VYUŽITÍ SUBTELOMERICKÉ FISH PŘI GENETICKÉM VYŠETŘENÍ PACIENTŮ S MENTÁLNÍ RETARDACÍ

Jana Drábová

Studijní program: Biologie

Bakalářská práce odevzdávaná jako součást naplnění požadavků na získání titulu

Bakalář (Bc.)

Univerzita Karlova

2006

UNIVERZITA KARLOVA

VÝTAH

VYUŽITÍ SUBTELOMERICKÉ FISH PŘI
GENETICKÉM VYŠETŘENÍ PACIENTŮ
S MENTÁLNÍ RETARDACÍ

Jana Drábová

Konzultant nebo odborný poradce: RNDr. Drahuše Novotná
ÚBLG 2. LF UK a FN Motol

RNDr. Jiří Škvor, CSc.
Katedra Antropologie a genetiky člověka PřF UK

Etiologie výskytu mentální retardace zůstává u většiny pacientů neobjasněná. Jednou z možných příčin jsou přestavby v subtelomerických oblastech chormozómů. Ty bývají nalezeny přibližně u 7% vyšetřovaných pacientů. Jednotlivé práce se v procentu zachycených přestaveb liší. Tato situace je způsobena zejména nejednotností výběrových kritérií. V některých pracích lze též pozorovat odlišné metodické přístupy. Většina prací se však stále odvolává na výsledky získané pomocí FISH (Fluorescenční *in situ* hybridizace). A to ať jako základní vyšetřovací metody či jako metody referenční při ověřování výsledků získaných jinou metodou. Díky stále rostoucímu počtu vyšetřených pacientů a jejich klinickému popisu se v poslední době podařilo z velké skupiny subtelomerických přestaveb vyčlenit ty, které jsou svým fenotypickým projevem rozpoznatelné od ostatních, a popsat je jako samostatné syndromy. Stále však zůstává mnoho přestaveb, jejichž záchyt je jen ojedinělý a jejich charakterizace proto velmi obtížná.

OBSAH

Obsah i
Seznam obrázků ii
Seznam tabulek iii
Poděkování iv
Prohlášení v
Úvod 1
Kapitola 1 2
1 Stavba a popis subtelomery 2
Kapitola 2 4
2 Metody využívané k detekci subtelomerických přestaveb 4
2.1. Využití DNA polymorfizmu 4
2.2. Cytogenetické pruhovací techniky 5
2.3. Fluorescence In Situ Hybridisation (FISH) 6
2.4. Dvanáctibarevná subtelomerická FISH – 12-color FISH asssay (M-TEL) 8
2.5. Comparative Genomic Hybridisation (CGH) 9
2.6. Spektrální karyotypování (SKY) 12
2.7. Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation (MAPH) 13
2.8. Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) 14
Kapitola 3 16
3 Využití Subtelomerické FISH u pacientů s mentální retardací 16
3.1. Výběrová kriteria – Checklist 17
Závěr 23
Seznam použité literatury: 24
Rejstřík 27

SEZNAM OBRÁZKŮ

Číslo *Stránka*
Obrázek 1: Stavba chromozómu (převzato z presentace *Joan HM Knoll, 2003*) 2
Obrázek 2: Stavba konce chromozómu (převzato z presentace *Joan HM Knoll, 2003* a upraveno) 3
Obrázek 3: Chromozómy v metafázi při G-pruhování (převzato z presentace *Joan HM Knoll, 2003*) 5
Obrázek 4: Mužský karyotyp – rozlišení více než 550 pruhů (pomocí HRT) – u chromozómu 1 pro srovnání klasické G-pruhy s rozlišením 450 pruhů (převzato z presentace *Joan HM Knoll, 2003*) 6
Obrázek 5: Princip FISH (převzato z presentace *Joan HM Knoll, 2003*) 7
Obrázek 6: Výsledek FISH – pacient s delecí chromozómu 4; značení sond: červená pro 4q a zelená pro 4p – absence jednoho signálu pro 4p, druhý chromozóm 4 je normální (převzato z práce *Bocian a kol., 2004*) 7
Obrázek 7: Výsledek M-TEL vyšetření (převza-to z *Brown a kol., 2001*) 9
Obrázek 8: CGH u pacienta s karyotypem: 46,XX,der(18)t(6;18)(p24.1;q21.1) (zeleně značená DNA pacienta, červeně referenční) (převzato od *MUDr. Vlčkové*) 10
Obrázek 9: Princip CGH a microarray CGH (převzatu z *Molinaro, Laan a moore, 2002*) 11
Obrázek 10: Výsledky microarray CGH (převzato z http://www.geocities.com/kimdesok/Seminars/Cgh/index.htm) 12
Obrázek 11: Princip MAPH (převzato z: http://www.dmd.nl/) 13
Obrázek 12: Princip MLPA (převzato z www.pr-lab.cz/laborky/METODY.pdf) 14
Obrázek 13: Výsledek MLPA; zdravá kontrola (nahoře) a pacient s delecí v oblasti dlouhých ramen chromozómu 2 (převzato od *MUDr. Vlčkové*) 15

