

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Molekulárně cytogenetická analýza kryptických
chromozomových přestaveb**

Markéta Kindlová

Školitel: RNDr. Eduard Kočárek, Ph.D.

2010/2011

Poděkování :

Děkuji RNDr. Eduardu Kočárkovi, Ph.D., z Oddělení biologie Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. lékařské fakulty UK v Praze a FN Motol za odborné vedení bakalářské práce.

Dále děkuji prof. MUDr. Evě Seemanové, DrSc., z Oddělení klinické genetiky ÚBLG 2. LF UK a FN Motol za poskytnutí fotografií pacientů a MUDr. Pavlu Tesnerovi z téhož ústavu za poskytnutí fotografií z fluorescenčního mikroskopu.

Analýzy v molekulárně cytogenetické laboratoři Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol, jejichž výsledků jsem použila ve své práci, byly podpořeny grantovým projektem Interní grantové agentury (IGA) Ministerstva zdravotnictví České republiky NR/9457-3.

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením RNDr. Eduarda Kočárka, Ph.D., a že jsem použila jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Praze dne 28. srpna 2010

.....

podpis

OBSAH

Seznam použitých zkratk a symbolů.....	5
Abstrakt.....	6
1. Teoretický úvod.....	7
1.1 Mikrodeleční syndromy.....	7
1.1.1 Syndromy asociované s mikrodeleci chromozomu 22q11.2.....	8
1.1.2 Williamsův-Beurenův syndrom.....	10
1.1.3 Millerův-Diekerův syndrom.....	11
1.1.4 Syndrom delecce 1p36.....	11
1.1.5 Angelmanův syndrom.....	12
1.1.6 Cri-du-chat syndrom.....	12
1.1.7 Praderův-Williho syndrom.....	13
1.1.8 Smithové-Magenisové syndrom.....	13
1.1.9 Jacobsenové syndrom.....	14
1.1.10 Wolfův-Hirschhornův syndrom.....	15
1.1.11 Ostatní.....	15
1.2 Metodické možnosti vyšetřování mikrodelečních syndromů.....	16
1.2.1 Základní (klasické) cytogenetické vyšetření.....	16
1.2.1.1 Metoda HRT.....	17
1.2.2 Molekulárně cytogenetické metody.....	17
1.2.2.1 FISH.....	17
1.2.2.2 CGH.....	21
1.2.2.3 Array CGH.....	21
1.2.2.4 Metody založené na PCR.....	22
2. Cíl práce.....	25
3. Experimentální část (materiál a metodika).....	26
3.1 Soubor pacientů.....	26
3.2 FISH.....	27
3.2.1 Příprava roztoků.....	27
3.2.2 Příprava hybridizačních směsí.....	30
3.2.3 Zpracování vzorku a následná hybridizace.....	31
3.2.4 Mikroskopická analýza.....	32

3.2.5	Práce s mikroskopem a se softwarem.....	32
3.2.6	Závěr analýzy.....	33
4.	Výsledky.....	35
4.1	Mikrodelece 22q11.2.....	35
4.2	Mikrodelece 7q11.23.....	37
5.	Diskuse.....	39
5.1	Metodické možnosti FISH a MLPA.....	39
5.2	Molekulárně cytogenetické vyšetření mikrodelečních syndromů.....	40
6.	Závěr.....	42
7.	Seznam použité literatury.....	43
8.	Přílohy.....	46

Seznam použitých zkratek a symbolů

AS	Angelmanův syndrom
ADHD	attention deficit hyperactivity disorder
CGH	comparative genomic hybridization
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DGCR	DiGeorge syndrome chromosome region
DGS	DiGeorgeův syndrom
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FITC	fluorescein-isothiokyanát
HRT	High Resolution Technique
ISH	<i>in situ</i> hybridizace
JBS	Jacobsenové syndrom
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
MS-MLPA	methylation sensitive-MLPA
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PA/VSD	pulmonary atresia/ventricular septal defect
PCR	polymerase chain reaction
PI	propidium iodide
PMR	psychomotorická retardace
PTLS	Potocki-Lupski syndrom
SSC	saline-sodium citrate
STR	short tandem repeat
TRITC	tetramethylrhodamin
ÚBLG	Ústav biologie a lékařské genetiky
UPD	uniparentální dizomie
VCFS	velokardiofaciální syndrom
WAGR	Wilmsův tumor, aniridie, genitourinární abnormality, mentální retardace
WBS	Williamsův-Beurenův syndrom
WHS	Wolfův-Hirschhornův syndrom

Abstrakt

Mikrodeleční syndromy se v populaci objevují s vysokou incidencí, nejčastější je DiGeorgeův syndrom s incidencí 1 : 4 000. Dalšími relativně častými syndromy jsou Williamsův-Beurenův syndrom, Millerův-Diekerův syndrom, syndrom delece 1p36 a další. Většina těchto syndromů způsobuje svým nositelům vážné klinické obtíže. Včasná a spolehlivá diagnóza pak může pomoci v léčbě postiženého pacienta (edukace, chirurgická korekce, rehabilitace, farmakoterapie) či v prenatální diagnostice. K analýze kryptických chromozomových aberací, které tyto syndromy způsobují, dnes nejčastěji používáme metodu FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) či metody založené na PCR (polymerázová řetězová reakce).

Abstract

Microdeletion syndromes occur in high incidence in the population, the most common syndrome is DiGeorge syndrome. Its incidence is 1 : 4 000. Another relatively frequent syndromes are Williams-Beuren syndrome, Miller-Dieker syndrome, 1p36 deletion syndrome and others. Most of these syndromes cause the serious clinical disorder to their carriers. Early and reliable diagnosis can help in treatment of the affected patient (education, surgical correction, physiotherapy, pharmacotherapy) or in prenatal diagnostics. We use FISH (fluorescent *in situ* hybridization) or PCR (polymerase chain reaction) based methods to analyse cryptic chromosomal rearrangements, which cause these syndromes.

Klíčová slova: molekulární cytogenetika – mikrodeleční syndrom – DiGeorgeův syndrom – Williamsův-Beurenův syndrom – Millerův-Diekerův syndrom – syndrom delece 1p36 – chromozom – FISH – PCR – MLPA

Keywords: molecular cytogenetics – microdeletion syndrome – DiGeorge syndrome – Williams-Beuren syndrome – Miller-Dieker syndrome – 1p36 deletion syndrome – chromosome – FISH – PCR – MLPA

1. Teoretický úvod

Genetika je věda o dědičnosti a proměnlivosti živých organizmů. Malé změny v naší DNA nám mohou poskytnout výhodu, stejně jako mohou způsobit katastrofu.

Tyto změny můžeme identifikovat pomocí molekulárně cytogenetické analýzy, tedy metod založených na *in situ* hybridizaci (např. FISH) či více citlivých od PCR odvozených metod, jako je MLPA. I když nalezneme patogenní mutaci, nemůžeme plně předpovědět fenotyp, jelikož rozsah mutace nemusí korespondovat s tíží pacientova postižení. Tato práce je zaměřena na popis některých mikrodelečních syndromů (jejich vznik a klinické rysy) a molekulárně cytogenetických metod používaných k jejich analýze.

Význam diagnostiky kryptických chromozomových přestaveb tkví především v možnosti potvrzení diagnózy pacienta i při variabilitě jeho fenotypu, dále v objasnění etiologie jeho onemocnění, tzn. zda se jedná o mutaci *de novo* či mutaci zděděnou, a v neposlední řadě pak správná diagnóza umožňuje dovést genetickou prognózu (výši rizika) a zvolit vhodnou prevenci (prenatální diagnostika u vysoce rizikových pacientů). Kryptické chromozomové přestavby se v populaci pravděpodobně vyskytují s významnou prevalencí, jen malá část z nich však působí svým nositelům klinické obtíže a ještě menší část bývá diagnostikována. Je-li určitá kombinace fenotypových znaků postiženého pacienta typická pro určitou kryptickou aberaci, ať už mutaci malého rozsahu či chromozomovou delecí, hovoříme o takzvaném mikrodelečním syndromu [1].

1.1 Mikrodeleční syndromy

Jedná se o syndromy způsobené chromozomální delecí či jinou mutací postihující různý počet genů, která je příliš malá pro detekci konvenčními cytogenetickými metodami. V závislosti na velikosti této delecce mohou být k její identifikaci využity jiné techniky, jako je FISH nebo další metody, založené na analýze DNA [2].

Této definici v zásadě vyhovuje většina mikrodelečních syndromů, jak je chápeme dnes. Mikrodelece jsou totiž jakýmsi přechodem mezi světelným mikroskopem rozpoznatelnými chromozomálními delecemi a jen sekvenováním

prokazatelnými bodovými mutacemi. Za jejich vznikem stojí pravděpodobně nerovnoměrný crossing-over při vzniku gamet. Kombinace konvenčních cytogenetických metod a užití molekulárních fluorescenčních sond zdokonalily a rozšířily jejich diagnostické možnosti, především však ukázaly jejich vysokou, a tedy klinicky významnou populační incidenci, která u jednotlivých syndromů dosahuje až 1 : 4 000 [1].

1.1.1 Syndromy asociované s mikrolecí chromozomu 22q11.2

Jednou z nejčastěji prokazovaných mikrolecí u nás i ve světě je delece v oblasti 22q11.2 (TDR – typical deleted region, v 90 % postihuje úsek o velikosti cca 3 Mb, vzácněji se jedná o proximální úsek o velikosti cca 1,5 Mb). Vzhledem k tomu, že mikrolece 22q11.2 postihuje až 40 genů, podmiňuje velmi širokou fenotypovou variabilitu (tíže postižení však nebývá úměrná velikosti delece). Syndrom podmíněný touto delecí popsal poprvé v roce 1968 profesor Angelo DiGeorge, americký pediatr s endokrinologickým zaměřením. **DiGeorgeův syndrom** (DGS, OMIM 188400) je charakterizován hypokalcemií způsobenou hypoplázií příštítných tělísek, dále hypoplázií thymu a vadami především výtokové části srdce. Engelen et al. udává prevalenci DGS 6,5 % u dospělých pacientů s Fallotovou tetralogií a 16,5 % mezi pacienty s PA/VSD (atrésie plicnice/defekt komorového septa). Ziolkowska et al. ve své studii s 214 pacienty s konotrunkální vadou srdce uvádí, že u pacientů s mikrolecí 22q11.2 se častěji objevují pooperační komplikace než u pacientů bez této delece [1, 4, 5, 7, 12].

Dalším častým znakem je rozštěp patra. Typická facies, která se zvyrazňuje zvláště ve druhé dekádě života, zahrnuje retrognacii nebo mikrognacii, protáhlý obličej, široký kořen nosu a úzké oční štěrby. Pacienti mohou mít normální intelekt (častěji prokázáno u proximální delece), obvykle však nacházíme abnormální mentální vývoj. Tito pacienti také často trpí poruchami chování a emocí a poruchami učení – ADHD (attention deficit hyperactivity disorder) je diagnostikována u třetiny až poloviny dětí s DGS. Častěji jsou u nich také pozorovány psychotické poruchy, jako je schizofrenie, a afektivní poruchy jako deprese a bipolární porucha. DGS je třetím nejsilnějším rizikovým faktorem pro rozvoj schizofrenie, v riziku je až 25 % pacientů s DGS, a naopak prevalence DGS mezi pacienty se schizofrenií se pohybuje kolem 1 %. Nejdůležitější roli zde

pravděpodobně sehrává haploinsuficience genu pro katechol-o-methyltransferázu (COMT), prolin dehydrogenázu (PRODH) a Gnb1L genu. Zajímavý je také zvýšený výskyt autismu u pacientů s DGS. Za fenotyp zřejmě odpovídá porucha migrace buněk neurální lišty do orgánů odvozených od žaberních oblouků a výchlipek. Jak jsem již zmínila výše, většina případů DGS je způsobena delecí 22q11.2 (DiGeorge syndrome chromosome region – DGCR). Spolu s několika dalšími geny je deletován i gen TUPLE1 (též HIRA), který pravděpodobně kóduje transkripční faktor, stejně jako gen TBX1, který zastává důležitou funkci ve formování orgánů a tkání během embryonálního vývoje a jehož haploinsuficience pravděpodobně hraje klíčovou roli v defektním utváření kardiovaskulárního systému a ve vývoji příštítných tělísek. Tato delece pak může podmiňovat různé fenotypy: Shprintzenův či velokardiofaciální syndrom (VCFS, OMIM 192430), Takaoův syndrom či izolované vady výtokové části srdce včetně Fallotovy tetralogie, transpozice velkých cév, společného arteriálního trunku a interupce aortálního oblouku. Pro všechny tyto fenotypy byl navrhnut společný akronym CATCH-22 (Cardiac abnormality, Abnormal facies, Thymic aplasia, Cleft palate, Hypocalcemia). Tohoto označení se však již příliš nevyužívá pro jeho negativní konotace (v Hellerově knize hrdina vždy doplatil na hlavu XXII – vojenské ustanovení, které umožňovalo a zároveň nedovolovalo odejít z armády) [1, 5, 6, 8, 9, 11].

