

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

SNP ARRAY V PRENATÁLNÍ DIAGNOSTICE

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Pavlína Hašková, Ph.D.

Školitel specialista: RNDr. Marie Trková, Ph.D.

Hradec Králové 2014

Lenka Hnyková

Prohlášení:

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti prací.

V Praze, 30. 4. 2014

Lenka Hnyková

Podpis:

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Pavlíně Haškové, Ph.D. za perfektní, rychlou spolupráci a přínosné rady při sepisování práce.

Za užitečné připomínky a spolupráci při sběru dat bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Marii Trkové, Ph.D. a vedoucímu laboratoře RNDr. Jiřímu Horáčkovi.

Poděkování za podporu patří i všem ostatním kolegyním v laboratoři.

Obsah:

1. Úvod

2. Současný stav studované problematiky

2.1. Neinvazivní vyšetření

2.1.1. Kombinovaný screening v I. trimestru

2.1.2. Screening mateřského séra ve II. trimestru

2.1.3. Ultrazvukové vyšetření ve II. trimestru

2.1.4. Izolace fetální DNA z mateřského séra

2.2. Invazivní vyšetření

2.2.1. Amniocentéza (AMC)

2.2.2. Biopsie choriových klků (CVS)

2.2.3. Kordocentéza

2.2.4. Hlavní indikace invazivní prenatalní diagnostiky

2.2.4.1. Indikační kritéria pro použití SNP array

2.3. Metody využívané v cytogenetické laboratoři

2.3.1. Klasická cytogenetika – mikroskopické stanovení karyotypu

2.3.2. Molekulární cytogenetika

2.3.2.1. Fluorescenční In Situ Hybridizace (FISH)

2.3.2.2. SNP array

3. Cíl práce

4. Materiál a metodika

4.1. Princip metody SNP array

4.2. Přístroje, pomůcky, spotřební materiál

4.3. Reagencie a činidla

4.4. Pracovní postup

4.4.1. Příjem a kvantifikace vzorku DNA

4.4.2. Rozvržení vyšetření

4.4.3. Denaturace, neutralizace a amplifikace DNA (1. den)

4.4.4. Fragmentace, precipitace a zahájení hybridizace (2. den)

4.4.5. Odmytí a barevné značení čipů (3. den)

5. Výsledky

6. Diskuse

7. Závěr

8. Seznam zkratk

9. Terminologie

10. Literární zdroje

1. Úvod

Cytogenetická analýza je významnou složkou prenatální diagnostiky. Využití molekulárně cytogenetických metod značně rozšiřuje možnosti identifikace různých abnormalit v genomu [1].

Jednou z těchto technologií je metoda SNP array. Je to metoda celogenomového screeningu s 1000krát větší rozlišovací schopností, než klasický karyotyp.

SNP array detekuje submikroskopické změny na úrovni rozlišení 10 kb s využitím přítomnosti polymorfismů v jednom nukleotidu (SNP; single nucleotide polymorphism) v genomu pacienta. Metoda je indikována jako prenatální i postnatální vyšetření v případech, kdy není možné jinou dostupnější metodou (karyotypování, FISH, QF PCR) odhalit příčinu patologického ultrazvukového nálezu u plodu, příčinu abnormálního fenotypu jedince nebo přesně identifikovat abnormalitu zjištěnou v karyotypu (event. v QF PCR) [2].

2. Současný stav studované problematiky

Prenatální diagnostika zahrnuje diagnostiku genetických chorob v průběhu těhotenství. Tyto informace mohou vést rodinu k rozhodnutí ohledně reprodukce, kterým může být i ukončení gravidity, anebo usnadní naplánování odpovídající lékařské, chirurgické či psychologické intervence [3].

Metody prenatální diagnostiky dělíme na neinvazivní a invazivní.

2.1. Neinvazivní vyšetření

2.1.1. Kombinovaný screening v I. trimestru (10-12. týden gravidity - t. g.)

– kombinace ultrazvukového měření šíjového projasnění u plodu (NT; nuchální translucence) a stanovení hodnot biochemických markerů v krvi matky (PAPP-A; pregnancy-associated plasma protein A a fβhCG; freeβ-human chorionic gonadotropin).

2.1.2. Screening mateřského séra ve II. trimestru – triple test (16. t. g.)

- stanovení tří markerů v krvi matky (AFP; α-fetoprotein, uE3; nekonjugovaný estriol, hCG; human chorionic gonadotropin).

Oba screeniny slouží ke stanovení rizika trizomie chromozómu 21 (T21; Downův syndrom), trizomie chromozómu 18 (T18; Edwardsův syndrom), trizomie chromozómu 13 (T13; Patauův syndrom) a defektu neurální trubice (NTD; neural tube defect).

Týdny gravidity pro odběr krve na screening jsou stanoveny podle kolísání jednotlivých biochemických markerů v průběhu gravidity: syntéza AFP prudce narůstá do 10-13. t. g., hCG do 11. t. g. [4].

Kalkulace rizika Downova syndromu je prováděna pomocí programu ALPHA od britské firmy Logical Medical Systems. Výsledky biochemického vyšetření a hodnoty NT jsou vztaženy k věku matky a gestačnímu týdnu.

2.1.3. Ultrazvukové vyšetření ve II. trimestru

– slouží k záchytu morfologických anomálií plodu, umožňuje přesné určení stáří plodu, identifikaci vícečetných těhotenství a potvrzení životaschopnosti plodu [4].

2.1.4. Izolace fetální DNA z mateřského séra

– neinvazivní prenatalní vyšetření na základě analýzy volné fetální DNA (cffDNA; cell free fetal DNA) v plazmě matky, detekující aneuploidie chromosomů 13, 18, 21, X a Y u plodu [5].

Fetální buňky se v mateřské periferní krvi vyskytují v nevýhodném poměru (1:10 000-1 000 000) a proto je technologicky obtížné jejich oddělení. Proto se přesunula pozornost k analýze cffDNA, rozptýlené v plazmě matky. Ta se vyskytuje v koncentraci téměř 25krát vyšší, než je k dispozici v jaderných buňkách, získaných ze stejného objemu mateřské krve [6].

Přítomnost cffDNA v mateřském séru byla objevena v roce 1997. Její koncentrace se zvyšuje s pokročilostí těhotenství (v I. trimestru do 3 %, ve III. trimestru až 6 %) [7].

Vyšetření se provádí zpravidla po 12. t. g.