SEZNAM TABULEK

Číslo *Stránka*
tabulka 1: Přehled výsledků vybraných studií 16
tabulka 2: Senzitivita a specifita checklistu podle de Vries a kol. 17
tabulka 3: Checklist podle de Vries a kol. (2001) 17
tabulka 4: Checklist: diagnostická kritéria pro výběr pacientů k vyšetření subtelomerických přestaveb doporučovaný firmou Cytocell pro použití Chromoprobe Multiprobe-T System (převzato z *presentace MUDr. Vlčkové, 2005*) 18
tabulka 5: Frekvence delecí jednotlivých subtelomerických oblastí (*převzato z de Vries a kol., 2003*) 19
tabulka 6: Neutrální polymorfizmy nalezené ve vybraných studiích 21
tabulka 7: Polymorfizmy a cross hybridizace u první generace telomerických sond (převzato z *Knight a Flint, 2000*) 22

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala RNDr. Drahuši Novotné za vedení mé bakalářské práce a MUDr. Zdeně Vlčkové za uvedení do problematiky diagnostiky pomocí subtelomerické FISH. Dále bych poděkovala zaměstnancům Cytogenetické laboratoři ÚBLG při 2. LF UK a FN Motol za péči, kterou mi věnovali při studiu metod klasické cytogenetiky. V neposlední řadě i RNDr. Jiřímu Škorovi, CSc. za dozor a garanci nad touto bakalářskou prací.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím uvedených pramenů a pod vedením své školitelky.

V Praze dne: Podpis:

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

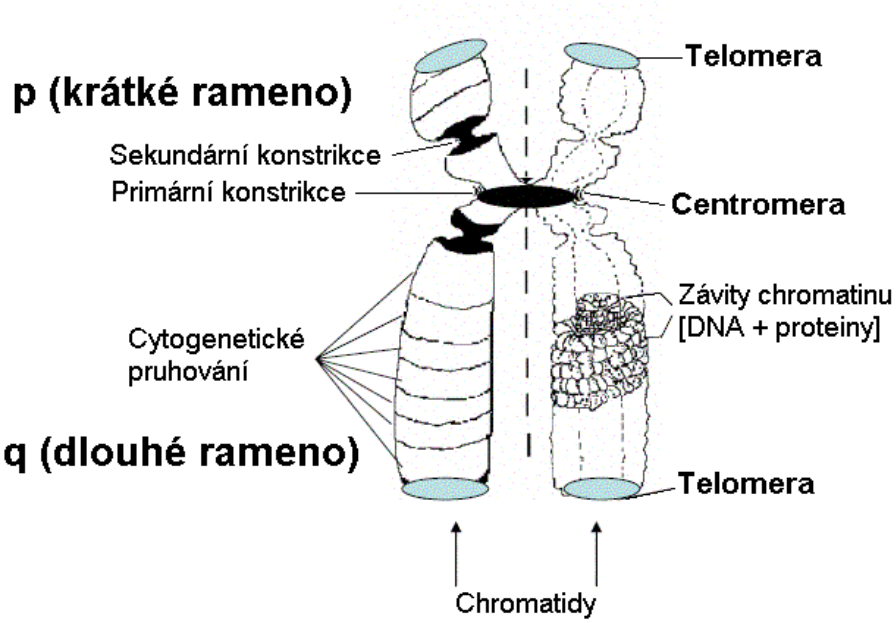
BAC	Bacterial Artificial Chromosome – umělý bakteriální chromozóm
CGH	Comparative Genomic Hybridisation – komparativní genomová hybridizace
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DOP-PCR	Degenerate oligonucleotide primer – PCR – PCR užívající degenerující oligonukleotidové primery
EEG	Eletro-encefalo gram
FISH	Fluorescence In Situ Hybridisation – fluorescenční *in situ* hybridizace
HR-CGH	High Resolution Comparative Genomic Hybridisation – vysoce rozlišující komparativní genomová hybridizace
HRT	High Resolution Technique – vysoce rozlišující technika
IMR	Idiopatická mentální retardace
Kb	Kilobáze
M-TEL	12-color FISH asssay - dvanáctibarevná subtelomerická FISH
MAPH	Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation – hybridizace próby schopné multiplexní amplifikace
Mb	Megabáze
MLPA	Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification – multiplexní amplifikace próby závislá na její ligaci
MR	Mentální retardace
p	Krátké rameno chromozómu
P1	Klony při jejichž tvorbě byl jako vektor použit P1-bakteriofág
PAC	Plasmid Artificial Chromosome – plazmidový umělý chromozómy
PCR	Polymerase chain reaction - polymerázová řetězová reakce
q	Dlouhé rameno chromozómu
RNA	Ribonukleová kyselina
SKY	Spectral karyotyping - pektrální karyotypování nebo také spektrální karyotypizace
STRPs	Short Tandem Repeat Polymorphizms – polymorfizmus krátkých tandemových repetic
STS	Sequence Tagget Site - oblasti o známé sekvenci
TAR	Telomere Associated Repeats - repetice asociované s telomerou
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats – variabilní počet tandemových repetic
YAC	Yeast artificial chromosome – kvasinkový umělý chromozóm