Menší část případů DGS je způsobena delecí jiných chromozomů, zejména 10p14–p13 (OMIM 601362). Výskyt tohoto syndromu je většinou udáván 1 : 4 000 (mikrodelece 22q11), resp. 1 : 100 000 (mikrodelece 10p14–13). Celkový výskyt však pravděpodobně bude vyšší, část nedagnostikovaných pacientů bude zřejmě mezi dospělými s Fallotovou tetralogií a PA/VSD. Většina delecí vzniká *de novo*, jen cca 10 % je zděděných od jednoho z rodičů. Saitta et al. popsali dvě rodiny, u nichž byl DGS diagnostikován u probanda a následně u jeho synovce (1. rodina), resp. neteře (2. rodina), přičemž rodiče postižených dětí (sourozenci probandů) DGS netrpěli, ani u nich nebyla nalezena delece 22q11.2. Původní hypotéza, tedy že by za opakovaným výskytem mohl být germinální mozaicismus jednoho z rodičů, se tedy nepotvrdila [1, 3, 10, 13].

1.1.2 Williamsův-Beurenův syndrom

Dalším poměrně častým mikrodelečním syndromem je **Williamsův-Beurenův syndrom** (WBS, OMIM 194050) s výskytem 1 : 10 000. Poprvé ho popsali v padesátých letech minulého století Fanconi, Lightwood a Payne jako „idiopatickou infantilní hyperkalcémii s neprospíváním“. V tomto případě mikrodelece 7q11.23 zahrnuje elastinový gen (ELN), což vysvětluje alespoň část fenotypových projevů postižených pacientů plynoucí hlavně z méněcennosti pojivové tkáně – silné rty, makrostomie, periorbitální prosáknutí a především srdeční vady, které zaznamenáváme asi u 80 % pacientů (zejména se jedná o supraavlulární aortální, ale i vícečetné periferní pulmonální stenózy a defekt komorového septa), dále gen pro LIM-kinázu (LIMK1), který je silně exprimován v mozkové tkáni a jehož haploinsuficience má pravděpodobně rozhodující podíl na vzniku kognitivního deficitu, zvláště pak na vizuospeciální poruše (snížená schopnost prostorové představivosti, řešení geometrických úkolů). Dalším genem, jehož funkce bývá u pacientů s WBS narušena, je gen RFC2. Usuzuje se, že jeho delece může snižovat schopnost replikace DNA, což by mohlo odpovídat za růstovou retardaci, stejně jako za vývojové abnormality pacientů s tímto syndromem. Typická je rovněž hyperkalcémie v dětství, později bývá pozátěžová. Někdy se přidružují i vývojové vady ledvin. Obličeje pacientů s WBS jsou často přirovnávány k elfským tvářím. Pacienti mohou trpět mentálním deficitem, typicky jsou velmi přátelští [14–18].

Na fenotypu pacientů s WBS se podílí i další geny (celkem asi 28 genů), jejichž přesná funkce ještě není zcela známa, často se ale jedná o transkripční faktory. U myši byl například pozorován vliv delece genů GTF2I a GTF2IRD1, kódujících multifunkční transkripční faktory TFII-I a BEN, které leží v regionu 7q11.23 a které se podílejí na embryonálním vývoji nervové soustavy. Kromě neurovývojových vad se chybění těchto genů zřejmě podílí i na embryonální letalitě, na mozkových hemoragiích, na vaskulogenních a kraniofaciálních defektech a dalších poruchách vývoje neurální trubice [18, 22].

Studie jednovaječných dvojčat s WBS ukazují na konkordanci většiny klinických znaků, jako jsou srdeční vady a abnormality v chování pacientů, zatímco znaky, jako například porodní váha, vzrůst a stupeň mentální retardace, jsou z nemalé části ovlivněny faktory prostředí [14, 19].

Dospělí s WBS trpí především následky své srdeční vady a hypertenzí, ztrátou sluchu, subklinickou hypotyreózou, gastrointestinálními obtížemi a abnormalitami močového ústrojí. Kloubní kontraktury, kyfóza a skolióza omezují hybnost pacientů s WBS. Dále trpí vyšším výskytem psychiatrických obtíží, jako jsou úzkost a deprese. Schopnost samostatného života a zaměstnání bývá omezena jejich mentálním deficitem a fyzickými omezeními [1, 14].

1.1.3 Millerův-Diekerův syndrom

Výskyt 1 : 10 000 je udáván rovněž u **Millerova-Diekerova syndromu** (MDLS, OMIM 247200), který je charakterizován lissencefalií, mikrocefalií, vrásčitou kůží na čele, prominujícím záhlavím, bitemporálním zúžením od útlého věku, antimongoloidním zašikmením očních štěrbin, krátkým nosem s vyhlazeným frontonazálním úhlem, převislým horním rtem, malou bradou, srdečními malformacemi, hypoplázií mužského genitálu, růstovou a mentální retardací (IQ kolem 20) se záchvaty a abnormálním EEG. Očekávaná délka života je u takových pacientů velmi redukována, umírají většinou v časném dětství. Za fenotyp odpovídá terminální delecce 17p13.3, asi u 10 % rodin zaznamenáváme výskyt balancované translokace u jednoho z rodičů, tedy vysoké riziko narození dalšího potomka s tímto syndromem [1, 23].

1.1.4 Syndrom delecce 1p36

Syndrom delecce 1p36 (OMIM 607872) se někdy nesprávně nazývá Slavotínkův syndrom (lépe Slavotinkové syndrom, podle Dr. Anne Slavotinek, National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, Bethesda, USA). Typickými znaky jsou mikrocefalie, brachycefalie, prominující čelo s dlouho otevřenou velkou fontanelou, hypoplázie střední obličejové části, enoftalmus, obličejový rozštěp, výrazná dolní čelist a brada, dysplastické ušní boltce, porucha až ztráta sluchu, vrozená srdeční vada, hypotonie a porucha růstu. Délka života je výrazně zkrácena. Populační frekvence výskytu se shoduje s předchozími dvěma syndromy [1, 24].

1.1.5 Angelmanův syndrom

U **Angelmanova syndromu** (AS, OMIM 105830) s výskytem 1 : 15 000 se uplatňuje několik mechanismů vzniku. Přibližně 70 % případů je přisuzováno *de novo* vzniklé maternální deleci postihující úsek 15q11.2–q13, dalších cca 25 % případů je pravděpodobně následkem mutace genu UBE3A kódujícího ubiquitin-protein ligázu E3A, odhadem 2–3 % vyplývají z poruchy imprintingu a zbylá 2 % přisuzujeme paternální uniparentální dizomii (UPD) úseku 15q11.2–q13. Tento syndrom, nazývaný těž syndrom šťastné loutky (happy puppet syndrome), je charakterizován mentální retardací, těžkou poruchou řeči, náhlými výbuchy smíchu, záchvaty křečí, později topornou „loutkovitou“ chůzí. V obličeji je později nápadná makroglosie s prominencí úst, převislým nosem a špičatou bradou. Riziko početí dalšího potomka s tímto syndromem je asi u 5 % párů, kde se u jednoho z rodičů vyskytuje balancovaná translokace. Proto se doporučuje prenatální diagnostika [1, 25].

1.1.6 Cri-du-chat syndrom

Delece postihující krátké raménko chromozomu 5, konkrétně 5p15.2, ale vzácně i celé raménko či jeho značnou část (tehdy může být diagnostikována i běžným cytogenetickým vyšetřením), způsobuje **cri-du-chat syndrom** (OMIM 123450), resp. syndrom kočičího křiku, který nejspíše poprvé popsal francouzský pediatr Jérôme Lejeune (odtud také dnes již málo používané synonymní označení Lejeuneův syndrom) v roce 1963. Fenotypové charakteristiky u dětí jsou: mikrocefalie, oválný obličej, hypertelorismus, plošný glabelární hemangiom, mikrognacie, epikanty, nízko nasedající ušní boltce, hypotonie a těžká mentální a psychomotorická retardace (IQ se pohybuje kolem 30, chůze nastupuje až kolem 5. roku života, jednoduchá řeč se obvykle vyvíjí ještě později), asi u třetiny pacientů bývá přítomna srdeční vada. Vzácně se mohou vyskytovat vady nervového systému a ledvin, syndaktýlie, hypospadiie a kryptorchizmus. Jedním z nejvýraznějších znaků u takto postižených novorozenců je však pronikavý křik podobný kočičímu. Geny Semaphorin F (SEMAF) a δ -catenin (CTNND2) se zřejmě podílejí na vývoji mozku, jejich delece tedy pravděpodobně podmiňuje mentální retardaci u pacientů s tímto

syndromem. Delece hTERT genu, který kóduje telomerázovou reverzní transkriptázu, zřejmě rovněž přispívá k fenotypu těchto pacientů.

Incidence tohoto syndromu se pohybuje mezi 1 : 20 000 až 1 : 50 000. Prognóza pacienta závisí na stupni hypotonie a závažnosti případné srdeční vady. Dospělí s tímto syndromem mívají trojúhelníkovitý obličej a štíhlou postavu. Již kolem 20. roku života se mohou objevovat presenilní projevy, a to zejména cerebrální komplikace. Balancovaná translokace u jednoho z rodičů se vyskytuje asi v 10 % případů. Prenatální diagnostika je možná [1, 26, 27].

1.1.7 Praderův-Williho syndrom

V roce 1956 Andrea Prader a Heindrich Willi spolu s dalšími kolegy popsali syndrom, který se již prenatálně projevuje malou aktivitou plodu, často abnormální polohou plodu, méně často se vyskytuje polyhydramnion. Novorozenci jsou hypotoničtí, což jim způsobuje dýchací obtíže, mají vyšší riziko aspirace, porušený příjem potravy a neprospívají, později se rozvíjí hyperfagie a z toho vyplývající obezita. Dalšími znaky jsou: mentální retardace, malý vzrůst, hypogonadismus, strabismus, akromikrie, skolióza, opožděný vývoj řeči, poruchy spánku, opožděná puberta, poruchy učení, infertilita, častější výskyt diabetu mellitu II. typu. Asi u 10 % pacientů je přítomna srdeční vada. Klinická prognóza **Praderova-Williho syndromu** (PWS, OMIM 176270) značně souvisí s prevencí vývoje adipozity. Mentální úroveň odpovídá IQ kolem 50 až 60, asi v 5 % případů je intelekt nedotčen. Genetická prognóza vlastní reprodukce udává 50% pravděpodobnost přenosu na potomstvo. Pouze u cca 1–3 % rodin je zjištěna genetická přestavba u jednoho z rodičů, riziko pro sourozence postižených dětí je proto poměrně malé. Populační frekvence PWS činí asi 1 : 25 000. V 70 % případů je projevem intersticiální paternální mikrodelece úseku 15q11–q13 a v cca 30 % důsledkem maternální uniparentální dizomie nebo bodové mutace [1, 28, 29].

1.1.8 Smithové-Magenisové syndrom

Smithové-Magenisové syndrom (SMS, OMIM 182290) je podmíněn intersticiální delecí chromozomu 17p11.2 (většinou *de novo*) či mutací RAI1 genu (OMIM 607642), jenž leží mimo tento region. Překrývající se klinické znaky

můžeme rovněž nalézt u syndromu Potocki-Lupski (PTLS, OMIM 610883), který je způsoben duplikací úseku 17p11.2. Výskyt syndromu se odhaduje na 1 : 25 000. U novorozenců můžeme sledovat poruchy poporodní adaptace, prvním příznakem ale může být až psychomotorická a růstová retardace, později pak poruchy spánku a chování. V noci bývají děti aktivní až těkavé, přes den pak spavé, asi 75 % bývá autoagresivní, vzácně agresivní vůči okolí. K fenotypovým znakům patří brachycefalie, maxilární hypoplázie, plochý obličej a lehká zraková vada. Myopie se však s věkem může zhoršit až na hodnoty kolem -20 D, při sebezraňování na hlavě pak může dojít k odchlípení sítnice. V některých případech se vyskytuje brachydaktýlie, chraplavý hlas, opoždění řeči, někdy doprovázené ztrátou sluchu. Životní prognóza je dobrá. Srdeční vada se vyskytuje asi u 10 % pacientů s tímto syndromem a bývá dobře korigovatelná. Genetická prognóza představuje 50% riziko pro potomky postižených pacientů, ale pouze minimální riziko pro další sourozence těchto pacientů [1, 30, 31].

1.1.9 Jacobsenové syndrom

V roce 1973 popsala dánská lékařka Petra Jacobsen syndrom, který se projevuje růstovou a psychomotorickou retardací, trigonocefalií, divergentním intermitentním strabizmem, epikanty, širokým kořenem nosu s antevertovanými nostrilami, „kapřím“ horním rtem, retrognacií, nízko posazenými dysplastickými ušními boltci, kamptodaktýlií (trvale ohnuté prsty), kladívkovitými prsty a autoimunní trombocytopení. Do obrazu **Jacobsenové syndromu** (JBS, OMIM 147791) může dále spadat: srdeční anomálie (2/3 pacientů), novorozenecká hypotrofie a hypotonie, hypertelorismus, ptóza, vkleslý kořen nosu, brachymikrocefalie, brachydaktýlie a klinodaktýlie 5. prstu na rukou. Mentální retardace bývá spíše mírná, takže vlastní reprodukce je možná, ovšem s 50% rizikem pro potomstvo. U cca 10 % postižených dětí je jeden z rodičů nositelem balancované translokace. Syndrom je způsoben terminální delecí 11q23. Populační frekvence syndromu je udávána kolem 1 : 25 000, předpokládá se ale, že část postižených s tímto syndromem není vůbec diagnostikována, frekvence tedy může být i vyšší [1, 32, 33].