2.2. Invazivní vyšetření

V prenatalní diagnostice se metoda analýzy chromozómů používá od sedmdesátých let a stala se hlavní technikou využívanou k detekci chromozomálních abnormalit. Bylo zjištěno, že materiál plodu může být kultivován k dosažení potřebného množství metafázních buněk a být tak využit ke stanovení karyotypu plodu. Na začátku II. trimestru gravidity se využívají amniocyty, v I. trimestru buňky choria. Tyto metody se za stálého vylepšování využívají dodnes [8].

2.2.1. Amniocentéza (AMC)

– ambulantní výkon, při kterém je transabdominálně jehlou odebrán vzorek plodové vody pod UZ kontrolou. Odběr se provádí optimálně mezi 16. a 18. t. g. Někdy se provádí i časná AMC a to již před 15. týdnem. Plodová voda obsahuje buňky fetálního

původu, které se dají pro diagnostické účely kultivovat a použít k chromozomálnímu i molekulárně genetickému vyšetření [9].

Tato metoda byla poprvé popsána v roce 1952. Od začátku šedesátých let se objevují zprávy o jejím postupném využití v rutinní praxi. V českých zemích byla AMC zavedena do praxe začátkem sedmdesátých let [4].

2.2.2. Biopsie choriových klků (CVS)

– odběr choriových klků se v současnosti provádí výhradně transabdominálně, optimálně ve 12-13. t. g. Klky jsou derivátem trofoblastu. K diagnostice se využívají buňky cytotrofoblastu a to spíše pro přímou metodu zpracování bez kultivace a mezenchymální buňky mezodermu, které lze využít při kultivaci ve tkáňové kultuře (rostou rychleji a formují vrstvu fibroblastů). První transcervikální biopsie choria byla provedena v Číně v roce 1975 pro určení pohlaví a vyšetření sexchromatinu [4].

2.2.3. Kordocentéza

– odběr pupečnickové krve pod UZ kontrolou. Většinou se provádí mezi 19. a 21. t. g. Tato metoda se využívá, pokud UZ vyšetření ukazuje nějakou abnormalitu plodu nebo pokud kultivace buněk z plodové vody selhala, či dala nejednoznačný výsledek. Kultivace buněk z fetální krve trvá 72 hodin [9].

2.2.4. Hlavní indikace invazivní prenatální diagnostiky [10]

1. vyšší věk matky (obvykle nad 35 let)
2. předchozí gravidita s plodem s *de novo* vzniklou chromozomální vadou
3. porod dítěte s vrozenou vývojovou vadou z předchozí gravidity
4. opakované spontánní aborty
5. přítomnost strukturální chromozomové vady u jednoho z rodičů
6. pozitivní biochemický screening v I. trimestru
7. patologický výsledek UZ vyšetření
8. dědičné onemocnění v rodinné anamnéze, které lze diagnostikovat nebo vyloučit biochemickým nebo DNA vyšetřením
9. expozice jednoho z rodičů mutagenním vlivům
10. psychologická indikace

2.2.4.1. Indikační kritéria pro použití SNP array

- abnormální UZ nález při normálním karyotypu
- nejasný nález v karyotypu (derivovaný chromosom, *de novo* nález marker chromozómu, *de novo* nález „balancované“ přestavby)

2.3. Metody využívané v cytogenetické laboratoři

2.3.1. Klasická cytogenetika – mikroskopické stanovení karyotypu

Přesný počet lidských chromozómů byl stanoven ve Švédsku, v roce 1956. V letech 1968-1970 byly tamtéž objeveny a zavedeny pruhovací techniky chromozómů. Tento objev vedl k přesné identifikaci každého chromozómu v karyotypu podle sledu silně a slabě se barvících pruhů [11].

Pomocí cytogenetického vyšetření je možné identifikovat aneuploidie a mnoho chromozomálních abnormalit. Konvenční cytogenetická analýza ale není schopná odhalit změny menší než 5-10 Mb. Kromě toho mikroskopická diagnostika chromozómů nemusí odhalit původ nadpočetných marker chromozómů a nemusí rozpoznat jemné přestavby subtelomerických oblastí chromozómů.

Nevýhodou této metody v prenatalní diagnostice je délka vyšetření, protože doba potřebná ke kultivaci amniocytů je zpravidla 10-14 dní [1]. (V rámci postnatální diagnostiky se kultivují lymfocyty periferní krve 72 hodin.)

V rámci prenatalní diagnostiky bylo karyotypování představeno v roce 1966, kdy bylo zjištěno, že chromozomální konstituce plodu může být stanovena analýzou kultivovaných buněk z plodové vody. O rok později byla odhalena první chromozomální aberace [12].

2.3.2. Molekulární cytogenetika

2.3.2.1. Fluorescenční In Situ Hybridizace (FISH)

V některých případech je možné doplnit vyšetření karyotypu metodou FISH.

Do laboratoří byla zavedena v roce 1988 [10]. Využívá specifických DNA sond, které hybridizují na interfázní jádra nebo metafázní chromozómy. Metoda umožňuje identifikovat některé konkrétní suspektní chromozomální abnormality nebo potvrdit klinické podezření na známé mikroleční syndromy [13]. (Např. vyšetření STS lokusu u nízkého estriolu ve II. trimestru nebo vyšetření Di-Georgova syndromu u srdečních vad.)

Její výhodou oproti karyotypování je, že k vyšetření nejsou potřeba metafázní chromozómy, ale dají se analyzovat i buněčná jádra v interfázi.

Nevýhoda spočívá v její specifčnosti, protože jednotlivá vyšetření jsou založena pouze na potvrzení nebo vyloučení určité konkrétní suspektní abnormality.

2.3.2.2. SNP array

Další alternativou pro stanovení diagnózy je metoda SNP array. Stala se základním rutinním diagnostickým nástrojem a postupně nahrazuje cytogenetické metody. Je to jedna z technologií celogenomového screeningu, která zvyšuje schopnost odhalit submikroskopické změny v počtu kopií – varianty v počtu kopií (CNVs; copy number variations) u pacientů s celkovým opožděným vývojem, mentální retardací, autismem, mnohočetnými vrozenými vývojovými vadami a dysmorfizmem, a stává se účinným pomocníkem v odhalování genetických chorob a v postnatální i prenatální diagnostice. Dále se uplatňuje ve výzkumu nádorů a v diagnostice, klasifikaci a prognostice různých malignit. Navíc tato metoda může odhalit CNVs nejasného významu roztroušené přes celý genom. Většina klinicky dostupných testovacích souprav je navrhována k detekci aneuploidií, mikrolečních a mikroduplikačních syndromů a subtelomeric-kých nebo jiných nebalancovaných přestaveb [14].