Ú v o d

Mentální retardace (MR) neobjasněného původu představují stálý problém v klinické diagnostice. U 40% středně těžkých a těžkých MR (IQ<50) a u 70% lehkých MR (IQ=50-70) je etiologie neznámá (*Walter a kol., 2004*). Podstatnou skupinu tvoří pacienti se submikroskopickými přestavbami v koncových oblastech chromozómů (*Flint a kol.,1995; Knight a kol.,1999*). Takto malé přestavby zůstávají neodhaleny při klasickém karyotypování, které je schopno detekovat pouze přestavby větší než 4 Mb a mnohdy neodhalí ani větší přestavby vzhledem k jejich lokalizaci a aktuální kvalitě metody a materiálu (*Flint a kol., 1995*). Takové přestavby mohou být druhou nejčastější příčinou těžkých a středně těžkých MR po Downově syndromu (*Knight a kol., 1999*). K diagnostice v oblasti konců chromozómů se používá fluorescence in situ hybridisation (FISH)(*Walter a kol., 2004*). V roce 1995 Flint a kol. poprvé odhalili do té doby nedetekovatelné přestavby u 99 mentálně retardovaných pacientů. Přestavby nalezli u 5% z nich. V roce 1999 Knight a kol. zveřejnili své výsledky, z nichž vyplývalo, že u pacientů s těžkými a středně těžkými MR je procento přestaveb vyšší než u pacientů s lehkou MR (7,4% vs. 0,5%). Pro srovnání uveďme, že syndrom fragilního X bývá nelezen u 1-2% pacientů s MR (*de Vries, 2002*).