1.1.10 Wolfův-Hirschhornův syndrom

Wolfův-Hirschhornův syndrom (WHS, OMIM 194190), známý též jako syndrom delecce 4p (4p16.3) poprvé popsali v roce 1961 američtí lékaři Herbert L. Cooper a Kurt Hirschhorn. Světovou pozornost ale vzbudila až publikace Ulricha Wolfa, Kurta Hirschhorna a spolupracovníků v německém odborném časopise *Humangenetik* v roce 1965. Existují i formy s rozsáhlou delecí, převažují však formy mikrolečnické (podobně jako u cri-du-chat syndromu). Syndrom je charakteristický těžkou růstovou a mentální retardací, hypotonií, mikrocefalií, rozštěpovými vadami (rozštěp patra, kolobomy očí, srdeční septální defekty). O obličejích těchto pacientů se říká, že mají vzhled přílby řeckého bojovníka. Pacienti často trpí divergentním strabizmem, mívají hypertelorismus, převislou špičku nosu, krátký horní ret a filtrum, malou bradu, nízko posazené, dopředu rotované ušní boltce a kraniální asymetrii. Další prognóza závisí především na přítomnosti a rozsahu srdeční vady (vyskytuje se zhruba u poloviny pacientů). Pro sourozence je riziko opakování syndromu asi 10 %. Prenatální diagnostika je tedy plně indikovaná. Syndrom se vyskytuje s četností cca 1 : 30 000 [1, 34–36].

1.1.11 Ostatní

Mikrolečnických syndromů samozřejmě existuje mnohem více (například Albrightova osteodystrofie, Rubinsteinův-Taybiho syndrom, Diamond-Blackfanova anémie, X-vázaná ichtyóza, Kallmanův syndrom, syndrom WAGR a další), jejich výskyt je však již velmi vzácný a vyšetření u většiny z nich rozhodně nepatří mezi rutinní. Princip vyšetření ovšem zůstává stejný jako u předchozích syndromů. Jejich diagnostika se provádí jen na malém počtu pracovišť [1].

1.2 Metodické možnosti vyšetřování mikrodelečních syndromů

Některé z těchto kryptických chromozomových delecí lze identifikovat pouze speciálními cytogenetickými metodami s vysokým rozlišením. Výrazné rozšíření diagnostického spektra však přinesly až molekulárně cytogenetické metody využívající fluorescenční *in situ* hybridizace.

Převážná většina mikrodelečních syndromů je důsledkem ztráty určitého chromozomálního úseku, představující blok několika genů. Tyto ztráty se mohou týkat terminálních úseků krátkých či dlouhých ramének, intersticiálních nebo subtelomerických úseků. Takové delece lze prokázat FISH metodami. Mikrodeleční syndromy však mohou vznikat i v důsledku uniparentální izo- či heterodizomie (viz Angelmanův a Prader-Williho syndrom), k jejich průkazu jsou pak nezbytné molekulárně genetické metody jako analýza STR (short tandem repeat), metoda metylační analýzy a poměrně nová metoda MS-MLPA (methylation sensitive-multiplex ligation-dependent probe amplification). Jedná-li se o bodové mutace (ztrátu či záměnu jen jedné či několika bází), musíme k jejich identifikaci využít jiných speciálních molekulárně biologických metod (např. sekvenování kritického úseku). Praktickým důsledkem pro diagnostiku mikrodelečních syndromů je nemožnost vyloučení uvažované diagnózy při negativním výsledku FISH metody a z toho vyplývající důsledky pro genetické poradenství, neboť bodové mutace vznikají v převážné většině *de novo*. Terminální mikrodelece mohou být až v deseti procentech důsledkem nebalancované translokace a vyšetření rodičů (s případnou balancovanou translokací) je tedy absolutně indikované. U pacientů s intersticiálními mikrodelecemi je translokace, inverze či jiná chromozomální aberace u některého z rodičů zjišťována asi v 1–2 %. [1, 37].

1.2.1 Základní (klasické) cytogenetické vyšetření

Klasické vyšetření, ať už běžným světelným, či fluorescenčním mikroskopem, má opodstatnění při analýze karyotypových abnormalit, tedy pro zjištění odchylek od normálního diploidního stavu, popřípadě může odhalit větší chromozomové přestavby jako velké delece (např. celých ramének či jejich velké části), duplikace a další nápadné aberace. Pro jejich identifikaci používáme zpravidla takzvané pruhovací metody. Nejčastější technikou je G-pruhování, při němž na

chromozomy krátce působíme trypsinem a poté je obarvíme v roztoku Giemsa-Romanowski. Vzácněji (většinou jen k doplnění vyšetření) aplikujeme jiné pruhovací metody, jako například R-pruhování, C-pruhování nebo Q-pruhování (bližší popis viz [38], [39], [43]). Při mikroskopické analýze takto pruhovaných chromozomů se obrázky jednotlivých mitóz (metafázních jader) snímají kamerou řízenou speciálním počítačovým systémem. S pomocí příslušného softwaru pak zkušený cytogenetik provede závěrečné složení a vyhodnocení karyotypu. Pro diagnostiku mikrolečnicích syndromů se toto vyšetření tedy nehodí, ale jeho význam tkví právě ve vyloučení větších chromozomových přestaveb [38–40].

1.2.1.1 Metoda HRT

Pro strukturní přestavby menšího rozsahu můžeme využít metodu HRT (zkratka z anglického High Resolution Technique). Jedná se o speciální kultivační techniku, která umožňuje získat prometafázní chromozomy. Ty se dále barví jako při běžném mikroskopickém vyšetření. Na méně kondenzovaných prometafázních chromozomech lze pozorovat jemnější detaily, což umožní odhalit i menší přestavby. Přesto se ale v diagnostice mikrolečnicích syndromů používá poměrně málo, větší význam mají citlivější molekulárně cytogenetické metody [39, 41].

1.2.2 Molekulárně cytogenetické metody

Posuneme-li se o úroveň níže, totiž až na úroveň molekulární, získáme daleko širší možnosti analýzy chromozomových přestaveb, a to dokonce i těch, které nazýváme kryptické. Jednotlivé molekulárně cytogenetické metody se ve své citlivosti liší. Jejich základní principy shrnuji v následujícím textu.

1.2.2.1 FISH

Prvenství ve využití *in situ* hybridizace nejspíš náleží Pardueové a Gallovi, kteří už v roce 1970 publikovali práci, kde využili *in situ* hybridizaci k vizualizaci repetitivních sekvencí v centromerických oblastech myších chromozomů. Použité sondy však nebyly značeny fluorescenčně, nýbrž radioaktivně. Fluorescenčně značené sondy se používají od roku 1988, v současnosti je FISH jednou

z nejběžnějších metod používaných v rutinní diagnostice v cytogenetických laboratořích [39].

Techniky založené na *in situ* hybridizaci (ISH) umožňují průkaz specifických sekvencí nukleových kyselin v chromozomech, buňkách či tkáňových řezech. Pojmu hybridizace užíváme pro komplementární spojení dvou vláken různého původu, v tomto případě vyšetřované DNA a sondy. *In situ* znamená, že k hybridizaci nevyužíváme dvě separované molekuly DNA, ale jak již bylo řečeno výše, cílová (vyšetřovaná) nukleová kyselina je stále přítomna v původním biologickém vzorku. To je výhodné, chceme-li nejen potvrdit přítomnost specifického úseku ve vzorku, ale i určit jeho lokalizaci (tímto způsobem můžeme například detekovat RNA transkripty nebo virové nukleové kyseliny v cytoplazmě buněk).

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) v sobě zahrnuje několik důležitých kroků. Zaprvé denaturaci vyšetřované DNA a uměle připravené fluorescenčně značené DNA o známé sekvenci, takzvané sondy. Ta musí být v nadbytku. Poté následuje renaturace, resp. reasociace DNA, kdy předpokládáme navázání sondy na komplementární úsek vyšetřované DNA (je-li přítomen), tedy vlastní hybridizace. Odmytí nadbytečných nenavázaných sond a konečně pozorování hybridizačního signálu ve fluorescenčním mikroskopu. Přítomnost tohoto signálu značí, že vyšetřovaná DNA obsahuje kritický region, s nímž použitá sonda hybridizuje. Nevylučuje však přítomnost např. bodové mutace v tomto regionu, respektive nezaručuje správnou funkci sledované sekvence. Úsek tedy může být přítomen, může však nastat situace, kdy nebude fungovat např. regulace genové exprese na tomto úseku nebo přepisované části budou mít abnormální funkci, což se klinicky může projevit stejně, jako by celý úsek chyběl. Nález hybridizačního signálu nám tedy neříká, že je pacient zdravý, ale opravňuje nás pouze ke konstatování, že mikrolečňní syndrom nelze potvrdit (ale ani vyvrátit). Chybění signálu je naopak přesvědčivým důkazem mikrolece. [42, 43].

Sonda, tedy uměle připravený úsek nukleové kyseliny s navázaným barvivem (přímé značení) či haptenem, na který se později naváže značená protilátka (nepřímé značení), bývá nejčastěji připravována klonováním prostřednictvím vektorů (plazmidy, kosmidy, bakteriofágy či umělé kvasinkové chromozomy) nebo prostou amplifikací genomové DNA metodou polymerázové řetězové reakce – PCR (viz níže). Obecně platí, že čím delší sonda, tím výraznější signál, ale bohužel také pomalejší hybridizace a vyšší riziko, že po navození reasociačních podmínek dojde

ke spojení dvou původních vláken vyšetřované DNA a sonda se vůbec nenaváže. Pokud se naváže, hrozí pro změnu nebezpečí, že nezachytíme delece menšího rozsahu. Příliš krátké sondy zase nezaručují dostatečně silný signál, navíc se zmenšující se sondou stoupá pravděpodobnost výskytu stejných komplementárních sekvencí na více místech vyšetřované nukleové kyseliny. Je tedy nutné zvolit kompromis tak, aby sonda poskytovala dostatečný signál a přitom nesnižovala specificitu vyšetření. Rutinně se tedy používají sondy o velikosti několika kb až jednoho Mb, které se naštěpí na menší fragmenty o velikosti cca 200–400 bp. Sondy se dále dělí podle charakteru cílových sekvencí, a to na satelitní, lokus-specifické a celochromozomové, resp. malovací sondy.

K nejčastěji používaným sondám patří satelitní sondy, z nichž většinu tvoří sondy centromerické. Jsou většinou tvořeny α -satelitními sekvencemi repetitivní DNA přítomnými v oblasti centromer. Využívají se zejména k rychlé detekci numerických aberací, zejména v nedělicích se buňkách.

Lokus-specifické sondy (ne zcela přesně označované jako genové) se váží na jedinečné sekvence na chromozomech (např. geny, jejich části nebo naopak skupiny genových lokusů). Využívají se zejména ke stanovení kryptických strukturálních změn, jako jsou mikrolece nebo mikroamplifikace.

Celochromozomové sondy (malovací) se připravují jako směs fragmentů DNA hybridizujících s různými lokusy jednoho konkrétního chromozomu. Díky jejich současné aplikaci dojde k označení téměř celého chromozomu. Využívají se pro určení některých rozsáhlejších interchromozomálních přestaveb, zejména translokací. Signály těchto sond lze hodnotit jen na chromozomech v metafázi a pro analýzu interfázních jader je nelze v běžné praxi použít. Zvláštním případem aplikace malovacích sond je metoda M-FISH.

K vizualizaci hybridizačního signálu poté potřebujeme fluorescenční mikroskop, který se od klasického světelného mikroskopu liší zdrojem světla, tím je zde rtuťová výbojka emitující záření blízké UV spektru, excitačními filtry a bariérovým filtrem, který usměrňuje záření emitované fluorescenčním barvivem navázaných sond. K označení sond můžeme použít např. FITC (fluorescein-*-isothiokyanát*), který pozorujeme jako zelený signál, TRITC (tetramethylrhodamin), který pozorujeme jako červený signál, ale i další barviva. K nespecifickému obarvení neboli podbarvení (tzv. counterstaining) všech vřetřovaných chromozomů, resp.

interfázních jader používáme nejčastěji DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) a PI (propidium iodide) [39, 43].