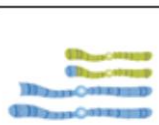
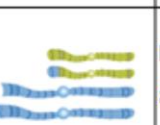
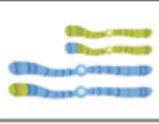
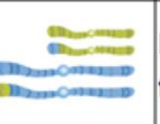
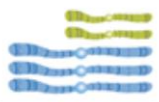
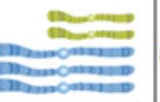

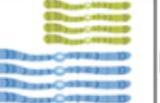
S pomocí SNP array dokážeme standardně zachytit chromozomální aberace o velikosti 10 kb. V rámci prenatální diagnostiky ji využíváme v případě závažného UZ nálezu, kdy karyotyp neodhalí žádnou aberaci, dále v případě nálezu některých typů nejasných chromozomálních aberací (určení marker chromozómů, derivovaných chromozómů apod.) [2].

Výhodou této metody oproti klasickému karyotypování je možnost vyšetření odebraného vzorku bez nutnosti kultivace, tj. po přímé izolaci DNA z nativní tkáně. To může výrazně zkrátit dobu mezi odběrem materiálu a získáním výsledku vyšetření. Metoda SNP array nedokáže odhalit balancované přestavby a mozaiky < 10%.

Porovnání diagnostických možností karyotypu a SNP array je shrnuto na obrázku 1.

Karyotyp

SNP array

	LOH UPD	-		LOH UPD	+
	mosaika	+		mosaika	$\frac{-}{+}$
	amplifikace	-		amplifikace	+
	nebalancovaná aberrace > 5 Mb	$\frac{-}{+}$		nebalancovaná aberrace	+
	balancovaná aberrace	+		balancovaná translokace	-
	aneuploidie	+		aneuploidie	+
	polyploidie	+		polyploidie	+

LOH – ztráta heterozygoty, UPD – inparentální dizomie

Obr. 1. Možnosti a limity mikroskopického hodnocení karyotypu a metody SNP array (Převzato z: Illumina Ultra Protocol Guide [15]).

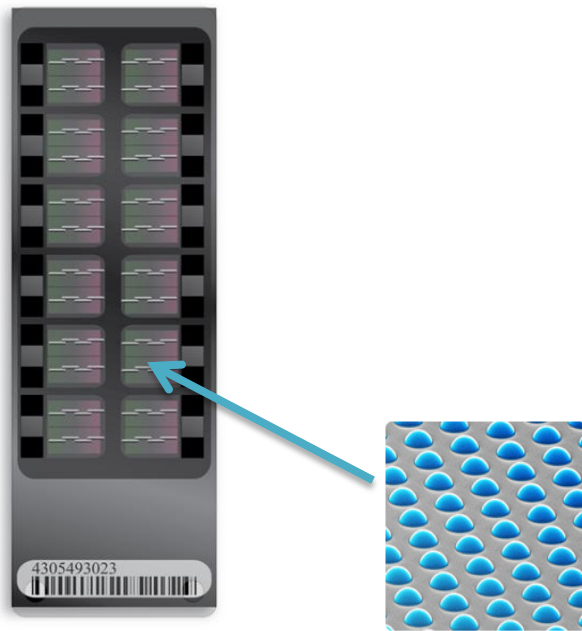
3. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je zhodnotit přínos molekulárně cytogenetické metody SNP array ve spektru ostatních genetických metod používaných v prenatální diagnostice. Zjistit její přednosti i limity a možnost jejího zavedení do rutinní praxe na pracovišti cytogenetické laboratoře Gennetu.

4. Materiál a metodika [16]

4.1. Princip metody SNP array

metoda využívá statisticky vybraná místa s jednonukleotidovým polymorfizmem (SNP) k diagnostice změn v genomu a to jednak početních (CNV) a jednak neutrálních z hlediska počtu kopií (ztráta heterozygoty). Po definované amplifikaci, fragmentaci, srážení a resuspendaci DNA je tato nanosena na vyšetřovací čip k hybridizaci s přítomnými vyšetřovacími oligonukleotidy (obr. 2). Po hybridizaci a naznačení hybridizovaných fragmentů jsou skenovaná data načtena do vyhodnocovacích programů. Software virtuálně srovnává pacientova data s definovanou skupinou dat získanou od srovnávací skupiny 200 jedinců. Po detekci změn v genomu je dalším srovnáváním s dostupnými mezinárodními genetickými databázemi (<http://genome.ucsc.edu>, www.ncbi.nlm.nih.gov/omim, <http://projects.tcag.ca/variation>, www.iscaconsortium.org, <http://decipher.sanger.ac.uk>) uzavřen výsledek vyšetření definující pro pacienta míru patogenity zjištěné změny.



Obr. 2. Illumina Human Cyto SNP-12 v 1.

12 vzorků (12 pacientů) na skle 300 000 SNP markerů přes celý genom, 1 marker každých 10 kb (v klinicky významných oblastech 1 marker každých 6 kb; na skle jsou do jamek umístěny kuličky z křemíku o velikosti 3 μm , pokryté stovkami tisíc kopií specifických oligonukleotidů

(Převzato z: <http://www.atlas-biolabs.de/illumina-human> [17]).

4.2. Přístroje, pomůcky, spotřební materiál

Hybridizační pec a Hybridizační komůrka

Mikrotitrační třepačka

Mikroinkubátor Hybex

Tavička a fólie na mikrotitrační destičky

Vodní lázeň

Komorový držák k vodní lázni a komůrky

Teploměr ke komorovému držáku

Vývěva membránová

Chlazená centrifuga

Skleněné a plastové kyvety

Stojánek na skla kovový a plastový

Automatické pipety a 8-kanálové pipety

Třepačka na mikrotitrační destičky

Stojánek na zkumavky a mikrozukumavky

Pipetovací vaničky pro multikanálové pipety

Mikrotitrační destičky 96 jamek a plastová víčka

Stlačený vzduch, nůžky, stopky, beztalkové rukavice, buničina

4.3. Reagencie a činidla

z větší části komerční kity firmy Illumina, u ostatních reagentů je doplněn dodavatel