1 STAVBA A POPIS SUBTELOMERY

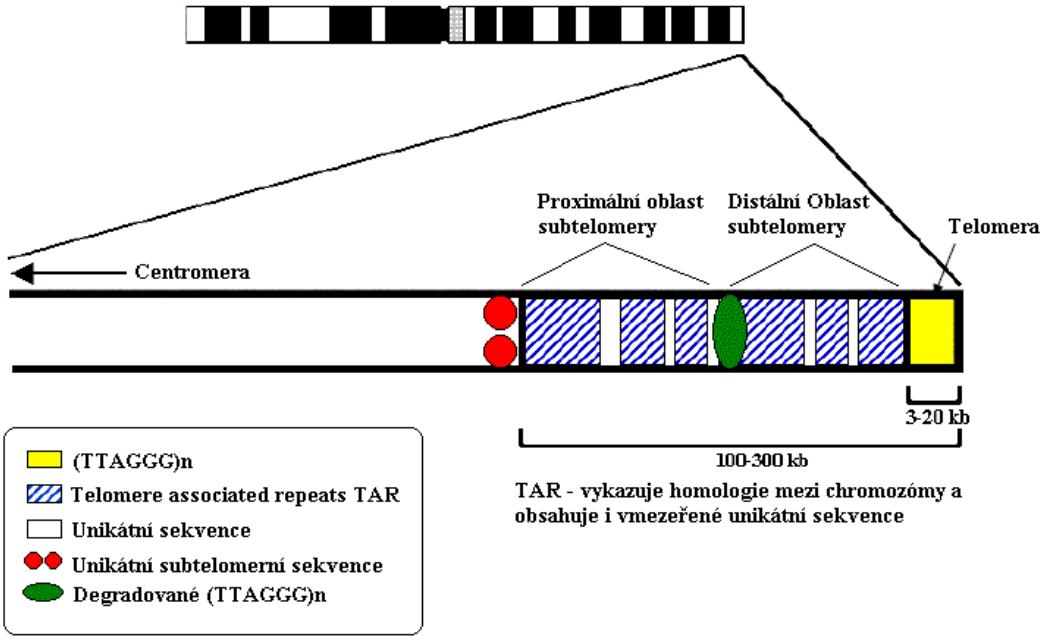
Chromozóm je útvar v lidském jádře sestávající z nukleových kyselin a proteinů, který nese genetickou informaci. Konec chromozómu se nazývá telomera. Tato oblast obsahuje tandemové repetice (TTAGGG)n, které mohou nabývat rozměrů 3-20 kb. Tyto repetice se nachází na koncích všech lidských chromozómů a chrání chromozóm před degradací a fúzí s jiným chromozómem. Během života buňky dochází k jejich postupné degradaci, což hraje klíčovou roli v regulaci délky života buňky. Výjimku tvoří buňky germinální (zárodečné) a rakovinné. Tyto buňky transkribují enzym telomerázu, který dovede telomerické repetici prodlužovat a zajišťuje, tak buňce „nesmrtelnost".



Obrázek 1: Stavba chromozómu (převzato z presentace *Joan HM Knoll, 2003*)

Pod telomerou (směrem k centromeře) se nachází oblast zvaná TAR (Telomere Associated Repeats), která obsahuje sekvence homologní pro více chromozómů a vsunuté krátké úseky, které jsou chromozómově specifické. TAR dále obsahuje i degenerované repetice (TTAGGG)n. Oblast TAR bývá 100-300 kb dlouhá. Degenerované repetice rozdělují TAR na distální oblast subtelomery,

která obsahuje krátké úseky společné pro více chromozómů, a proximální oblast subtelomery, která obsahu dlouhé úseky společné jen pro malý počet chromozómů (*Knight a Flint, 2000; Joan H.M. Knoll, 2003*).



Obrázek 2: Stavba konce chromozómu (převzato z presentace *Joan HM Knoll, 2003* a upraveno)

Saccone (1992) pomocí analýzy presence GC-bohatých H3 izochor zjistil, že oblasti subtelomer jsou genově nejbohatší oblasti genomu. Mezi nejtypičtější klinické příznaky přestaveb subtelomer patří růstové a vývojové opoždění, mentální retardace (MR) a v menší míře též vrozené vývojové vady (*Knight a kol., 1999, 2000; de Vries a kol., 2003*).

V lidském genomu se všeobecně hovoří pouze o 41 subtelomerických oblastech, i když celý lidský karyotyp se sestává ze 46 chromozómů (diploidní sada). To proto, že u akrocentrických chromozómů (skupina D tvořená chromozómy číslo 13, 14 a 15 a skupina G tvořena chromozómy 21 a 22) je v distální oblasti krátkých ramen (p) tvořena tzv. satelity, které obsahují geny pro ribozomální RNA, jejichž delece nemají fenotypický dopad.