Shrnutím a doplněním předešlého textu týkajícího se fluorescenční *in situ* hybridizace se dostáváme k základnímu protokolu FISH, který vypadá následovně:

- a) **Příprava vzorku** – zpracováváme-li dělicí se buňky (kultivované lymfocyty, amniocyty či jiné), musíme je nejprve hypotonizovat, fixovat a nakapat na podložní sklíčka podle standardního postupu. Tato skla pak dehydratujeme vzestupnou alkoholovou řadou. Pokud zpracováváme nekultivované tkáně, používáme jemné mechanické, popřípadě enzymatické degradace tkáně a buněčných membrán, proteolytickými enzymy se snažíme odstranit zbytky cytoplazmy. Další postup je shodný s přípravou vzorku dělicích se buněk.
- b) **Aplikace sondy** – sondu zpravidla přidáváme na dehydratované podložní sklíčko. V některých protokolech se však sonda denaturuje odděleně a teprve pak se aplikuje na vzorek.
- c) **Denaturace sondy a cílové DNA** – v přítomnosti organického rozpouštědla formamidu dochází k denaturaci již při cca 75–80 °C, bez něj by bylo zapotřebí zahřát vzorek až na 90–95 °C. Někdy se denaturace sondy a cílové DNA provádí odděleně.
- d) **Hybridizace v termostatu při 37 °C** – podle typu sondy probíhá 30 minut až 24 hodin, někdy i déle.
- e) **Odstranění nespecifických signálů** – abychom mohli pozorovat hybridizační signály pouze na specifických lokusech, je nutné odmyt sondy, které jsou ve vzorku buď volné, nebo navázané na místech, k nimž nejsou zcela komplementární. K tomu používáme horký pufrovaný solný roztok (SSC) o nízké iontové síle (při teplotě 80–95 °C) nebo 50% roztok formamidu o teplotě 40–50 °C.
- f) **Detekce a amplifikace signálů** – provádí se pouze u nepřímo značených sond. Jsou-li značené biotinem, aplikujeme avidin konjugovaný s FITC, k amplifikaci pak protilátky proti avidinu konjugované s biotinem.
- g) **Obarvení chromozomů a interfázních jader (counterstaining)** – zpravidla používáme DAPI nebo PI (viz výše).

- h) **Prohlídka a vyhodnocení hybridizačních signálů** – pomocí fluorescenčního mikroskopu vybaveného CCD kamerou. S pomocí kamery se obraz v mikroskopu převádí do počítače a zpracovává speciálním počítačovým programem.

Tento protokol lze považovat za obecně platný, ač existuje v mnoha drobných modifikacích. Konkrétní a přesný protokol by měl vždy poskytnout výrobce sondy [39, 42, 43].

1.2.2.2 CGH

Na rozdíl od klasické FISH při komparativní genomové hybridizaci hybridizujeme vyšetřovanou DNA, izolovanou z jakékoli tkáně, s metafázními chromozomy normálního zdravého člověka. Spolu s touto vyšetřovanou DNA však na stejné metafázní chromozomy aplikujeme také DNA zdravého člověka. Každá DNA (od zdravého člověka a od pacienta) je značena jiným fluorescenčním barvivem. Pokud u pacienta nedošlo k delecí či amplifikaci některého chromozomového segmentu, měly by obě DNA se stejnou pravděpodobností hybridizovat s příslušnými komplementárními úseky na chromozomech. Proto by pak všechny chromozomy měly být rovnoměrně „obarveny“ oběma barvivy, která byla použita ke značení výchozích vzorků DNA. Převažuje-li ale na určitém místě jedno z barviv, pak můžeme usuzovat na delecí či amplifikaci vyšetřované DNA. Nevýhoda metody tkví v nemožnosti hodnocení balancovaných přestaveb. V současné době se CGH hojně využívá v nádorové genetice, lze ji však aplikovat i při vyšetření kryptických aberací u mikrolečních, resp. mikroduplikačních syndromů [39, 43].

1.2.2.3 Array CGH

K hodnocení submikroskopických aberací byla na základě předešlé metody vyvinutá nová, mnohem citlivější metoda, totiž array CGH. Princip zůstává stejný, namísto interfázních chromozomů však hybridizujeme vyšetřovanou DNA i referenční DNA od zdravého jedince na sklíčko (čip) s velkým počtem malých úseků normální DNA, z nichž každý odpovídá určitému genu nebo jeho části. Tyto úseky DNA (mající funkci sond) jsou na sklíčku nanášeny v malých tečkách a každý

zde má své přesné místo. Výsledkem vyšetření zdravého člověka by opět mělo být rovnoměrné rozdělení barev ve všech částech skla. Převažuje-li v některém bodě jen jedna barva, pravděpodobně se jedná o delecii či amplifikaci vyšetřované DNA. Výsledky hybridizace jsou skenovány a vyhodnocovány počítačovým programem. Metoda se opět hojně využívá nejen v onkogenetice, ale v současnosti proniká do všech ostatních oborů klinické genetiky. Je jen otázkou času, kdy se stane běžnou složkou rutinně prováděných vyšetření. Širšímu praktickému využití zatím brání zejména její poměrně velká finanční nákladnost. [39, 43, 44].

1.2.2.4 Metody založené na PCR

Polymerázová řetězová reakce je molekulárně biologická metoda enzymatické replikace DNA *in vitro* bez použití živých organismů. Jako templát používáme malé množství DNA, to je pak v průběhu cyklické reakce o třech teplotních fázích exponenciálně amplifikováno. Za tento objev byl v roce 1993 oceněn americký biochemik Kary Banks Mullis Nobelovou cenou [43].

K provedení reakce jsou (kromě vlastního templátu DNA) nezbytné dva oligonukleotidové primery, které ohraničují začátek a konec oblasti určené k amplifikaci. Dalšími nezbytnými složkami reakční směsi jsou Taq DNA polymeráza (nebo jiná tepelně odolná DNA polymeráza), která je schopna syntetizovat komplementární vlákno podle templátu jednovláknové DNA, dále deoxyribonukleotid-trifosfáty, jež slouží jako stavební kameny nových DNA řetězců, a pufrální složky sloužící k udržení pH. Reakce obvykle začíná úvodní denaturací templátové DNA, která probíhá při cca 94–98 °C po dobu několika minut. Poté následuje 20 až 35 cyklů. V každém cyklu nejprve po dobu 10 sekund až 2 minuty denaturujeme DNA při uvedené teplotě. Poté následuje nasedání primerů, neboli annealing, tato fáze trvá cca 15 sekund až minutu a vyžaduje teplotu asi o 5 °C nižší, než je vypočítaná teplota tání primerů. Nakonec nastává fáze prodlužování vláken, tedy elongace, tedy je teplota závislá na použité DNA polymeráze a pohybuje se v rozmezí 68–72 °C. Doba je rovněž specifická pro polymerázu a rovněž závisí na délce amplifikovaného fragmentu, obvykle ale činí 20 sekund až minutu. Celá reakce je pak zakončena závěrečnou elongací, při níž dochází k dokončení syntézy neúplných řetězců. Trvá cca 3 až 15 minut, někdy i déle [43, 45].

Výsledek PCR amplifikace lze detekovat pomocí elektroforézy v agarózovém či polyakrylamidovém gelu. Pokud primery nasedaly jen na vybraná protisměrně umístěná místa, vznikly jako produkt reakce pouze amplikony o stejné sekvenci a délce. Tyto úseky v gelu doputují stejně daleko a vytvoří tedy jeden pruh. Pokud se nezobrazí žádný pruh, reakce neproběhla. Je-li pruhů více, znamená to, že primery nasedaly na různých místech, které byly shodou okolností také orientovány protisměrně, tudíž došlo k amplifikaci více produktů [43].

Tato metoda má mnoho modifikací, např. **Real-time PCR**, kdy měříme vzrůstající množství DNA po každém cyklu.

Asymetrická PCR je modifikace, která umožňuje preferenční syntézu jenom jednoho vlákna z dvojvláknové DNA tím, že jeden z primerů je v asi stonásobném nadbytku. Po vyčerpání druhého primeru se amplifikuje už jen jedno vlákno.

Nested PCR je vysoce citlivá metoda, která využívá vnějších a vnitřních primerů, a to tak, že nejprve probíhá asi 15–30 cyklů s jedním párem tzv. vnějších primerů, poté následuje dalších 15–30 cyklů s vnitřními primery, které jako templát využívají DNA produkty z první fáze. Výhoda metody spočívá v tom, že umožňuje detekovat i jedinou molekulu templátové DNA.

Multiplex PCR je varianta, kdy do reakční směsi přidáváme několik párů primerů, ty rozpoznávají několik rozdílných cílových sekvencí. Tím získáváme možnost amplifikovat a detekovat několik PCR produktů současně v jedné reakční směsi. Výhoda spočívá v nižších finančních nákladech než při samostatných reakcích s jedním amplifikačním produktem. Metoda se tedy hojně užívá pro vyhledávání změn na dlouhých úsecích DNA, testování vzájemně nesouvisajících oblastí na DNA a zejména pro amplifikaci vnitřních kontrol současně se vzorky [43].

Některé protokoly založené na Multiplex PCR neamplifikují přímo určité úseky zkoumané DNA, ale sondy, které se k nim předtím navázaly. Příkladem kombinace multiplex PCR a hybridizačních technik je metoda **MLPA** – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification. Princip je poměrně jednoduchý. Vyšetřovaná DNA je v roztoku hybridizována s několika sadami sond, přičemž každá sada obsahuje dvě sondy a vyšetřuje jeden úsek DNA. První sonda z této dvojice se skládá ze sekvence komplementární k části vyšetřované DNA (20–30 nukleotidů) a ze sekvence komplementární k univerzálnímu primeru Y. Druhá sonda rovněž obsahuje sekvenci komplementární k cílové DNA (25–43 nukleotidů), ovšem k úseku, který sousedí s komplementárním úsekem první sondy, dále obsahuje tzv.

stuffer segment – různě dlouhý úsek (19–370 nukleotidů), který je důležitý pro vzájemné odlišení amplifikovaných segmentů. Její poslední část je komplementární k univerzálnímu primeru X. Je-li vyšetřovaný úsek DNA bez aberací, obě sondy s ním hybridizují v těsné blízkosti a mohou být spojeny ligázou. Tím je vytvořena spojitá sekvence nukleotidů, z obou stran ohraničená úseky komplementárními k univerzálním primerům. Taková sekvence pak může být amplifikována. Pokud ale na vyšetřované DNA došlo k delecí či jiné mutaci, sondy se nemají kam navázat nebo nevytvoří souvislou komplementární sekvenci k vyšetřované DNA, k ligaci nedojde a při následné PCR nevznikne amplifikační produkt.

Kvantitativní analýza produktů PCR se provádí zpravidla po separaci pomocí kapilární elektroforézy na sekvenátoru. Množství amplifikovaných úseků DNA poměrně odpovídá původnímu počtu kopií vyšetřovaného úseku DNA. Výsledky se zaznamenávají v podobě píků (vrcholů) odpovídajících jednotlivým sondám, resp. jejich amplifikačním produktům. Při závěrečném vyhodnocení srovnáváme jejich výšku, plochu a délku.

Obecný postup u MLPA je následující:

- a) **Denaturace** – nejdříve je nutné denaturovat vyšetřovanou DNA (20–500 ng) při teplotě 98 °C cca 5 min.
- b) **Hybridizace sond** – necháme DNA hybridizovat se sondami v přítomnosti speciálního pufru, směs pečlivě zamícháme a inkubujeme asi minutu při 95 °C a dalších cca 16 hodin při 60 °C.
- c) **Ligace** – směs zchladíme na 54 °C a přidáme ligázu, tuto teplotu ponecháme 15 min, dále na 5 min zahřejeme na 98 °C.
- d) **PCR** – reakční směs zředíme speciálním puforem a vodou podle pokynů výrobce. Při teplotě 60 °C přidáme DNA polymerázu, čímž zahájíme polymerázovou řetězovou reakci, 35 cyklů, podmínky jednoho cyklu: 30 s při 95 °C, 30 s při 60 °C a 60 s při 72 °C, na závěr inkubujeme 20 min při 72 °C.
- e) **Separace a amplifikace produktů elektroforézou**
- f) **Analýza dat**

Pro různé sady se mohou protokoly lišit. Konkrétní protokol by měla vždy poskytnout společnost dodávající MLPA sondy do genetických laboratoří [46–48].

2. Cíl práce

Cílem mé práce je shrnout současné poznatky o vzniku, výskytu a analýze kryptických aberací se zaměřením na mikrodelece.

Uvést alespoň základní fenotypové charakteristiky pacientů trpících některými mikrodelečními syndromy a porovnat je s výsledky analýzy vybrané skupiny pacientů pomocí metody FISH.

Na základě obecných charakteristik porovnat metody FISH a MLPA , shrnout jejich výhody a nevýhody z pohledu analýzy kryptických aberací, zejména pak mikrodelecí.

Experimentální část práce (analýzy FISH) jsem provedla v molekulárně cytogenetické laboratoři ÚBLG 2. LF UK a FN Motol. Laboratorní vyšetření pacientů proběhla v rámci grantového projektu Interní grantové agentury (IGA) Ministerstva zdravotnictví České republiky číslo NR/9457-3: Optimalizace molekulárně cytogenetické a molekulárně genetické diagnostiky chromozomálních změn u pacientů s mentální retardací.

3. Experimentální část

3.1 Soubor pacientů

Do souboru pacientů jsem zařadila jedenáct pacientů s podezřením na mikrodeleci 22q11.2 a sedm pacientů s podezřením na mikrodeleci 7q11.23. V tabulce uvádím věk pacientů v době vyšetření a jejich fenotyp.