1. den: denaturace, neutralizace, amplifikace

MA1, MA2, MSM – uložení při -15 až -25 °C

0,1N NaOH - uložení při 2 až 8°C

2. den: fragmentace – **FMS** - uložení při -15 až -25 °C

precipitace – **PM1** – uložení při 2 až 8 °C

100% 2-propanol – uložení při 20 až 25 °C (Sigma Aldrich)

resuspendace – **RA1** – uložení při -15 až -25 °C

hybridizace – **PB2** – uložení při 2 až 8 °C

3. den: odmyváání a barevné značení

PB1, XC3, XC4, absolutní ethanol p.a. - uložení při 20 až 25 °C

RA1, XC1, XC2, TEM, STM, ATM – uložení při -15 až -25 °C

95% formamid / 1mM EDTA - uložení při -15 až -25 °C

4.4. Pracovní postup

Vlastní laboratorní práce probíhá 4 pracovní dny:

1. den - amplifikace DNA metodou izotermní definované PCR reakce.
2. den – fragmentace, precipitace, resuspendace DNA a její nanesení na čip k hybridizaci.
3. den - odmytí čipu, značení hybridizovaných fragmentů DNA a předání ke skenování.
4. den - předání hrubých skenovaných dat, načtení do programu a individuální hodnocení každého pacienta (řádově hodiny).

4.4.1. Příjem a kvantifikace vzorku DNA

DNA k vyšetření je izolována v laboratoři molekulární genetiky přímo z periferní nebo pupečnickové krve, plodové vody, choriových klků a abortů nebo z kultivovaných buněk z plodové vody a choriových klků sklizených po kultivaci v cytogenetické laboratoři. Před zařazením DNA do vlastního vyšetření na čipu je zkontrolována koncentrace a kvalita DNA přeměřením na přístroji Nanodrop od firmy Thermo Scientific, aby vyhovovaly kvalitě doporučené v metodice laboratorní přípravy - tj. koncentrace 50–100 ng/μl a čistota 1,9–2,2 (A260nm/A280nm). V případě potřeby je provedeno ředění vzorku DNA 1x Tris EDTA pufrům.

4.4.2. Rozvržení vyšetření

U postnatálních případů je vyšetření SNP array indikováno u pacientů, kterým nebyla jinými dostupnějšími metodami (karyotypování, FISH, molekulární genetiky) zjištěna příčina fenotypových odchylek. Prenatální SNP array vyšetření je prováděno ve statimovém režimu a rovněž v případech, kdy nelze jinými metodami detekovat patologickou změnu v genomu plodu. Vždy je k vyšetření požadován výsledek karyotypování a podrobný klinickogenetický přehled o fenotypu nebo ultrazvukovém nálezů u plodu.

Teprve po kompletaci zpráv a příslušné DNA je vzorek DNA zařazen do plánovače vyšetření SNP array v databázi.

Podle plánovače je vytvořeno schéma umístění vzorků DNA na pracovní destičce a následně na čipu, které jednoznačně identifikuje každý vzorek. Vzorky DNA jsou rozpipetovány v objemu 8 μ l do popsaných sterilních PCR mikrozkušavek podle plánované pozice na destičce.

4.4.3. Denaturace, neutralizace a amplifikace DNA (1. den)

- Před zahájením práce zajistíme předehřátí hybridizační pece Illumina na teplotu 37°C, rozmrazení komerčně dodaných roztoků s označením MA1, MA2 a MSM. Roztoky jsou i s roztokem 0,1N NaOH nahřáty na pokojovou teplotu (RT), otočením zkumavky promíchány a pulsně stočeny k odstranění potenciálních drobných bublinek.
- Do mikrotitrační destičky je na místa plánovaných vzorků napipetováno multikanálovou pipetou 20 μ l roztoku MA1.
- Z připravené destičky se vzorky DNA seřazenými identicky s plánovačem jsou do mikrotitrační destičky poté napipetovány postupně 4 μ l všech vzorků DNA.
- Do každého místa se vzorkem v mikrotitrační destičce jsou napipetovány 4 μ l roztoku 0,1N NaOH k zajištění optimální denaturace.
- Mikrotitrační destička je překryta a utěsněna víčkem a poté centrifugována 1 min/280 g.
- Destička je vortexována při 1600 rpm po dobu 1 minuty a inkubována 10 minut při RT.
- Ke vzorkům na destičce je multikanálovou pipetou přidáno 34 μ l roztoku MA2 k neutralizaci a promícháno opakovaným nasáváním.
- Ke vzorkům je přidáno 38 μ l roztoku MSM obsahujícího amplifikační master mix.
- Po překrytí destičky víčkem v příslušné orientaci je tato vortexována 1 min/1600 rpm, stočena na centrifuze (1 min/280 g) a uložena do předehřáté hybridizační pece (37 °C) s nastaveným pomalým promícháváním (stupeň 5) na 20-24 hodin k amplifikaci DNA.

4.4.4. Fragmentace, precipitace, resuspendace a zahájení hybridizace (2. den)

Fragmentace

- Před zahájením práce je provedeno rozmrazení, promíchání a pulsní centrifugace roztoku s označením FMS obsahujícího enzym k zajištění definované fragmentace.
- Mikroinkubátor s adaptérem na mikrotitrační destičky nahřejeme na 37 °C.
- Mikrotitrační destička je vyjmuta z hybridizační pece a centrifugována 1 min/50 g.
- Ke každému vzorku je multikanálovou pipetou přidáno 25 µl roztoku FMS, destička je překryta víčkem, vortexována 1min/1600rpm a poté centrifugována 1 min/50 g.
- Destička je uložena na 1 hodinu na ohřívací bloček (37 °C).

Precipitace fragmentované DNA

- Před zahájením práce je promíchán a pulsně centrifugován roztok s označením PM1.
- Ke každému vzorku na destičce je multikanálovou pipetou přidáno 50 µl roztoku PM1. Součástí roztoku je i dextran, způsobující vyšší viskozitu. Je nutné dbát na dobré promíchání opakovaným nasáváním a vypouštěním.
- Destička je překryta víčkem, vortexována 1 min/1600 rpm a na ohřívacím bločku inkubována 5 min při 37 °C.
- Po inkubaci je destička centrifugována 1 min/50 g.
- Ke vzorkům je přidáno 155 µl 100% 2-propanolu.
- Destička je pečlivě uzavřena novým plastovým víčkem a pomalým překlápěním (20x) jsou vzorky promíchány s 2-propanolem.
- Destička se vzorky je ponechána 30 minut v lednici při 4°C.
- Během této doby je nastaveno vychlazení centrifugy na 4°C.
- Destička je 25 minut centrifugována při 3000 g při 4 °C k získání optimální pelety s vysráženou DNA.
- Po centrifugaci je supernatant rychle slit obrácením destičky a zbytek supernatantu je odstraněn vyklepáváním destičky na savý materiál (buničinu). Je zkontrolována přítomnost modrých pelet u dna jamek na destičce.

