Jacobs P.A., Yanagimachi R. 1978: Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa . Nature 274:911-913, 1978

Sarrate Z, Vidal F, Blanco J.: Role of sperm FISH studies in infertile patients: indications, study approach and clinical relevance
Fertil Steril. 2010 Apr;93(6):1892-902.

Sarrate Z, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Egozcue J, Vidal F.: FISH studies of chromosome abnormalities in germ cells and its relevance in reproductive counseling
Asian J Androl. 2005 Sep;7(3):227-36.

Schlegel T, Mirus O, von Haeseler A, Schleiff E. The tetratricopeptide repeats of receptors involved in protein translocation across membranes
Mol Biol Evol. 2007 Dec;24(12):2763-74. Epub 2007 Sep 28.

Simoni M, Tüttelmann F, Gromoll J, Nieschlag E. Clinical consequences of microdeletions of the Y chromosome: the extended Munster experiences
Reprod Biomed Online. 2008 Feb;16(2):289-303.

Tagliani-Ribeiro A, Paskulin DD, Oliveira M, Zagonel-Oliveira M, Longo D, Ramallo V, Ashton-Prolla P, Saraiva-Pereira ML, Fagundes NJ, Schuler-Faccini L, Matte U. High twinning rate in Candido Godoi: a new role for p53 in human fertility
Hum Reprod. 2012 Sep;27(9):2866-71

Templado C, Donate A, Giraldo J, Bosch M, Estop A. Advanced age increases chromosome structural abnormalities in human spermatozoa
Eur J Hum Genet. 2011 Feb;19(2):145-51.

Templado C, Vidal F, Estop A.: Aneuploidy in human spermatozoa
Cytogenet Genome Res. 2011;133(2-4):91-9

Vialard F, Boitrelle F, Molina-Gomes D, Selva J. Predisposition to aneuploidy in the oocyte
Cytogenet Genome Res. 2011;133(2-4):127-35

Verlinsky Y, Cieslak J, Freidline M, Ivakhnenko V, Wolf G, Kovalinskaya L, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, et al. Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by FISH
Hum Reprod. 1995 Jul;10(7):1923-7.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network
Nature. 2000 Nov 16;408(6810):307-10

Wells D, **Delhanty JD**. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. Mol Hum Reprod. 2000 Nov;6(11):1055-62.

Wells D, Alfarawati S., Fragouli E: Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment:microarrays and CGH. Mol Hum Rep 14:703-710. 2008.

6. PŘEHLED PUBLIKACÍ, POSTERŮ, PŘEDNÁŠEK A OCENĚNÍ

6.1 PUBLIKACE

6.1.1 Zahraniční publikace s přímým vztahem k disertační práci

1. PAULASOVA P, ANDRÉO B, DIBLÍK J, MACEK M, PELLESTOR F. The peptide nucleic acids as probes for chromosomal analysis: application to human oocytes, polar bodies and preimplantation embryos.
Mol Hum Reprod 2004; 10: 467-472.
IF 4.542 (citováno: 17x)
2. PELLESTOR F, PAULASOVA P, ANDRÉO B, LEFORT G, HAMAMAH S. Multicolor PRINS and multicolor PNA.
Cytogenet Genome Res 2006; 114: 263-269
IF 1.885 (citováno: 5x)
3. PELLESTOR F, PAULASOVA P, HAMAMAH S. Peptide nucleic acids (PNAs) as diagnostic devices for genetic and cytogenetic analysis
Curr Pharma Design 2008; 14: 2439-2444
IF 3.696 (citováno: 19x)
4. PAULASOVA P, Diblík J, Trkova M, Macek M Sr, Sedlacek Z. Increased sperm aneuploidy in two male carriers of germline TP53 mutations.
Cancer Genet 2011; 204: 278-81.
IF: 1.915 (citováno 0)
5. NORAMBUENA PA, DIBLÍK J, KRENKOVA P, PAULASOVA P, MACEK M, MACEK M Sr.
An ADP-ribosyltransferase 3 (ART3) variant is associated with reduced sperm counts in Czech males: case/control association study replicating results from the Japanese population.
Neuro Endocrinol Lett. 2012;33(1):48-52.,
IF:1.05 (citováno 0)