Tab. 1. Soubor pacientů s podezřením na mikrodeleci 22q11.2

číslo pacienta	věk v době vyšetření	fenotyp
1	25 let	operovaný rozštěp patra, faciální dysmorfie typická pro VCFS
2	1 rok	srdeční vada, mírná orofaciální stigmatizace (širší hřbet nosu, níže posazené, dysplastické ušní boltce)
3	19 dní	srdeční vada, ageneze thymu
4	4 měsíce	srdeční vada, aplázie thymu
5	5 let	PMR, imunodeficience, chronické respirační infekty, srdeční vada, dysplastické ušní boltce, nízká vlasová hranice, širší nos
6	9 let	operovaná srdeční vada, lehká mozková dysfunkce, deficit buněčné imunity
7	13 měsíců	atrézie jícnu, srdeční vada, protrahovaná sepse, porucha buněčné imunity
8	13 let	srdeční vada, faciální dysmorfie (hypertelorismus, mongolidní slant očních štěrbin, hypoplastická dolní čelist)
9	5 dní	srdeční vada, faciální stigmatizace (nápadný nos, široký kořen nosu, menší brada)
10	9 let	autismus, faciální stigmatizace, nedoslýchavost, srdeční vada, rozštěp patra, porucha imunity
11	3 dny	níže posazené dysplastické ušní boltce, mikromandíbula, srdeční vada, snížená hladina vápníku

Pozn.: pacientka č. 1 je matkou pacienta č. 2.

Tab. 2. Soubor pacientů s podezřením na mikrodeleci 7q11.23

číslo pacienta	věk v době vyšetření	fenotyp
1	4 roky	mentální retardace, porucha řeči, srdeční vada
2	5 let	srdeční vada, PMR, malý vzrůst, mikrocefalie, kariézní chrup
3	7 měsíců	lehká faciální stigmatizace (masivní horní ret, antevertované nostrily), srdeční vada
4	40 let	PMR, v dětství idiopatické hyperkalcémie
5	3 roky	srdeční vada, výrazné rty
6	1 rok	srdeční vada, hydronefróza, výrazná hypotonie, PMR, orofaciální stigmatizace
7	6 měsíců	srdeční vada, mírná faciální stigmatizace

Pozn.: konkrétní vrozené vývojové vady srdce a velkých cév, které jsou pro oba syndromy typické, jsou v tabulkách 1 a 2 zjednodušeně nahrazeny termínem „srdeční vada“.

3.2 FISH

Princip a postup metody FISH jsem nastínila již v teoretickém úvodu, nyní uvedu konkrétní protokol, podle kterého probíhala analýza vzorků od osmnácti pacientů vyšetřených pro suspektní mikrodelece 22q11.2 a 7q11.23.

Na analýzu FISH používáme čerstvě připravené, nativní preparáty z periferních lymfocytů stimulovaných fytohemaglutininem. Cytogenetické preparáty připravujeme z fixovaných buněčných suspenzí, které nakapeme na speciálně připravená podložní skla.

3.2.1 Příprava roztoků

- Pro přípravu roztoků je nezbytný základní roztok 20x SSC, který připravujeme tak, že navážíme:

175,3 g NaCl,

88,2 g dihydrátu citrátu sodného ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)

do 900 ml destilované vody.

Přes noc uskladníme v chladničce, druhý den změříme pH a upravíme na hodnotu 7. Celkový objem doplníme na 1 l. Na roztok napíšeme název roztoku, datum výroby a přesný čas, složení roztoku, jméno laboranta, který roztok připravoval, a za jakých podmínek. Skladujeme při laboratorní teplotě maximálně 6 měsíců (dle manuálu společnosti Abbott-Vysis).

- 2x SSC

Roztok připravíme ze:

100 ml 20x SSC (pH = 7),

850 ml destilované vody.

Přes noc uskladníme v chladničce, druhý den změříme pH a upravíme na hodnotu 7. Celkový objem doplníme na 1 l. Roztok označíme dle výše uvedených podmínek. Skladujeme při laboratorní teplotě maximálně 6 měsíců (dle manuálu společnosti Abbott-Vysis).

- 0,4x SSC s 0,3 % detergentem

Před přípravou roztoku je třeba zahřát Igepal CA-630 a Aqua pro injectione. Obě reagentie necháme temperovat na laboratorní teplotu 18–25 °C na nerezovém stole v přípravně cca 1 hodinu, nejméně však 30 minut.

Připravíme roztok z:

2 ml 20x SSC (pH=7),

95 ml Aqua pro injectione,

300 µl Igepal CA-630.

Tři hodiny promícháváme na nejvyšší otáčky na magnetickém míchadle a pak uložíme přes noc do chladničky. Ráno po zahřátí roztoku na laboratorní teplotu 18–25 °C promícháme 15 min při stejných otáčkách na magnetickém míchadle a na pH metru změříme při laboratorní teplotě pH. Pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové (36%) a 5M NaOH upravíme pH na 7,0–7,5. Vodou (Aqua pro injectione) doplníme celkový objem na 100 ml. Takto připravený roztok tepelně

ošetříme v teplotní skříni při 110–130 °C 20 min. Po vychladnutí uskladníme roztok v chladničce při 2–8 °C. Roztok označíme dle výše uvedených podmínek. Roztok je možné skladovat nanejvýš 6 měsíců (dle manuálu společnosti Abbott-Vysis).

- 2x SSC s 0,1% detergentem

Před přípravou roztoku je třeba zahřát Igepal CA-630 a Aqua pro injectione. Obě reagentie necháme dojít na laboratorní teplotu 18–25 °C na nerezovém stole v přípravně 1 hodinu, nejméně 30 minut.

Roztok připravíme z:

10 ml 20x SSC (pH=7),

85 ml Aqua pro injectione,

100 µl Igepal CA-630.

Tři hodiny promícháváme na nejvyšší otáčky na magnetickém míchadle a pak uložíme přes noc do chladničky. Ráno po zahřátí roztoku na laboratorní teplotu 18–25 °C promícháme roztok 15 min při stejných otáčkách na magnetickém míchadle a na pH metru změříme při laboratorní teplotě pH. Pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové (36%) a 5M NaOH upravíme pH na hodnotu $7,0 \pm 0,2$. Vodou (Aqua pro injectione) doplníme celkový objem na 100 ml. Takto připravený roztok tepelně ošetříme v teplotní skříni při 110–130 °C 20 min. Po vychladnutí uskladníme roztok v chladničce při 2–8 °C. Roztok označíme dle výše uvedených podmínek. Roztok můžeme skladovat nanejvýš 6 měsíců (dle manuálu společnosti Abbott-Vysis).

Odmývací roztoky zahřejeme 30 min před zahájením procesu na požadovanou teplotu dle návodu výrobce sond: 40 ml roztoku 0,4x SSC/0,3%-Igepal zahříváme na teplotu 73 ± 1 °C ve skleněné kyvetě s víčkem. 40 ml roztoku 2x SSC/0,1%-Igepal zahřejeme na laboratorní teplotu 18–25 °C v Coplinově kyvetě.

- Alkoholové roztoky

70% ethanol – 70 ml 96% ethanolu

30 ml destilované vody

85% ethanol – 85 ml 96% ethanolu

15 ml destilované vody

96% ethanol – 100 ml 96% ethanolu

Použitelnost tohoto roztoku je 7 dní, pak je třeba připravit nový roztok. Lihovým popisovačem napíšeme na roztok datum a čas přípravy. Roztok skladujeme při laboratorní teplotě 18–25 °C maximálně 7 dní (dle manuálu společnosti Abbott-Vysis).

3.2.2 Příprava hybridizačních směsí

Před kodenaturací chromozomální DNA a DNA sondy připravíme hybridizační směs podle návodu. Tab. 3 uvádí objemové poměry pro různý počet současně aplikovaných sond.

Hybridizační směs připravujeme bezprostředně před FISH. Mikrozkušavky se sondou, hybridizačním pufrům a doplněnou Aqua pro injectione krátce centrifugujeme do homogenizace obsahu mikrozkušavek na mikrocentrifuze. Do sterilní mikrozkušavky automatickou mikropipetou napipetujeme:

Tab. 3. Příprava hybridizační směsi

počet sond k hybridizaci	1 sonda	2 sondy	3 sondy
hybridizační pufr	7 µl	7 µl	7 µl
sonda 1	1 µl	1 µl	1 µl
sonda 2	-	1 µl	1 µl
sonda 3	-	-	1 µl
Aqua pro injectione	2 µl	1 µl	-

Lihovým popisovačem napíšeme na mikrozkušavku složení hybridizační směsi. Mikrozkušavky s hybridizační směsí krátce centrifugujeme na mikrocentrifuze do homogenizace obsahu. Krátce promícháme na minitřepače a

opět krátce centrifugujeme. Hybridizační směs uložíme až do doby hybridizace na tmavé místo nebo do mrazáku.

3.2.3 Zpracování vzorku a následná hybridizace

- Připravit vzorky periferní krve k inkubaci s následnou kultivací (72 hod). Po skončení provést hypotonizaci kultivovaných buněk v roztoku 0,075 molárního KCl a dále fixaci materiálu směsí methanolu a kyseliny octové v poměru 3 : 1 – bližší popis postupu viz [49].
- Nahlédnout pod mikroskopem na preparát, zda je kvalitní. Neměl by obsahovat cytoplazmu kolem jader a chromozomů.
- Dehydratovat preparát vzestupnou alkoholovou řadou (70%, 85%, 96%, 100%) při laboratorní teplotě 18–25 °C po dobu 2 min v každém roztoku.
- Po vyjmutí ze 100% alkoholu nechat vyschnout preparáty na vzduchu při laboratorní teplotě 18–25 °C a přemístit na ploténku nastavenou na 37 °C. Mikroskopavku s hybridizační směsí před použitím promíchat na minitřepačce a pak centrifugovat na mikrocentrifuze po dobu 20 sekund při 1000 ot/min.
- Na ohřívací ploténku o teplotě 37 °C položit vyčištěné krycí sklíčko.
- Na místo s buňkami na podložním sklíčku aplikovat automatickou mikropipetou potřebné množství hybridizační směsi.
- Podle objemu hybridizační směsi volíme rozměry krycího skla (12x12 mm, resp. 15x15 mm). Krycí sklíčko opatrně přiložit na sklo podložní v místě určeném k hybridizaci. Je třeba dbát na to, aby nedošlo ke vzniku vzduchových bublin.
- Případné vzduchové bubliny opatrně odstranit tlakem pinzety.
- Orámovat okraje krycího sklíčka vulkanizačním roztokem a ponechat 5 min.
- Na předem připravené ohřívací ploténce provést denaturaci při 75 ± 1 °C po dobu 1 min.
- Po denaturaci přemístit sklo do termostatu nastaveného na 37 ± 1 °C a ponechat hybridizovat po dobu 24 hod.
- Po ukončené hybridizaci opatrně odstranit krycí sklíčko a ponořit sklo na 1 minutu do horkého roztoku 0,4x SSC s 0,3% detergentem (73 °C). Dojde k odstranění nespecifických signálů.

- Po vyjmutí z horkého 0,4x SSC okamžitě ponořit sklo do roztoku 2x SSC s detergentem na 1 min při laboratorní teplotě.
- Skla z roztoku vyjmout a otřít jejich zadní plochy – nechat volně oschnout.
- Mezitím vyjmout krycí sklíčko, které velikostně odpovídá rozloze hybridizované plochy na preparátu a nanést na něj automatickou mikropipetou potřebné množství barviva DAPI o koncentraci 125ng/ml. Na sklíčko velikosti 18x18 mm aplikujeme 10 µl DAPI.
- Opatrně přiložit krycí sklíčko na místo s buňkami, kde proběhla hybridizace, tak, aby nemohlo dojít ke vzniku vzduchových bublin. Případné vzduchové bubliny opatrně odstranit tlakem pinzety. Rohy krycího sklíčka překrýt malým množstvím bezbarvého laku na nehty.
- Preparáty prohlédnout pod fluorescenčním mikroskopem s objektivem zvětšujícím 100x za použití imerzního oleje (viz dále).

3.2.4 Mikroskopická analýza

- Spustit software ISIS (od společnosti Metasystems).
- Otevřít FISH modul obrazové analýzy, příslušnou databázi a najít v abecedním seznamu složku konkrétního pacienta a otevřít ji (popř. tuto složku zřídit).
- Preparát skladovaný ve tmavé komůrce vložit na stolek mikroskopu do posuvného zařízení.
- Porovnat identifikační údaje pacienta v databázi s preparátem.
- Ve fluorescenčním mikroskopu nastavit filtr pro barvivo, jímž jsou obarveny chromozomy (counterstaining).
- S objektivem zvětšujícím 20x nebo 40x najít a orientačně prohlédnout vhodnou metafázi nebo interfázní jádro.
- Prohlédnout metafázi, resp. interfázní jádro i pod dalšími filtry pro ostatní použité fluorochromy. Tím posoudíme kvalitu hybridizace a vhodnost preparátu pro analýzu. Poté preparát prohlédnout i s objektivem zvětšujícím 100x za použití imerze. Pokud je cílová sekvence přítomna, je místo vazby sondy vidět ve fluorescenčním mikroskopu jako hybridizační signál.

3.2.5 Práce s mikroskopem a se softwarem určeným k analýze obrazu

Všechny preparáty po hybridizaci musíme chránit před světlem. Asi 5 min před vyhodnocením preparátu pod fluorescenčním mikroskopem musí být preparát ponechán ve tmě při pokojové teplotě.