- Destička je v obrácené poloze ponechána vysychat na laboratorním stojánku po dobu 1 hodiny při RT.

Resuspendace vysrážené DNA

- Hybridizační pec zahřejeme na 48 °C.
- Tavičku zapneme 20 minut před použitím.
- Roztok RA1 je nutno rozmrazovat v dostatečném předstihu (ráno před zahájením práce).
- Do každé jamky s peletou je přidáno 23 µl roztoku RA1. Nepromícháváme!
- Přes destičku je přiložena aluminiová folie (matnou stranou dolů) a tavičkou přitavena na destičku.
- Destičku umístíme do hybridizační pece (48 °C) a necháme 1 hodinu rozpouštět pelety (bez míchání).
- Poté destičku vortexujeme 1 min/1800 rpm a pulsně centrifugujeme (280 g).

Hybridizace

- Připravíme zahřátou hybridizační píčku (48 °C) a mikroinkubátor nastavíme na 95 °C.
- Složíme hybridizační komůrku a do jamek uvnitř napipetujeme zvlhčující pufr PB2. Komůrku uzavřeme, aby se mohla nasytit vlhkostí.
- Destičku s resuspendovanými vzorky umístíme na 20 minut na ohřívací bloček (95 °C) a necháme probíhat denaturaci.
- Destičku poté vyjmeme a necháme 20 minut chladnout na pokojovou teplotu.
- Během této doby vyndáme čipy z lednice, ale necháme je zabalené.
- Destičku poté centrifugujeme 1 min/280 g.
- Podle plánovače rozbalíme příslušný čip a zkontrolujeme jeho čárový kód.
- Po stažení folie z destičky nasajeme multikanálovou pipetou 18 µl vzorku DNA a naneseeme plynule do otvorů na čipu určených pro aplikaci vzorků.
- Po aplikaci vzorků na všechny čipy přeneseme čipy na nosiči do hybridizační komůrky a pečlivě ji uzavřeme.
- Komůrku umístíme na podložku do hybridizační pece (kývání podložky stupeň 5) a necháme probíhat hybridizaci 16 až 24 hodin při 48 °C.

- Pro práci na další den připravíme roztok XC4 přidáním 330 ml absolutního ethanolu do lahve s tímto roztokem a prudce třepáním promícháme.