6.1.2 Zahraniční publikace s nepřímým vztahem k disertační práci

6. PELLESTOR F, PAULASOVA P. The peptide nucleic acids (PNAs): introduction to a new class of probes for chromosomal investigation.
Chromosoma, Jun 2004, vol. 112,
IF 3.488 (citováno 8x)
7. PELLESTOR F, PAULASOVA P., MACEK M, HAMAMAH S. The peptide nucleic acids: a new way for chromosomal investigation on isolated cells?
Hum Reprod, September 2004, vol. 19, no. 9, p. 1946-51
IF 4.670 (citováno 7x)
8. PELLESTOR F, PAULASOVA P. The peptide nucleic acids (PNAs), powerful tools for molecular genetics and cytogenetics.
Eur J Hum Genet, Sept 2004, vol. 12, no. 9, p. 694-700no. 8, p. 375-80
IF 4.319 (citováno 13x)
9. PELLESTOR F, PAULASOVA P. The peptide nucleic acids, efficient tools for molecular diagnosis.
Int J Mol Med, Apr 2004, vol. 13, no.4, p. 521-525
IF 2.048 (citováno 23x)
10. PAULASOVA P., PELLESTOR F. The peptide nucleic acids (PNAs): a new generation of probes for genetic and cytogenetic analyses.
Ann Genet, October- December 2004, vol. 47, no.4, p. 349-58
(citováno 22x)
11. PELLESTOR F, PAULASOVA P., MACEK M, HAMAMAH S. The use of peptide nucleic acids for in situ identification of human chromosomes.
J Histochem Cytochem 2005; 53: 395-400
IF 2.534 (citováno: 8x)
12. PELLESTOR F, PAULASOVA P., MACEK M, HAMAMAH S. The peptide nucleic acids (PNAs): „high-tech“ probes for genetic and molecular cytogenetic investigations.
Med Sci (Paris) 2005, vol 21, no. 8-9, p.753-758
(citováno 3x)

13. PELLESTOR F, PAULASOVA P. PRINS combined with peptide nucleic acid labeling. Methods Mol Biol, 2006, vol. 334, p. 15-22
14. PELLESTOR F, PAULASOVA P. The use of peptide nucleic acids (PNAs) as probes in genetic and cytogenetic assay. Current Topics in Genetics 2006, 2: 57-64
15. PELLESTOR F, PAULASOVA P., HAMAMAH S.: PNA-FISH technique for in situ assessment of aneuploidy
In: Liehr T. (ed) Fluorescence In Situ Hybridization – Application Guide Springer- Verlag, Berlin 2009, pp 61-66

6.1.3 Publikace bez vztahu k disertační práci

1. Hořínek A, Šobra J, Češka R, Paulasová P.: Familial hypercholesterolemia from the aspect of DNA analysis Vnitr Lek. 1993;39: 946-50.
2. Macek M, Vilímová S, Potužníková P, Yurov Y, Paulasová P., et al.: Medical genetics in reproductive medicine Cas Lek Cesk. 2002;14: 28-34.
3. Diblík J, Vilímová Š, Potužníková P, Paulasová P., Macek M sr.: Vyšetření morfologie spermií pomocí počítačové analýzy. Reprodukční medicína 1/2002
4. Paulasová P., Andreo B., Diblík J., Macek M., Sr., Pellestor F.: The Peptide Nucleic Acids (PNAs) probes for chromosomal analysis of human oocytes, polar bodies and preimplantation embryos. In Czech, Praktická gynekologie, 2004, vol.5
5. Macek M. Sr., Feldmar P., Kluckova H., Hrehorcak M., Diblik J., Paulasova P., Turnovec M., Vilimova S., Macek M. Jr, FSH-R polymorphism in severe types of OHSS.Reproductive Biomedicine online 2010