Klikneme na ikonu snímání (resp. „Capture image“) a na mikroskopu otevřeme clonu pro poloviční průchod světla do kamery. Ovládáním mikroskopického stolku posuneme analyzovaný objekt do středu obrazovky monitoru PC a zaostříme. Páku pro ovládání clony pro průchod světla na mikroskopu otevřeme do polohy pro plný průchod světla do kamery při snímání podbarvení analyzovaného objektu a doostříme. Potvrzením tlačítka „další“ systém automaticky přepne na snímání další barvy a zároveň automaticky vymění filtr pro snímání fluorochrom. Opět upravíme a doostříme, pak potvrdíme tlačítkem „další“. Při snímání poslední barvy uzavíráme celý proces snímání tlačítkem „OK“. Nasnímaný obrázek upravíme pomocí nabídky v menu úpravy do konečné podoby určené pro dokumentaci.

Při vyšetření mikrolečných syndromů hodnotíme minimálně pět, zpravidla však 10–15 metafází. Pokud metafáze zcela chybí, vyšetřujeme 200 interfázních jader. Při podezření na mozaiku se doporučuje hodnotit 500 i více buněk (metafázních chromozomů i interfázních jader).

3.2.6 Závěr analýzy

Pro vyslovení konečného závěru a vyplnění zprávy o výsledku analýzy FISH je potřebné vyhodnotit větší počet jader (nejlépe metafázních). Z řady nasnímaných obrázků pacienta vybereme jeden reprezentativní obrázek.

Zpráva o výsledku analýzy FISH obsahuje identifikační údaje pacienta, jméno odesílajícího lékaře, číslo diagnózy pacienta podle mezinárodní nomenklatury, číslo pojišťovny, obrázek karyotypu, datum vyhotovení zprávy, jména hodnotících osob a jméno vedoucího genetické laboratoře.

Po ukončení práce s fluorescenčním mikroskopem se preparáty uchovávají dlouhodobě v mrazicím boxu o teplotě -20 ± 1 °C. Po vydání výsledků se preparáty skladují za výše uvedených podmínek ještě po dobu 1 měsíce. Preparáty s patologickým nálezem jsou archivovány po dobu jednoho roku.

Tab. 4. Seznam použitých přístrojů

Přístroj	Výrobce
ohřívací ploténka SH1D s digitální kontrolou teploty	Stuart
mikrocentrifuga SDV	Roth
vortex MaxiMix II	Barnstead/ThermoLyne
termostat Micra 18	ISCO
mrazicí box	Zanussi
epifluorescenční mikroskop BX51 s CCD kamerou	Olympus

Počítačový software ISIS použitý k analýze obrazu vyrábí společnost MetaSystems.

Tab. 5. Seznam použitých sond

Název sondy	Chromozomová specifikace	Lokus	Délka sondy	Výrobce
Aquarius DiGeorge/VCFS TUPLE1 Region Probe	22q11.2	HIRA (dříve označován TUPLE1)	120 kb	Cytocell
Aquarius Williams-Beuren Region Probe	7q11.23	FZD9/WBSCR9/TBL2/ /LIMK1/RFC2/CYLN2	450 kb	Cytocell

Roztok DAPI byl součástí dodávaných kitů od společnosti Cytocell, imerzní olej pro fluorescenční mikroskopii od společnosti Olympus.

4. Výsledky

Na základě výsledků molekulárně cytogenetického vyšetření (FISH) jedenácti pacientů s podezřením na mikrodeleci 22q11.2 a sedmi pacientů s podezřením na mikrodeleci 7q11.23, jejichž kultivované lymfocyty periferní krve byly analyzovány v molekulárně cytogenetické laboratoři ÚBLG 2. LF UK a FN Motol, jsem tabulky doplnila o výsledek fluorescenční *in situ* hybridizace (karyotyp všech zmíněných pacientů byl normální).

4.1 Mikrodelece 22q11.2

Tab. 5. Soubor pacientů s výsledky FISH (22q11.2)

číslo pacienta	věk v době vyšetření	fenotyp	výsledek FISH
1	25 let	operovaný rozštěp patra, faciální dysmorfie typická pro VCFS	ish del (22) (q11.2 q11.2) (HIRA-)
2	1 rok	srdeční vada, mírná orofaciální stigmatizace (širší hřbet nosu, níže posazené, dysplastické ušní boltce)	ish del (22) (q11.2 q11.2) (HIRA-)
3	19 dní	srdeční vada, ageneze thymu	ish del (22) (q11.2 q11.2) (HIRA-)
4	4 měsíce	srdeční vada, aplázie thymu	ish del (22) (q11.2 q11.2) (HIRA-)
5	5 let	PMR, imunodeficience, chronické respirační infekty, srdeční vada, dysplastické ušní boltce, nízká vlasová hranice, širší nos	ish 22q11.2 (HIRAx2)
6	9 let	operovaná srdeční vada, lehká mozková dysfunkce, deficit buněčné imunity	ish 22q11.2 (HIRAx2)
7	13 měsíců	atrémie jícnu, srdeční vada, protrahovaná sepse, porucha buněčné imunity	ish 22q11.2 (HIRAx2)
8	13 let	srdeční vada, faciální dysmorfie (hypertelorismus, mongolidní slant očních štěrbin, hypoplastická dolní čelist)	ish 22q11.2 (HIRAx2)

9	5 dní	srdeční vada, faciální stigmatizace (nápadný nos, široký kořen nosu, menší brada)	ish 22q11.2 (HIRAx2)
10	9 let	autismus, faciální stigmatizace, nedoslýchavost, srdeční vada, rozštěp patra, porucha imunity	ish 22q11.2 (HIRAx2)
11	3 dny	níže posazené dysplastické ušní boltce, mikromandibula, srdeční vada, snížená hladina vápníku	ish 22q11.2 (HIRAx2)

V tabulce 5 je uvedeno 11 pacientů, kteří byli vyšetřeni pro suspektní mikrodeleci 22q11.2. Věkové rozpětí vyšetřených pacientů je poměrně veliké, nejmladší pacient (č. 11) byl vyšetřen třetí den po svém narození, nejstarší pacientka v tomto případě byla 25letá žena, která se do genetické ambulance dostala až po narození vlastního dítěte, u kterého byla tato mikrodelece prokázána (pacienti č. 1 a 2). Tato žena, rovněž nositelka mikrodelece 22q11.2, měla v anamnéze pouze operovaný rozštěp patra a v obličeji byly patrné některé rysy typické pro velokardiofaciální syndrom. Srdeční vadou netrpěla. Její potomek, vyšetřen ve věku 1 roku, však již srdeční vadou trpí, kromě toho je rovněž stigmatizován v obličeji (široký hřbet nosu, nízko posazené dysplastické ušní boltce), rozštěpové vady však nemá.

Další dva pacienti (č. 3 a 4) byli vyšetřeni ve věku 19 dní a 4 měsíce pro srdeční vadu a poruchy ve vývoji brzlíku (ageneze a aplázie thymu). Dalšími vadami netrpěli, mikrodelece 22q11.2 u nich byla prokázána.

U ostatních pacientů v tabulce 5 nebyla mikrodelece prokázána, ač byli k vyšetření indikováni právě pro srdeční vadu, poruchy buněčné imunity, faciální stigmatizaci a další vady. Jak jsem již ale zmínila výše, neprokázání mikrodelece metodou FISH nevyklučuje mikrodeleční syndrom podmíněný velmi malou mikrodelečí či bodovou mutací.

Pro vyšetření těchto 11 pacientů byla použita sonda Aquarius DiGeorge/VCFS TUPLE1 Region Probe o délce 120 kb od společnosti Cytocell. Sonda je komplementární k lokusu HIRA neboli TUPLE 1.

4.2 Mikrodelece 7q11.23

Tab. 6. Soubor pacientů s výsledky FISH (7q11.23)

číslo pacienta	věk v době vyšetření	fenotyp	výsledek FISH
1	4 roky	mentální retardace, porucha řeči, srdeční vada	ish del (7)(q11.23 q11.23) (FZD9/WBSCR9/TBL2/LIMK1/RFC2/CYLN2-)
2	5 let	srdeční vada, PMR, malý vzrůst, mikrocefalie, kariézní chrup	ish del (7)(q11.23 q11.23) (FZD9/WBSCR9/TBL2/LIMK1/RFC2/CYLN2-)
3	7 měsíců	lehká faciální stigmatizace (masivní horní ret, antevertované nostrily), srdeční vada	ish del (7)(q11.23 q11.23) (FZD9/WBSCR9/TBL2/LIMK1/RFC2/CYLN2-)
4	40 let	PMR, v dětství idiopatické hyperkalcémie	ish 7q11.23 (FZD9/WBSCR9/TBL2/LIMK1/RFC2/CYLN2x2)
5	3 roky	srdeční vada, výrazné rty	ish 7q11.23 (FZD9/WBSCR9/TBL2/LIMK1/RFC2/CYLN2x2)
6	1 rok	srdeční vada, hydronefróza, výrazná hypotonie, PMR, orofaciální stigmatizace	ish 7q11.23 (FZD9/WBSCR9/TBL2/LIMK1/RFC2/CYLN2x2)
7	6 měsíců	srdeční vada, mírná faciální stigmatizace	ish 7q11.23 (FZD9/WBSCR9/TBL2/LIMK1/RFC2/CYLN2x2)

Tabulka 6 obsahuje seznam pacientů vyšetřených pro suspektní mikrodeleci 7q11.23. Ze sedmi pacientů ve věku od 6 měsíců do 40 let, byla u tří mikrodelece potvrzena (č. 1 až 3).

U prvního pacienta bylo vyšetření indikováno pro srdeční vadu (supraaortální stenózu) a mentální retardaci s poruchou řeči.

Druhý pacient byl vyšetřen rovněž pro srdeční vadu (pulmonální stenózu), mikrocefalii, psychomotorickou retardaci, malý vzrůst a stigmatizaci typickou pro Williamsův-Beurenův syndrom. Dále měl v anamnéze výrazně kariézní chrup.

U pacienta č. 3 dominovala kombinovaná srdeční vada (stenóza aorty i plicnice) a lehká faciální stigmatizace (masivní horní ret, antevertované nostrily).

Téměř stejný fenotyp byl popsán u pacienta č. 7 – srdeční vada (rovněž kombinovaná) a mírná faciální stigmatizace, u něj však mikródelece prokázána nebyla.

Ostatní pacienti (č. 4 až 6) byly vyšetřováni pro různý stupeň psychomotorické retardace, srdeční vadu, orofaciální stigmatizaci, hyperkalcémii a další vady. Mikródelece však pomocí FISH nebylo možno prokázat.

Pro vyšetření byla použita sonda Aquarius Williams-Beuren Region Probe od společnosti Cytocell o délce 450 kb zaměřená na lokusy FZD9/WBSCR9/TBL2/LIMK1/RFC2/CYLN2.

5. Diskuse

Z uvedených výsledků vyplývá, že ani fenotyp, který na první pohled zařadíme ke známému syndromu, nemusí být tímto syndromem podmíněn. Dalším možným vysvětlením neprokázání suspektní mikrolece u pacienta může být nedostatečná citlivost použité vyšetřovací metody či vzácněji laboratorní chyba. Nakonec je také možné, že podobný fenotyp mohou způsobovat mutace v různých lokusech. Jsou-li známy, je vhodné je dovyšetřit.

5.1 Metodické možnosti FISH a MLPA

Oproti jiným molekulárně biologickým metodám je metoda FISH méně pracná a dovoluje poměrně rychlou detekci mikroleceí a jiných aberací. Její nevýhodou je však menší citlivost. Pro přehlednost obvykle na jedno sklíčko nanášíme pouze centromerické či lokus-specifické sondy pro kontrolu, zda jsou sledované chromozomy vůbec přítomny, resp. je-li mitóza kompletní, a lokus-specifické sondy komplementární k úseku, jehož delecí vyšetřujeme. Jedno vyšetření tedy obvykle umožňuje odhalit chybění pouze jednoho lokusu. Chceme-li vyšetřit více suspektních delecí, hybridizujeme pacientovu DNA s dalšími sondami na jiném sklíčku.

Další metoda, nevyžadující prvotní určení cílových lokusů, je CGH. Pro vyšetření mikroleceí se však v současnosti používá spíše její citlivější varianta – array CGH, jejíž nevýhodou je však její značná finanční nákladnost [39].

Rychlejší a méně nákladnou analýzu mikrolečných syndromů umožňuje metoda MLPA. Její další výhodou je možnost analýzy většího počtu lokusů, aniž by se snižovala přehlednost či přesnost metody. Metoda je dokonce citlivější než klasická FISH, proto ji dnes také zčásti nahradila. FISH si přesto ponechává své nezastupitelné místo např. v detekci mozaikových forem různých aberací – umožňuje totiž vyšetřit velké množství buněk (jader, a to i interfázních) v poměrně krátkém čase. V případě mozaikových nálezů (zejména u nízkofrekvenčních mozaik) selhává MLPA i array CGH, neboť nezachytí drobné kvantitativní změny v koncentraci PCR produktů (u MLPA) nebo v množství DNA v daném lokusu (u array CGH). U metafázních chromozomů umožňuje FISH také relativně přesnou

lokalizaci aberace (signály, resp. jejich absenci lze pozorovat přímo na chromozomech) a v mnoha případech i vyloučení jiných přestaveb v kritickém regionu. Do budoucna lze tedy předpokládat, že spolu budou obě metody koexistovat, každá ve svých indikacích, místo aby vytlačila jedna druhou. Pro spolehlivou diagnostiku by bylo ideální kombinovat více metod (např. FISH a MLPA nebo FISH a array CGH) [39, 46].