4.4.5. Odmytí a barevné značení čipů (3. den)

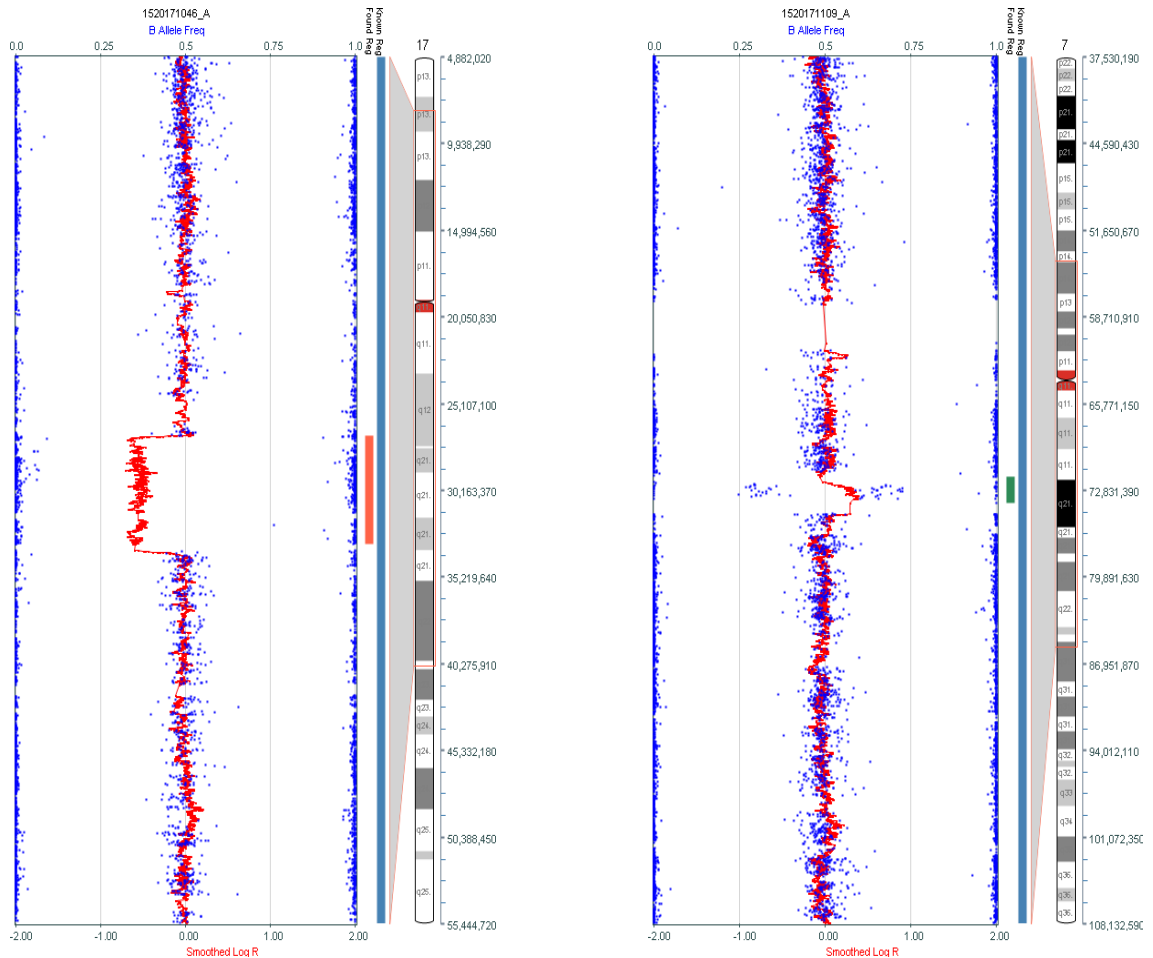
Příprava skel na odmyváání a značení

- Zapneme vodní lázeň, nastavíme teplotu na 44 °C a zapneme vodní cirkulaci, která vyhřívá komorový držák pro odmyváání a barvení skel. Do komorového držáku umístíme čidlo externího teploměru k sledování aktuální teploty při promýváání.
- Dáme rozmrazit barvicí set (30 minut před vyndáním čipů z hybridizační komory).
- Naplníme 2 skleněné kyvety 200 ml roztoku PB1.
- Naplníme speciální vaničku (Bead Chip Alignment) pro umístění čipů k odmyváání 150 ml roztoku PB1.
- Vyndáme hybridizační komůrku s čipy z hybridizační pece a necháme 25 minut stát při pokojové teplotě.
- Do první kyvety s 200 ml PB1 připravíme kovový stojánek na sklíčka.
- Čipy vyndáme z hybridizační komůrky a opatrně sloupneme folii, která překrývá sklíčko se vzorky (diagonálně směrem od čárového kódu).
- Sklíčko okamžitě přeneseme do stojánku v 1. kyvetě s PB1.
- Provedeme se všemi skly a ujistíme se, že jsou všechna ponořena do PB1.
- Stojánkem se sklíčky pohybujeme v pufu PB1 nahoru dolů 1 minutu.
- Přesuneme stojánek se skly do 2. kyvety s PB1.
- Stojánkem se skly pohybujeme nahoru dolů 1 minutu.
- Skla přendáme do připravených kovových rámečků zafixovaných v Bead Chip Alignment.
- Přes sklo položíme jemný průsvitný rámeček ze speciální folie.
- Skleněným krytem zakryjeme sklo zafixované v kovovém rámečku a orámované folií (sklo musí být orientováno sešikmenou plochou k čárovému kódu, aby vytvářelo otvor pro plnění odmyvacích roztoků).
- Kovovými svorkami sepneme sklo v rámečku a se skleněným krytem.

Odmývání a barevné značení

- Vodní lázeň se zapnutou cirkulací by měla být v ustálené teplotě 44 °C.
- Rozpuštěné a otočením promíchané reagentie v barvicím setu stočíme 3 min/3000 g.
- Pokud je vše připraveno, můžeme umístit skla v rámečku do komorového držáku, který je součástí vodní lázně.
- Do otvorů mezi sklem a skleněným krytem přidáváme odmývací a barvicí roztoky v následujícím pořadí:
 - 150 µl RA1, inkubujeme 30 sekund, opakujeme 5x.
 - 450 µl XC1, inkubujeme 10 minut.
 - 450 µl XC2, inkubujeme 10 minut.
 - 200 µl TEM, inkubujeme 15 minut.
 - 450 µl 95% formamid/1mM EDTA, inkubujeme 1 minutu, opakujeme 1x, inkubujeme 5 minut.
- Nastavíme vodní lázeň na teplotu uvedenou výrobcem na zkumavce s roztokem STM (většinou 32 °C).
 - 450 µl XC3, inkubujeme 1 minutu, opakujeme 1x.
 - Čekáme, dokud se teplota neustálí na 32 °C.
 - 250 µl STM, inkubujeme 10 minut.
 - 450 µl XC3, inkubujeme 1 minutu, opakujeme 1x, čekáme 5 minut.
 - 250 µl ATM, inkubujeme 10 minut.
 - 450 µl XC3, inkubujeme 1 minutu, opakujeme 1x, čekáme 5 minut.
 - 250 µl STM, inkubujeme 10 minut.
 - 450 µl XC3, inkubujeme 1 minutu, opakujeme 1x, čekáme 5 minut.
 - 250 µl ATM, inkubujeme 10 minut.
 - 450 µl XC3, inkubujeme 1 minutu, opakujeme 1x, čekáme 5 minut.
 - 250 µl STM, inkubujeme 10 minut.
 - 450 µl XC3, inkubujeme 1 minutu, opakujeme 1x, čekáme 5 minut.
- Okamžitě vyndáme skla v rámečcích z komory a položíme skla horizontálně na laboratorní stůl.
- Nalijeme 310 ml PB1 do plastové kyvety a vložíme plastový stojánek na skla.
- Uvolníme čipy odstraněním kovových svorek a skleněného krytu a vložíme je do stojánku v PB1 pufu.

- Pomalu pohybujeme stojánkem nahoru dolů 10x, poté jej ponecháme stát 5 minut v kyvetě.
- Nalijeme 310 ml dobře promíchaného roztoku XC4 do další plastové kyvety.
- Přemístíme stojánek s čipy do kyvety s XC4.
- Pomalu pohybujeme stojánkem nahoru dolů 10x, poté jej ponecháme stát 5 minut v kyvetě.
- Vyndáme čipy ze stojánku na skla v kyvetě a položíme je na stojánek na zkumavky v horizontální poloze.
- Stojánek s položenými čipy vložíme do membránové vývěvy a přikryjeme víkem.
- Zapneme odsávání v membránové vývěvě a necháme skla schnout 55 minut.



A

B

Obr. 3. Příklady strukturálních aberací vyhodnocených v karyostudiu Illumina

A – delecce, B – duplikace

Log R ratio – červená linka (dolní měřítko): Log R ratio = 0 / není změna počtu kopií;
Log R ratio < 0 / delecce; Log R ratio > 0 / duplikace

B allele frequency – modré body (horní měřítko): frekvence alely B = 0 / genotyp AA;
frekvence alely B = 0,5 / genotyp AB; frekvence alely B = 1 / genotyp BB

(Převzato z: Illumina Ultra Protocol Guide [15]).

5. Výsledky

Do zkoumaného souboru jsou zařazeny vzorky prenatalního původu (AMC a CVS), které byly vyšetřeny v cytogenetické laboratoři pracoviště Gennet v letech 2010-2013. Celkem bylo vyšetřeno 8095 vzorků plodové vody, z čehož bylo 237 (2,9 %) s patologickým nálezem v karyotypu. Z toho 73 aberací by nebylo detekovatelných metodou SNP array (nejčastěji se jedná o balancované translokace a inverze). Vzorků choriové tkáně bylo vyšetřeno celkem 693, z čehož bylo 186 (26,8 %) patologií. Z toho 9 by metoda SNP array neodhalila.

Počet patologických nálezů v karyotypu v poměru k počtu odebraných vzorků za jednotlivé roky je uveden v tabulce 1. V některých případech se jednalo pouze o potvrzení patologického nálezu z QF PCR, prováděného laboratoří molekulární genetiky, což není ve výsledcích přesněji specifikováno.

Přehled aberací nezachytitelných metodou SNP array je podrobně popsán v tabulce 2.