6.2 PŘEDNÁŠKY A POSTERY

1. P. Norambuena, P. Krenkova, F. Tuettelmann, S. Kliesch, P. Paulasova, A. Stambergova, M. Macek Jr., M. Macek Sr. "ADP-ribosyltransferase variant (ART3) in Czech and German males with reduced sperm counts". European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Istanbul, Turecko, červenec, 2012
2. Krenkova P., Tuettelmann F., Kliesch S., Paulasova P., Diblík J., Macek M. jr, Macek M. sr. "PRM1 and PRM2 gene polymorphisms in Czech and German men with idiopathic oligozoospermia". European Society of Human Genetics Conference. Norimberk, Německo, červen 2012.
3. Křenková P., Tuettelmann F., Paulasová P., Diblík J., Macek M. jr, Macek M. sr. "PRM1 and PRM2 gene polymorphisms in Czech men with idiopathic oligozoospermia, normozoospermic men and men with proven fertility". European Society of Human Genetics Conference. Amsterdam, Nizozemí, květen 2011.
4. Macek M, Sr., Feldmar P, Kluckova H, Paulasova P, et al.: FSH-R polymorphism in OHSS type III and IV-V: results of a Czech pilot study. Conference: 27th Annual meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), Stockholm, Sweden, 2011
5. Křenková P., Tuettelmann F., Paulasová P., Diblík J., Macek M. jr, Macek M. sr. "PRM1 and PRM2 gene polymorphisms in Czech men with idiopathic oligozoospermia, normozoospermic men and men with proven fertility". conference 26th Annual meeting of ESHRE, Rome, Italy, 2010
6. Studentská vědecká konference 2.LF Univerzity Karlovy. Praha, duben, 2011. Macek M, Sr., Feldmar P, Kluckova H, Paulasova P, et al.: FSH-R polymorphism in severe types of OHSS (type III and IV/V): results of a Czech pilot study
7. J. Diblík, M. Macek Sr., P. Paulasova, M. Hrehorčák, H. Kluckova, M. Montag : Case report: high polar bodies aneuploidy rate in a patient with severe ovarian hyperstimulation syndrom. 10th International Congress Preimplantation Genetic Diagnosis, Montpellier, France, 2010
8. Macek M, Feldmar P, Kluckova H, Paulasova P, et al.: FSH-R polymorphism in severe types of OHSS. 10th International Congress Preimplantation Genetic Diagnosis, Montpellier, France, 2010
9. Chocholatý M, Dušek P, Nedbálek A, Diblík J, Černíková J, Paulasová P.: Kvalita ejakulátu a kryoprezervace spermatu u nemocných s nádorem varlat. Přednáška: 19. onkologicko-urologické sympozium, 2011
10. Slavík T, Černíková J, Paulasová P, Havlová G., Diblík J., Macek Sr: Význam vyšetření struktury chromatinu spermií pro program nepartnerského dárčovství: Jubilejní 10. česko-slovenská konference reprodukční gynekologie a 21. sympozium asistované reprodukce, Brno, 2011
11. P. Feldmar, M. Macek Sr, H. Kluckova, M. Hrehorčák, J. Diblík, P. Paulasova, M. Turnovec, S. Vilimova, M. Macek Jr.: The relationship of the FSH-R polymorphism to moderate

severe types of OHSS in Czech women. Přednáška-World Association of Reproductive Medicine, Moscow, 2010

