Abstrakt

Zešikmení inaktivace chromozomu X je často studováno v souvislosti s projevy X-vázaných onemocnění u žen, přičemž u většiny chorob není vliv míry zešikmení na fenotyp zcela objasněn. Převážná část studií pro určení poměru inaktivace chromozomů X využívá metody založené na methylačně senzitivní restrikci, nejčastěji konkrétně metodu HUMARA, která vychází z profilu methylace v genu *AR*. Nicméně tento způsob testování má některé své nevýhody, a proto jsou stále hledány nové metodické přístupy.

V naší práci jsme ve skupině 54 žen stanovovali míru zešikmení X inaktivace z DNA izolované z krevních buněk a v některých případech také z bukálních stěrů pomocí methylačně senzitivní restrikce v lokusech *AR, CNKSR2* a *RP2*. U 32 z těchto žen, u nichž bylo možné z krve izolovat celkovou RNA, jsme využili též metodu, která je založena na kvantifikaci transkriptu pomocí paralelního sekvenování, přičemž k analýze jsme použili polymorfismy *LAMP2* c.156A>T, *IDS* c.438C>T a *ABCD1* c.1548G>A.

Nejvíce informativní metodou v námi studované skupině byla methylačně senzitivní restrikce v lokusu *RP2* (71 %), a to i díky malému počtu „stutter“ vrcholů vznikajících při PCR. Přibližně stejné množství žen (69 %) bylo informativních v lokusu *AR*. Při porovnání výsledků těchto dvou metod jsme však v některých případech zaznamenali rozdíly přesahující až hodnotu 10 %. Podobně i při srovnání s hodnotami získanými metodou kvantifikující transkript pomocí jednotlivých polymorfismů (které vykazovaly též poměrně vysokou informativnost v rozmezí 40 – 62 %), byly výsledky zpravidla ve velmi dobré shodě, nicméně i zde se u několika žen stanovené hodnoty výrazně lišily. Intervaly shody použitých metod vymezené pro námi studovanou skupinu tak měly u většiny porovnání rozsah okolo 20 %. Předpokládáme, že hlavní příčinou pozorovaných rozdílů jsou nepřesnosti v měření, které se projevily při stanovení koeficientu opakovatelnosti, přičemž se zdá, že metoda využívající paralelní sekvenování poskytuje reprodukovatelnější výsledky než analýza založená na methylačně senzitivní restrikci.

Metoda paralelního sekvenování je tedy na základě našich závěrů vhodná ke stanovení míry zešikmení X inaktivace ve výzkumu i klinické praxi. Pro spolehlivé určení poměru inaktivace chromozomů X však pro všechny metody doporučujeme vycházet alespoň ze dvou měření a v ideálním případě stanovení opakovat různými metodami.

Klíčová slova: inaktivace chromozomu X, zešikmení X inaktivace, HUMARA, paralelní sekvenování