Tab. 1: Celkový počet prenatalních vyšetření v období 2010-2013 spolu se záchytem patologických nálezů v karyotypu

	AMC	CVS
2010	2728	161
z toho patologií	79 (2,9 %)	43 (26,7 %)
2011	2166	157
z toho patologií	54 (2,5 %)	38 (24,2 %)
2012	1756	185
z toho patologií	58 (3,3 %)	62 (33,5 %)
2013	1445	190
z toho patologií	46 (3,2 %)	43 (22,6 %)
2010-2013	8095	693
z toho patologií	237 (2,9 %)	186 (26,8 %)

Tab. 2: Aberace nezachytitelné metodou SNP array

	AMC				CVS			
	balanc. translokace	inverze	mozaika ≤ 10%	marker	balanc. translokace	inverze	mozaika ≤ 10%	marker
2010	21	6	-	2	1	1	-	-
2011	9	4	1	1	2	1	-	-
2012	13	5	-	2	1	2	-	-
2013	5	2	1	1	-	1	-	-

Vzorky se závažným UZ nálezem, u kterých byl výsledek karyotypu normální, byly podrobeny dalšímu vyšetření metodou SNP array. V období předcházejících čtyř let jich bylo v případě AMC 394, z toho se ukázalo jako patologických dalších 26 (6,6 %). V případě CVS bylo vyšetřeno 93 vzorků, z toho byly patologické 4 (4,3 %).

To představuje dalších 6,2 % patologických submikroskopických změn. Přehled počtu patologických nálezů v poměru k počtu vyšetřených vzorků za jednotlivé roky je uveden v tabulce 3.

Tab. 3: Záchyt patologických nálezů metodou SNP array při normálním karyotypu v poměru k celkovému počtu vyšetření

	AMC	CVS
2010	74	15
z toho patologíí	7 (9,5 %)	1 (6,5 %)
2011	67	14
z toho patologíí	5 (7,5 %)	0
2012	110	16
z toho patologíí	9 (8,2 %)	1 (6,3 %)
2013	143	48
z toho patologíí	5 (3,5 %)	2 (4,2 %)
2010-2013	394	93
z toho patologíí	26 (6,6 %)	4 (4,3 %)

Pro ilustraci jsou v tabulce 4 uvedeny časté UZ nálezy (ve výše uvedeném období) s různým stupněm závažnosti a jejich souvislost se submikroskopickými změnami v karyotypu. Nejčastějším důvodem patologických nálezů SNP array metody v prenatalní diagnostice jsou vady CNS, srdeční vady a tzv. mnohočetné vady.

Tab. 4: Souvislost patologických nálezů odhalených metodou SNP array s nálezy při UZ vyšetření.

Indikace	Počet indikací k AMC/patologie	Počet indikací k CVS/patologie
srdeční vada	71/6	12/0
CNS	48/5	4/0
IUGR	31/1	2/0
kostní dysplazie	38/2	2/0
GIT	24/1	5/0
orofaciální rozštěp	31/2	0/0
NT	31/2	50/3
UGT	32/2	0/0
brániční hernie	4/0	1/0
mnohočetné vady	29/5	5/1
<i>zbytek jsou jiné</i>		
<i>(např. screening)</i>		

CNS – centrální nervový systém, IUGR – intrauterinní růstová retardace, GIT – gastrointestinální trakt, NT – šjové projasnění, UGT – urogenitální trakt

červeně jsou označeny indikace, u kterých je z dosavadních poznatků žádoucí provést vyšetření metodou SNP array.

6. Diskuze

V letech 2010-2013 bylo v cytogenetické laboratoři Gennetu vyšetřeno metodou SNP array celkem 487 prenatalních vzorků. Klinicky významná patologická aberace byla nalezena u 30, respektive 6,2 % plodů s normálním karyotypem. Toto zjištění odpovídá publikovaným datům z jiných pracovišť: 6 % [18], 6,5 % [19], 6,8 % [20].

Nejčastější indikací k metodě SNP array byla u CVS zvýšené šíjové projasnění. U vzorků AMC to bylo celé spektrum patologických ultrazvukových nálezů, přičemž nejčastější indikací byly srdeční vady, vady CNS a kostní dysplazie. Největší záchyt patologií byl u plodů s mnohočetnými vadami. Podobné závěry byly opakovaně publikovány [18, 19, 20, 21] a ukazuje se, že u výše uvedených indikací je opodstatněné doplnit vyšetření o SNP array.

Výstup ze všech provedených vyšetření v kombinaci QF PCR, karyotyp, SNP array (případně FISH) vede k zamyšlení, jak nejefektivněji využít výhody jednotlivých metod a naopak jak nejvíce eliminovat jejich nedostatky.

V případě CVS by mohlo být výhodné provádět vyšetření v kombinaci QF PCR – SNP array a to vzhledem k relativně malému počtu těchto vyšetření (oproti AMC) a současně velké efektivitě zachytu patologických nálezů již při QF PCR (většinu patologických nálezů u choriových klků tvoří aneuploidie). Ostatní závažné aberace by odhalila metoda SNP array. Samozřejmě zde zůstává malá část aberací, které by takto zůstaly neodhaleny. Jedná se ale většinou o balancované aberace bez projevu ve fenotypu. Ty mohou pochopitelně do budoucna znamenat problémy s reprodukcí, ale v daném okamžiku nejsou ohrožující život ani zdraví plodu.

V této kombinaci metod bychom si vystačili s velmi malým množstvím vzorku (5mg). Další praktický detail hovořící pro tuto variantu je časová náročnost přípravy vzorku ke kultivaci po jeho příchodu do laboratoře a následně i vlastní délka kultivace do té doby, než je možné kulturu zpracovat a zhotovit karyotyp.

U vzorků AMC se zdá být výhodné postupovat jako dosud, tedy QF PCR, karyotyp, případně SNP array. Hlavní důvod je větší podíl „neodhalitelných“ aberací SNP array metodou. Dalším důvodem je vyšší finanční náročnost metody SNP array, což u tak velkého počtu vyšetření není zanedbatelné.

7. Závěr

Z výše uvedených skutečností vyplývá, že metoda SNP array je jednoznačně přínosem v prenatalní diagnostice. V obsáhlém souboru námi vyšetřených pacientů jsme odhalili dalších 6,2 % patologických nálezů, souvisejících s projevem ve fenotypu. V rámci možností a omezení jednotlivých cytogenetických a molekulárně genetických metod se metoda SNP array jeví jako vhodný diagnostický doplněk.