12. Diblík J, Macek M, Paulasova P, et al.: Vysoký výskyt aneuploidií v polárních těliscích u ženys hyperstimulačním syndromem IV. stupně. Symposium asistované reprodukce, Brno, 2010.
13. Diblík J., T. Slavík, P. Paulasová, P. Houska, Š. Vilímová, M. Macek Sr.; Automated sperm aneuploidy analysis, konference ESHG, European Society of Human reproduction Vienna 2009.
14. Diblík J, Macek M, Montag M, Magli C, Paulasova P: Zkušenosti s preimplantační molekulárně-cytogenetickou diagnostikou aneuploidií v blastomerách, v I. a II. polárním tělisku. Česko-slovenská konference reprodukční gynekologie, Symposium reprodukční medicíny, 2007
15. Paulasova P.: The Peptide Nucleic Acids (PNAs) – probes for preimplantation chromosomal analysis . The Workshop of European Society of Human Reproduction and Embryology. Přednáška: Preimplantation testing using FISH, 22nd –23rd June 2006, Prague
16. Diblík J, Paulasová P, Montag M, Magli C, Pellestor F, Macek M Sr.: Molecular cytogenetic examination of gametes. 1. Mezinárodní andrologický kongres v České republice – sborník abstrakt. Štířín, 2006.
17. Diblík J, Montag M, Magli C, Macek M Sr, Paulasova P, Vilimova Š.: Preimplantační genetický screening aneuploidií vyšetřením 1. a 2. polárního tělíska. Prakt. Gynekologie 2005, 9(6)- abstrakta k 15. Symposiu asistované reprodukce SAR ČGPS, Brno, 2005
18. Paulasová P., Andreo B., Diblík J., Macek M., Sr., Pellestor F.: The Peptide Nucleic Acids (PNAs) probes for chromosomal analysis of human oocytes, polar bodies and preimplantation embryos. 2004, XVI. Workshop on Fetal Cells and Fetal DNA, April 17.- 18., 2004, Jena, Germany, Medizinische Genetik, No. 1 (März 2004), 16. Jahrgang, p.106, P006-008 (Abstrakt)
19. Paulasová P., Andreo B., Diblík J., Macek M., Sr., Pellestor F.: The Peptide Nucleic Acids (PNAs) probes for chromosomal analysis of human oocytes, polar bodies and preimplantation embryos. 2004
20. Paulasová P., Andreo B., Diblík J., Macek M., Sr., Pellestor F.: The use of PNA probes in preimplantation prenatal and postnatal cytogenetic diagnostic. Cytogenetic Symposium Olomouc, September 2004
21. Paulasová P., Andreo B., Diblík J., Macek M., Pellestor F.: The Peptide Nucleic Acids (PNAs) probes for chromosomal analysis of human oocytes, polar bodies and preimplantation embryos. Symposium asistované reprodukce, 2004
22. Diblík J., Paulasová P., Macek M.: Three dimensional analysis of Fluorescence in situ Hybridization in sperm, str. 140, 2003, EAA International Symposium: Genetics of Male Infertility: from research to clinic. Florence, Italy, 2003.
23. Paulasová P., Pellestor F., Diblík J., Macek M.: Využití PRINS k rychlé diagnostice aneuploidie ve spermiích. 12. Symposium asistované reprodukce, Brno 2002

24. Macek M Sr, Yurov Y, Diblík J, Vorsanova S, Paulasova P, et al.: Simplified method for molecular cytogenetic examination of human sperm cells. Reproductive BioMedicine Online, vol.4, Suppl.2, 2002. Abstract of the 4th International Symposium on Preimplantation genetic Diagnosis, Cyprus, 2002.
25. Diblík J, Jurov J, Paulasová P, Potužníková P, Vilímová Š, Macek M Sr.: Studium vztahu mezi parametry morfologie a frekvencí aneuploidie spermií. Asistovaná reprodukce 12/2002. 12. Symposium asistované reprodukce, Brno, 2002
26. Diblík J, Vilímová Š, Potužníková P, Paulasová P, Macek M Sr.: Vyšetření morfologie spermií pomocí počítačové analýzy. Mezinárodní symposium asistované reprodukce, Senohraby 2002. Sborník abstrakt Reprodukční medicína 1/2002.
27. Diblík J, Vincenciová R, Paulasová P, et al.: Studium vztahu mezi parametry morfologie a frekvencí aneuploidie spermií. 11. Symposium asistované reprodukce, Brno 2001 (Sborník abstrakt)

6.3 OCENĚNÍ

Cena za nejlepší publikaci v oblasti embryologie za rok 2004:

Paulasová P, Andréo B, Diblík J, Macek M, Pellestor F.

The peptide nucleic acids as probes for chromosomal analysis:

Application to human oocytes, polar bodies and preimplantation embryos

Molecular Human Reproduction, (viz výše)