5.2 Molekulárně cytogenetické vyšetření mikrolečních syndromů

Porovnáme-li fenotypy vyšetřovaných pacientů (viz tabulka 1 a 2) s klasickými fenotypy, které zmiňuji u jednotlivých syndromů v rámci teoretického úvodu, je patrné, že zde existuje jak velká variabilita ve výskytu jednotlivých znaků, tak i velmi rozdílná expresivita.

Pro příklad si můžeme vzít jen pacienty s prokázaným syndromem (ačkoli zároveň nevylučujeme přítomnost syndromu u „FISH negativních“ pacientů). V tabulce 5 jsou to první čtyři pacienti. První pacientka (č. 1) vykazuje jen faciální dysmorfii a v anamnéze rozštěp patra. Na genetickou konzultaci přišla se svým ročním dítětem (č. 2), které kromě lehké faciální stigmatizace trpělo srdeční vadou, nikoli však vadou rozštěpovou. Poruchy ve vývoji thymu, poruchy imunity, ani hypokalcémie nebyla u pacientů zaznamenána. Analýza FISH u obou potvrdila delecí postihující lokus HIRA (TUPLE1). Můžeme spekulovat o tom, zda byla delece u dítěte stejného rozsahu jako u matky, což nelze použitou metodou ověřit. Zůstává však otázkou, zda má rozsah delece klíčový vliv na expresivitu fenotypových projevů. U pacientů 1 a 2 by se dala předpokládat mikrolece podobného rozsahu, fenotypově se však pacienti liší. Je proto pravděpodobné, že na výsledném fenotypu pacienta se podílejí ještě další vlivy, jako např. spolupůsobení alel jiných (modifikátorových) genů a vnější faktory (fyzikální, chemické a biologické vlivy, např. nutriční matky, alkoholismus, kouření, virové a bakteriální infekce v těhotenství). Vrátime-li se nyní ještě k pacientům č. 3 a 4 z tabulky 5, u nichž byla zjištěna srdeční anomálie a porucha ve vývoji thymu, pouze si tak potvrdíme předešlé poznatky (mikrolece u nich sice byla diagnostikována, avšak ani jeden z nich netrpí rozštěpovými vadami či faciální dysmorfii) [5, 39, 50].

V tabulce 6 prokázala analýza FISH mikrolece u tří pacientů ze sedmi. Tento poměr ovšem stejně jako u tabulky 5 neodpovídá poměru vyšetřených k pozitivně

diagnostikovaným pacientům. V běžných cytogenetických laboratořích je obvykle vyšetřeno mnohem více pacientů, u kterých se delece neprokáže. Opět si zde můžeme všimnout vysoké variability mezi pacienty. U pacienta č. 1 není patrna faciální stigmatizace (na rozdíl od pacienta č. 3, u něhož byl prokázán WBS, a pacientů 5, 6 a 7, u nichž alespoň mírná stigmatizace nalezena byla, ale WBS prokázán nebyl). Pacienti č. 1 a 2 trpí mentální retardací, u pacienta č. 3 se tento fenotypový znak nevyskytuje. S jedinou výjimkou (č. 4) byla ale u všech pacientů diagnostikována srdeční vada (typická pro WBS). Hyperkalcémie se naopak vyskytovala pouze u pacienta č. 4, analýza FISH u něj však WBS neprokázala.

6. Závěr

Cílem této práce bylo shrnout některé základní současné poznatky o kryptických aberacích, konkrétně o jejich vzniku, klinických projevech a možnostech vyšetření. O to jsem se pokusila zejména v teoretickém úvodu této práce.

Dalším cílem bylo získat praktické i teoretické zkušenosti s prací v molekulárně cytogenetické laboratoři. Tyto zkušenosti jsem pak využila v experimentální části. Na základě těchto poznatků jsem se dále snažila porovnat metody FISH a MLPA a shrnout jejich výhody a nevýhody z pohledu analýzy kryptických aberací.

Nakonec jsem se snažila uvést alespoň základní fenotypové charakteristiky pacientů s vybranými mikrolečnými syndromy a porovnat je s výsledky molekulárně cytogenetické analýzy u vybrané skupiny motolských pacientů.

Do budoucna by bylo velice přínosné zaměřit se právě na vlivy modifikující výsledný fenotyp pacienta s jasně definovanou mikrolečcí či jiným typem mutace. Výsledky takového výzkumu by pak mimo jiné ulehčily rozhodování v tak eticky náročných případech, jako je ponechání těhotenství u matky s prokázanou mikrolečcí plodu, a to zvláště u těch syndromů (potažmo všech genetických onemocnění), u nichž se klinický obraz pohybuje od velmi mírného (či asymptomatického) až po neslučitelný se životem.

Dalším cílem, který bychom si do budoucna mohli a měli klást, je pokusit se o zpřesnění a zpřístupnění molekulárně cytogenetické či molekulárně biologické analýzy všech dosud (a v budoucnu) známých onemocnění s genetickým podkladem, a to všude tam, kde by výsledek takové analýzy ovlivnil rozhodování matky v těhotenství či umožnil léčbu takových onemocnění. Naplněním těchto snah by pak mohl být celoplošný populační screening vybraných mutací, resp. chromozomových aberací.

7. Seznam použité literatury

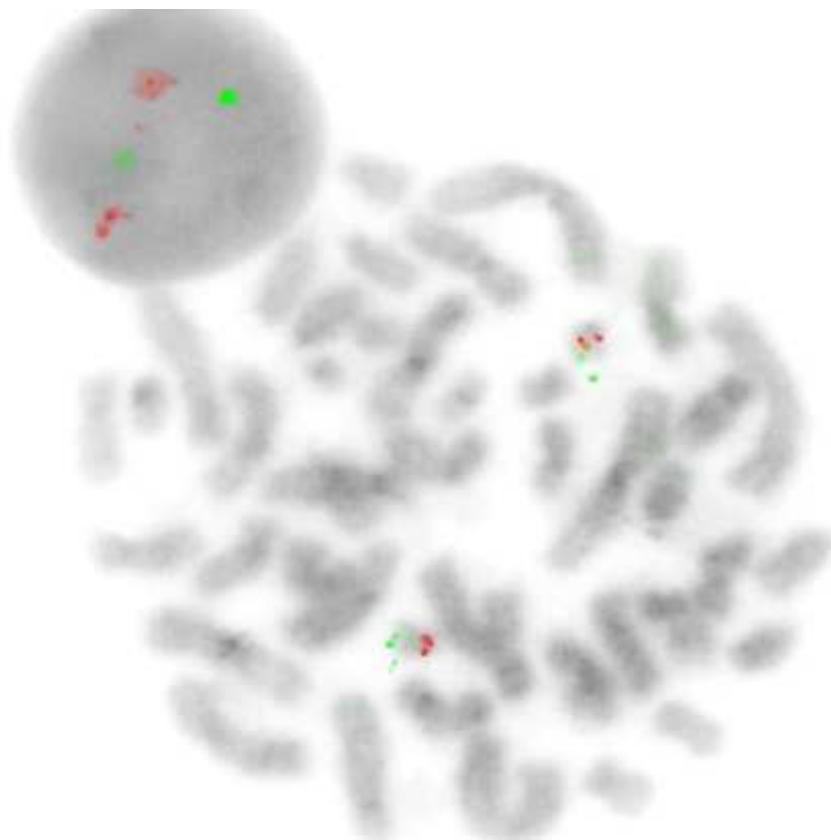
- 1 – Seemanová E. Mikrodeleční syndromy. *Čas Lék Čes* 2002; 12: 363–370
- 2 – <http://www.genetests.org/servlet/access?id=8888891&qry=microdeletion+syndrome&db=genestar&site=gc&fcn=term&format=search>report2=true&submit=Search+by+term&key=-rn5gBOF3-ot6> 12.01.2010
- 3 – <http://ghr.nlm.nih.gov/gene=tbx1> 12.01.2010
- 4 – <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/digeorge-angelo-m> 12.01.2010
- 5 – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=188400> 12.01.2010
- 6 – <http://emedicine.medscape.com/article/886526-overview> 12.01.2010
- 7 – Engelen K et al. 22q11.2 Deletion syndrome is under-recognised in adult patients with tetralogy of Fallot and pulmonary atresia. *Heart* 2010; 96: 621–624.
- 8 – Bassett A et al. Copy number variations and risk for schizophrenia in 22q11.2 deletion syndrome. *Human Molecular Genetics* 2008; 17: 4045–4053.
- 9 – Chieffo C, Garvey N et al. Isolation and characterization of a gene from the DiGeorge chromosomal region homologous to the mouse Tbx1 gene. *Genomics* 1997; 43: 267–277.
- 10 – Bartsch O, Nemeckova M, Kocarek E et al. DiGeorge/Velocardiofacial Syndrome: FISH Studies of Chromosome 22q11 and 10p14, and Clinical Reports on the Proximal 22q11 Deletion. *Am J Med Genet* 2003; 117A: 1–5.
- 11 – Prasad S et al. Candidate Genes and the Behavioral Phenotype in 22q11.2 Deletion Syndrome. *Dev Disabil Res Rev* 2008; 14: 26–34.
- 12 – Ziolkowska L et al. Chromosome 22q11.2 microdeletion in children with conotruncal heart defects: frequency, associated cardiovascular anomalies, and outcome following cardiac surgery. *Eur J Pediatr* 2008; 167: 1135–1140.
- 13 – Saitta S et al. Independent De Novo 22q11.2 Deletions in First Cousins With DiGeorge/Velocardiofacial Syndrome. *Am J Med Genet* 2004; 30: 313–317.
- 14 – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=194050> 12.01.2010
- 15 – Frangiskakis JM, Ewart AK et al. LIM-kinase1 hemizygoty implicated in impaired visuospatial constructive cognition. *Cell* 1996; 86: 59–69.
- 16 – Peoples et al. The gene for replication factor C subunit 2 (RFC2) is within the 7q11.23 Williams syndrome deletion. *Am. J. Hum Genet* 1996; 58, 1370–1373.

- 17 – Hort V, Hrdlička M, Kocourková J, Malá E. Dětská a adolescentní psychiatrie. 1 vydání. Praha: Portál 2000. 496 stran
- 18 – Schubert C. The genomic basis of the Williams-Beuren syndrome. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 1178–1197.
- 19 – Fanconi G, Girardet P, Schlesinger B et al. Chronic hyperglycemia, combined with osteosclerosis, hyperazotemia, nanism and congenital malformations. *Helv Paediatr Acta* 1952; 7: 314–349.
- 20 – Lightwood R, Stapleton T. Idiopathic hypercalcemia in infants. *Lancet* 1953; 265: 255–256.
- 21 – Jones KL. Williams syndrome: an historical perspective of its evolution, natural history, and etiology. *Am J Med Genet* 1990; 6: Suppl. 89–96.
- 22 – Enkhmandakh B et al. Essential functions of the Williams-Beuren syndrome-associated TFII-I genes in embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 181–186.
- 23 – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=247200> 12.01.2010
- 24 – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=607872> 12.01.2010
- 25 – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=105830> 12.01.2010
- 26 – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=123450> 12.01.2010
- 27 – Mainardi P. Cri du Chat syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2006; 1:33.
- 28 – http://en.wikipedia.org/wiki/Prader_willi#PWS_phenotype 12.01.2010
- 29 – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=176270> 12.01.2010
- 30 – http://en.wikipedia.org/wiki/Smith-Magenis_syndrome 12.01.2010
- 31 – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=182290> 12.01.2010
- 32 – http://en.wikipedia.org/wiki/Jacobsen_syndrome 12.01.2010
- 33 – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=147791> 12.01.2010
- 34 – http://en.wikipedia.org/wiki/Wolf-Hirschhorn_syndrome 12.01.2010
- 35 – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=194190> 12.01.2010
- 36 – Hirschhorn K, Cooper HL, Firschein IL. Deletion of short arms of chromosome 4-5 in a child with defects of midline fusion. *Hum Genet* 1965; 5: 479–82.
- 37 – Čalounová G. Syndromy Prader-Williho a Angelmanův. Sborník textů: Vybrané aspekty lékařské genetiky. Praha. Ústav dědičných metabolických poruch VFN v Praze 2008, 57–59