8. Seznam zkratk

AFP: α -fetoprotein

AMC: aminocentéza (tj. odběr plodové vody)

bp: pár bazí (base pair)

cffDNA: volná fetální DNA (cell-free foetal DNA)

CNS: centrální nervová soustava (central nervous systém)

CNV: variabilita počtu kopií (copy number variation)

CVS: biopsie choria (chorionic villi sampling)

DNA: deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

FISH: fluorescenční in situ hybridizace (fluorescent in situ hybridisation)

f β hCG: volná β podjednotka hCG (free β -human chorionic gonadotropin)

GIT: gastrointestinální trakt

hCG: lidský choriogonadotropin (human chorionic gonadotropin)

IUGR: intrauterinní růstová retardace (intrauterine growth restriction)

kb: kilobáze (tj. tisíc párů bází)

LOH: ztráta heterozygosity (lost of heterozygosity)

Mb: megabáze (tj. milion párů bází)

NT: šíjové projasnění (tj. nuchální translucence; nuchal translucency)

NTD: defekt neurální trubice (neural tube defect)

PAPP-A: specifický těhotenský plazmatický protein A (pregnancy-associated plasma protein A)

PCR: polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

QF PCR: kvantitativní fluorescenční PCR (quantitative fluorescence PCR)

RT: laboratorní teplota (room temperature)

SNP: polymorfismus v jednom nukleotidu (single nucleotide polymorphism)

t. g.: týden gravidity

uE3: nekonjugovaný estriol (unconjugated estriol)

UGT: urogenitální trakt

UPD: uniparentální dizomie (uniparental disomy)

UZ: ultrazvuk

9. Terminologie

Array metoda: vyšetřovací metoda využívající hybridizace testované DNA na oligonukleotidové sondy imobilizované na vyšetřovacím skle (čipu).

B allele frequency – frekvence alely B: numericky definovaná přítomnost alely B, na základě které lze určit genotyp pro každý SNP.

CNV – Copy Number Variation – varianta v počtu kopií: strukturní změna lišící se rozsahem a typem změny (delece nebo duplikace) a svým klinickým významem (patogenní, nepatogenní, nejasného významu).

Log R ratio: veličina vyjadřující logaritmičtě zpracované porovnání intenzity fluorescence ve vyšetřovaném místě oproti standardní hodnotě. Slouží k vyjádření úbytku nebo nadbytku genetického materiálu v daném vyšetřovaném místě.

Marker chromozóm – malý nadpočetný chromozóm (část chromozómu), jehož původ nelze mikroskopicky zjistit.

Sexchromatin (Barrovo tělísko) – barvitelné tělísko uvnitř buněčného jádra, jeden ze dvou X chromozómů zůstávající v kondenzovaném stavu, geneticky inaktivní.

SNP – Single Nucleotide Polymorphism: přítomnost jednonukleotidové variability v řetězci DNA, která neovlivňuje funkci genu resp. není mutací.

Metoda **SNP array:** celogenomová analýza využívající statisticky vhodně vybranou kombinaci SNPů k diagnostice změn v genomu na submikroskopické úrovni. Díky využití kombinace dvou veličin (Log R ratio a B allele frequency) je možné posuzovat jednak kvantitativní změnu v genomu (delece, duplikace), ale i změnu neutrální v počtu kopií (ztrátu heterozygoty).

10. Literární zdroje

- [1] Shaffer LG, Bui T-H (2007) Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. *American Journal of Medical Genetics*. 145C, 87–98.
- [2] Bečvářová V, Hynek M, Putzová M, et al. (2011) Aplikace metody SNP array v prenatalní diagnostice. *Česká gynekologie*. 76(4), 261 – 267.
- [3] Pritchard DJ, Korf BR (2007) *Základy lékařské genetiky*. 1. vydání, Galén, Praha, 182 stran.
- [4] Hájek Z, Kulovaný E, Macek M (2000) *Základy prenatalní diagnostiky*. 1. vydání, Grada, Praha, 424 stran.
- [5] Zimmermann B, Hill M, Gemelos G, et al. (2012) Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenatal Diagnosis*. 32, 1233-1241.
- [6] Norwitz ER, Levy B (2013) Noninvasive prenatal testing: The future is now. *Reviews in Obstetrics and Gynecology*. 6, 48-62.
- [7] Neinvazivní vyšetření plodu z volné fetální DNA. [cit. 2014-02-24]. Dostupné z: <http://www.fnbrno.cz/cffdna/f1319>
- [8] Evangelidou P, Alexandrou A, Moutafi M, et al. (2013) Implementation of high resolution whole genome array CGH in the prenatal clinical setting: advantages, challenges and review of the literature. *BioMed Research International*, 2013, 14 stran.
- [9] Thompson & Thompson (2004) *Klinická genetiky*. 6. vydání, Triton, Praha, 426 stran.
- [10] Kočárek E (2007) *Molekulární biologie v medicíně*. 1. vydání, NCO NZO, Brno, 218 stran.
- [11] Michalová K (1999) *Úvod do lidské cytogenetiky*. 1. vydání, NCO NZO, Brno, 172 stran.

- [12] Zuffardi O (2011) Array technology in prenatal diagnosis. *Seminars in fetal & neonatal medicine*, 16(2), 94-98.
- [13] Vermeesch JR, Fiegler H, de Leeuw N, et al. (2007) Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *European Journal of Human Genetics*. 15(11), 1105 – 1114.
- [14] Shinawi M, Cheung SW (2008) The array CGH and its clinical applications. *Drug Discovery Today*, 13(17-18), 760-770.
- [15] Illumina Ultra Protocol Guide
- [16] SOP-CL-12 Gennet. SNP array – prenatální a postnatální diagnostika
- [17] <http://www.atlas-biolabs.de/illumina-human> [cit. 2014-03-02]
- [18] Wapner RJ, Martin CL, Levy B, et al. (2012) Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *The New England Journal of Medicine*. 367(23), 2175-2184.
- [19] Shaffer LG, Dabell MP, Fisher AJ, et al. (2012) Experience with microarray-based comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis in over 5000 prenatal pregnancies. *Prenatal Diagnosis*. 32(10), 976-985.
- [20] Fiorentino F, Napoletano S, Caiazzo F, et al. (2013) Chromosomal microarray analysis as a first-line test in pregnancies with a priori low risk for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *European Journal of Human Genetics*. 21(7), 725-730.
- [21] Faas BH, Feenstra I, Eggink AJ, et al. (2012) Non-targeted whole genome 250K SNP array analysis as replacement for karyotyping in fetuses with structural ultrasound anomalies: evaluation of a one-year experience. *Prenatal Diagnosis*. 32(4), 362-370.