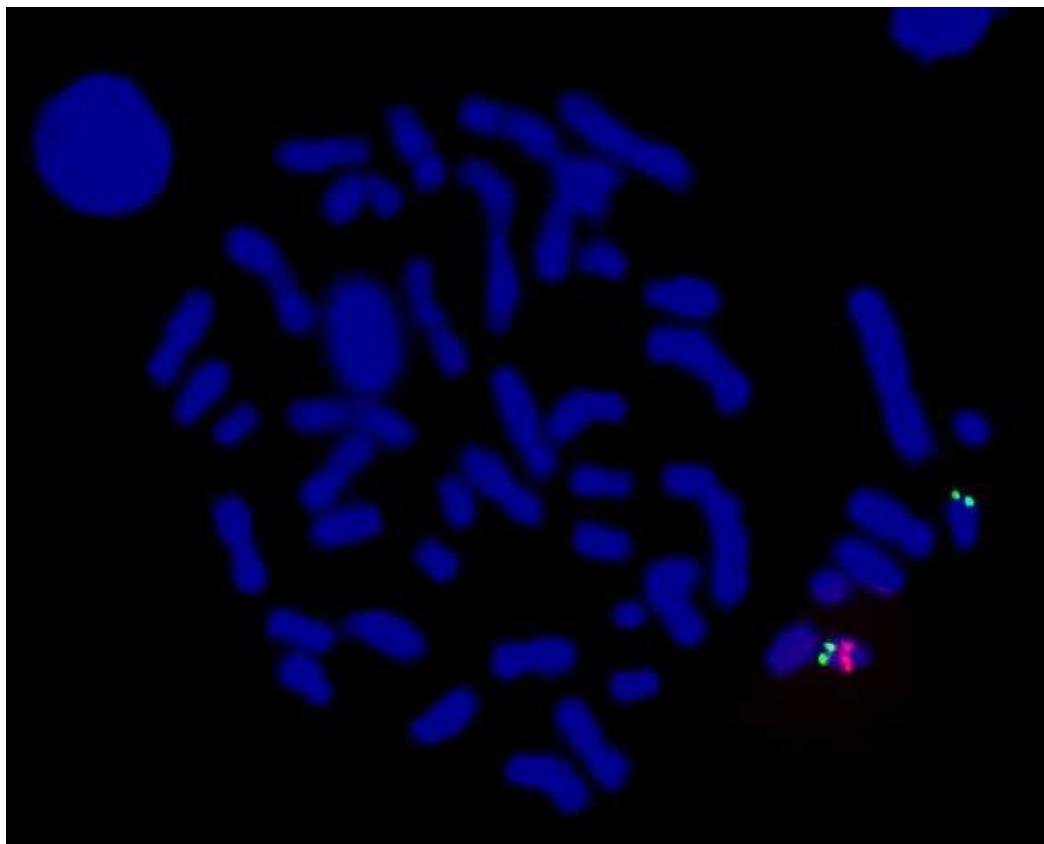
- 38 – Michalová K. Úvod do lidské cytogenetiky. 1.vydání. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví (Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů) 1999. 172 stran
- 39 – Kočárek E, Pánek M, Novotná D. Klinická cytogenetika I. Praha: Karolinum 2006. 121 stran
- 40 – <http://www.genetests.org/servlet/access?id=8888892&qry=band&db=genestar&site=gc&fcn=term&format=search>report2=true&submit=Search+by+term&key=QOXpQtHcimuNE> 25.01.2010
- 41 – Hirsch B, Mack R, Arthur D. Sequential G- to R-banding for high resolution chromosome analysis. Hum genet 1987; 76: 37–39
- 42 – Grünewald-Jahno S, Keeseey J, Leous M, Miltenburg R, Schroeder Ch. Nonreactive In Situ Hybridization Application Manual. 2. vydání. Mannheim: Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica 1996.
- 43 – Šťastná S et al. Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice. Praha. Ústav dědičných metabolických poruch VFN v Praze 2008. 50 stran
- 44 – http://en.wikipedia.org/wiki/Array_comparative_genomic_hybridization 29.01.2010
- 45 – <http://en.wikipedia.org/wiki/PCR> 25.01.2010
- 46 – Sellner L, Taylor G. MLPA and MAPH: New Techniques for Detection of Gene Deletions. Human Mutation 2004; 23: 413–419
- 47 – http://en.wikipedia.org/wiki/Multiplex_Ligation-dependent_Probe_Amplification 25.01.2010
- 48 – <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=w12zCji\rCGANQgZPuTixtCplCA1mmwJoFo/xHPnTgc|> 25.01.2010
- 49 – Goetz P, Balíček P et al. Základní kultivace periferní krve. Metody analýzy chromozomů. Brno. Cytogenetická sekce československé biologické společnosti při ČSAV v Brně 1988; p. 15.
- 50 – <http://www.mayoclinic.com/health/digeorge-syndrome/DS00998/DSECTION=symptoms> 25.01.2010
- 51 – archiv Ústavu biologie a lékařské genetiky 2.LF UK a FN Motol
- 52 – <http://www.osel.cz/index.php?clanek=1032>

8. Přílohy

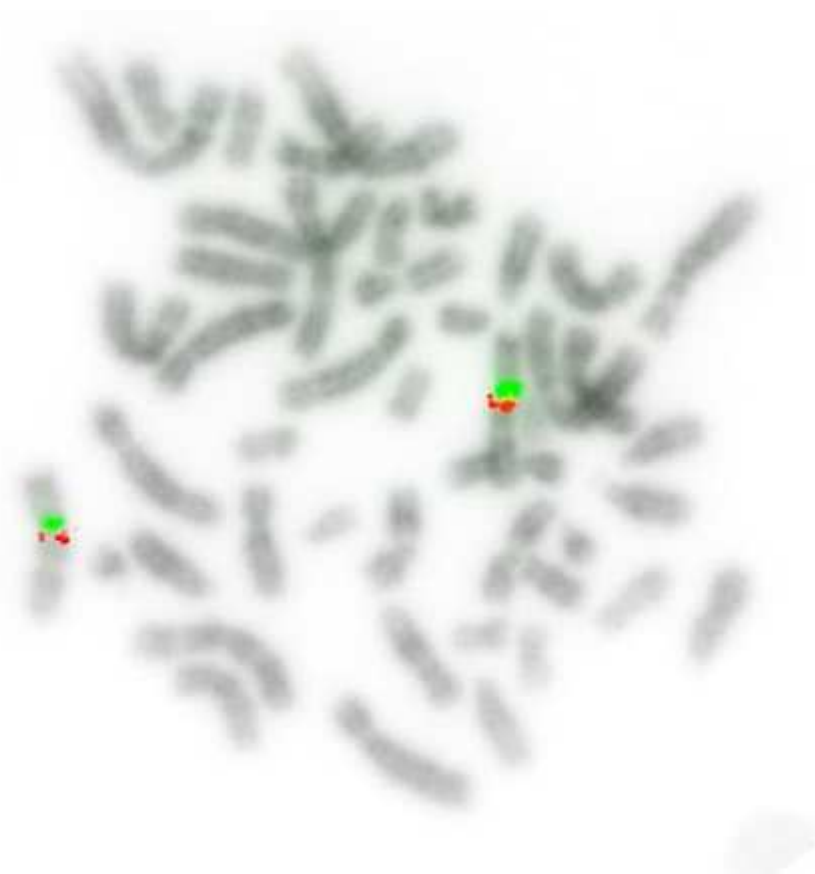
Obr. 1. Fotografie interfázního jádra a metafázních chromozomů zpracovaných metodou FISH – delece 22q11.2 neprokázána [51]



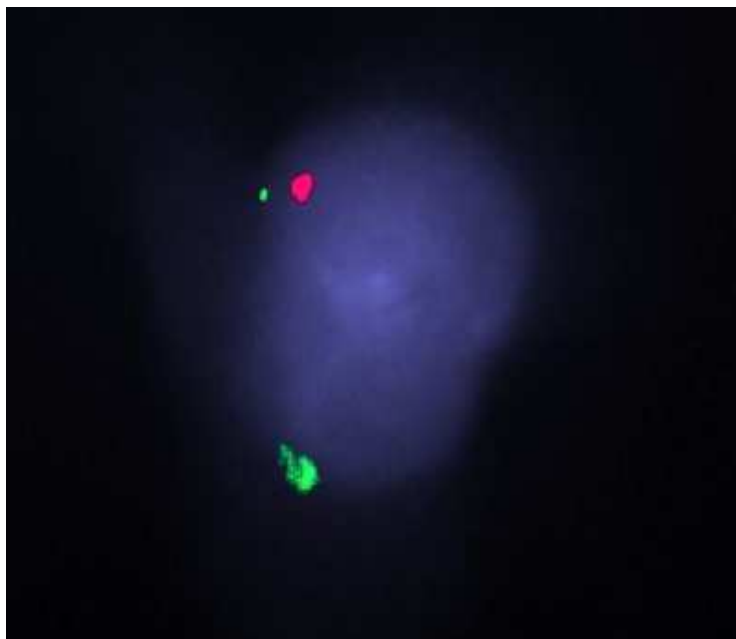
Obr. 2. Fotografie chromozomů zpracovaných metodou FISH – delece 22q11.2 prokázána [51]



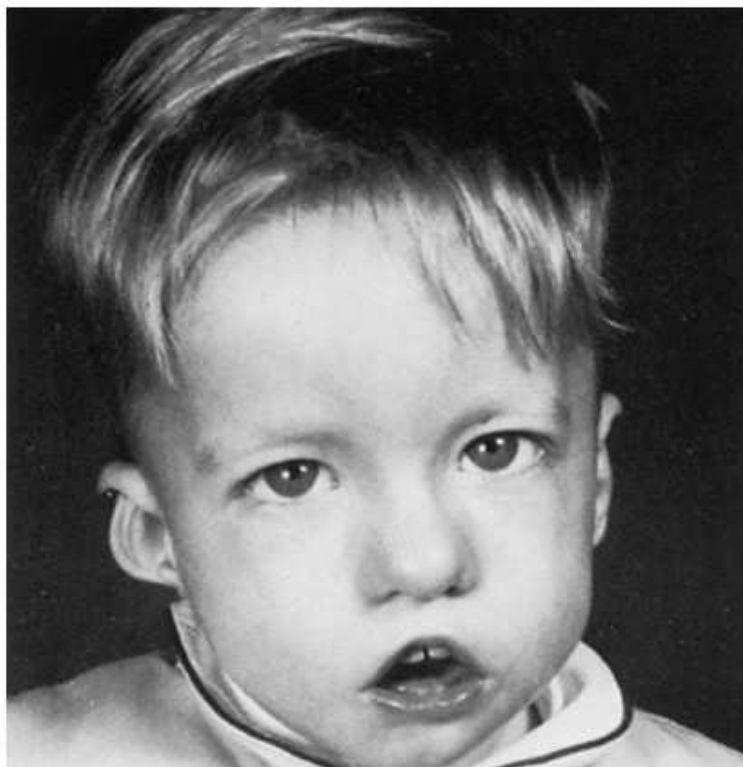
Obr. 3. Fotografie chromozomů zpracovaných metodou FISH – delece 7q11.23 neprokázána [51]



Obr. 4. Fotografie interfázního jádra zpracovaného metodou FISH – delece 7q11.23 prokázána [51]



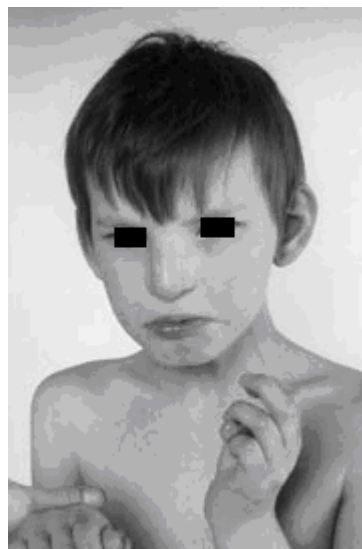
Obr. 5. Fotografie pacienta s Digeorgovým syndromem [52]



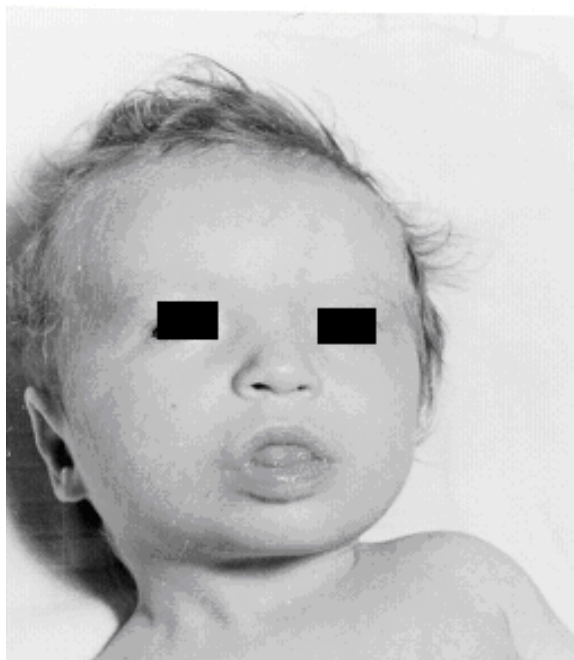
Obr. 6. Fotografie pacienta s Williamsovým-Beurenovým syndromem [51]



Obr. 7. Fotografie pacienta s Angelmanovým syndromem [51]



Obr. 8. Fotografie pacienta s Cri-du-chat syndromem [51]



Obr. 9. Fotografie pacienta s Praderovým-Williho syndromem [51]



Obr. 10. Fotografie pacienta se Smithové-Magenisové syndromem [51]