2 METODY VYUŽÍVANÉ K DETEKCI SUBTELOMERICKÝCH PŘESTAVEB

Přibližně polovina všech segmentálních aneusomií zahrnuje telomerické oblasti (*Biesecker, 2002*). Wilkie a kol. vyvinuli v roce 1993 techniku k detekci subtelomerických přestaveb využívající hypervariabilních DNA polymorfizmů tzv. VNTR (Variable Number of Tandem Repeats – variabilní počet tandemových repetic) a mikrosatelitních markerů. O 2 roky později Flint a kol. využili tuto metodu k detekci do té doby neodhalitelných přestaveb u 99 pacientů s MR. Přestavby nalezli u 5% z nich. V roce 1999 Knight a kol. zveřejnili své výsledky, z nichž vyplývalo, že u dětí s těžkou a středně těžkou MR je procento zachycených přestaveb vyšší než u dětí s lehkou MR (7,4% vs. 0,5%) (*de Vries, 2003, Biesecker, 2002*).

K detekci genetického materiálu v subtelomerických oblasti byla vyvinuta řada metod. Ze znalosti stavby telomerické oblasti vyplývá, že každá metoda je kompromisem mezi citlivostí a specifitou. Pokud se vyšetření zaměří na sekvenci, která je zcela unikátní (ležící blíže k centromeře), mohou přestavby lokalizované blíže konci chromozómu zůstat nedetekovány (*Knight a Flint, 2000*).

2.1. Využití DNA polymorfizmu

Tato metoda využívá k detekci přestaveb zejména polymorfní mikrosatelitní markery v oblastech subtelomer. K této analýze je potřeba získat DNA pacienta a obou jeho rodičů. Jako marker se volí takový gen, v němž jsou oba rodiče heterozygoti a nesdílí spolu ani jednu alelu. Presence jen jedné alely u pacienta vypovídá o deleci, 3 alely o trizomii. Výhodou tohoto přístupu je možnost detekce izodizomie (případ, kdy potomek zdědí 2 alely od téhož rodiče). Nevýhody spočívají v možném nedostatku markerů, jejich polymorfizmů či v jejich nízké informativitě. K této metodě je třeba vzorků od obou rodičů, což může být také v některých případech problém. Problém s markery lze řešit zvolením více než 1 markeru pro 1 subtelomeru. Ale v takovém případě bude mnoho markerů poměrně daleko od skutečného konce chromozómu a malé distální delece zůstanou neodhaleny. (*Knight a Flint, 2000; de Vries a kol., 2003*)

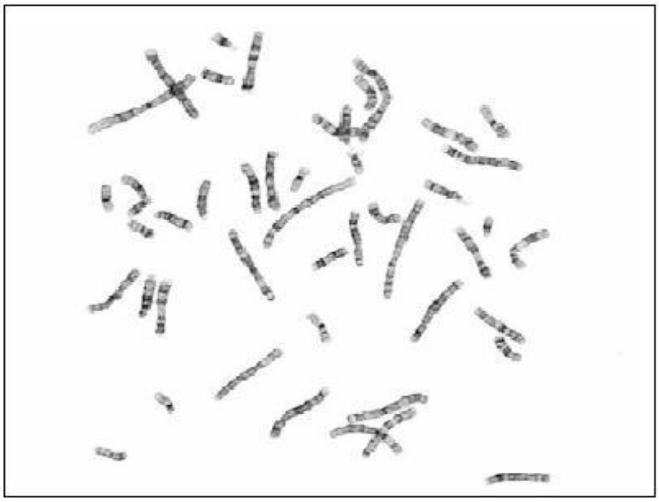
Dnes je molekulárně biologický přístup opět angažován ve vyšetřování subtelomer a to zejména analýza polymorfizmu krátkých tandemových repetic (STRPs – Short Tandem Repeat

Polymorphizms). Dále metoda využívající polymerázovou řetězovou reakci tzv. PCR (Polymerase chain reaction), při které se kvantifikují oblasti o známé sekvenci tzv. STS (Sequence Tagget Site). Toto metoda však zatím nemá dostatek výsledků (*Biesecker, 2002*). Jinou metou využívající PCR je analýza mikrosatelitních markerů. Pro vhodný výběr markerů k detekci v oblastech subtelomer se využívají genomové databáze nebo sekvence ze zmapovaných klonů. Mikrosatelitní markery se hlavně uplatňují při potvrzování podezření na terminální deleci 2q (*van Karnebeek a kol.,2002*).

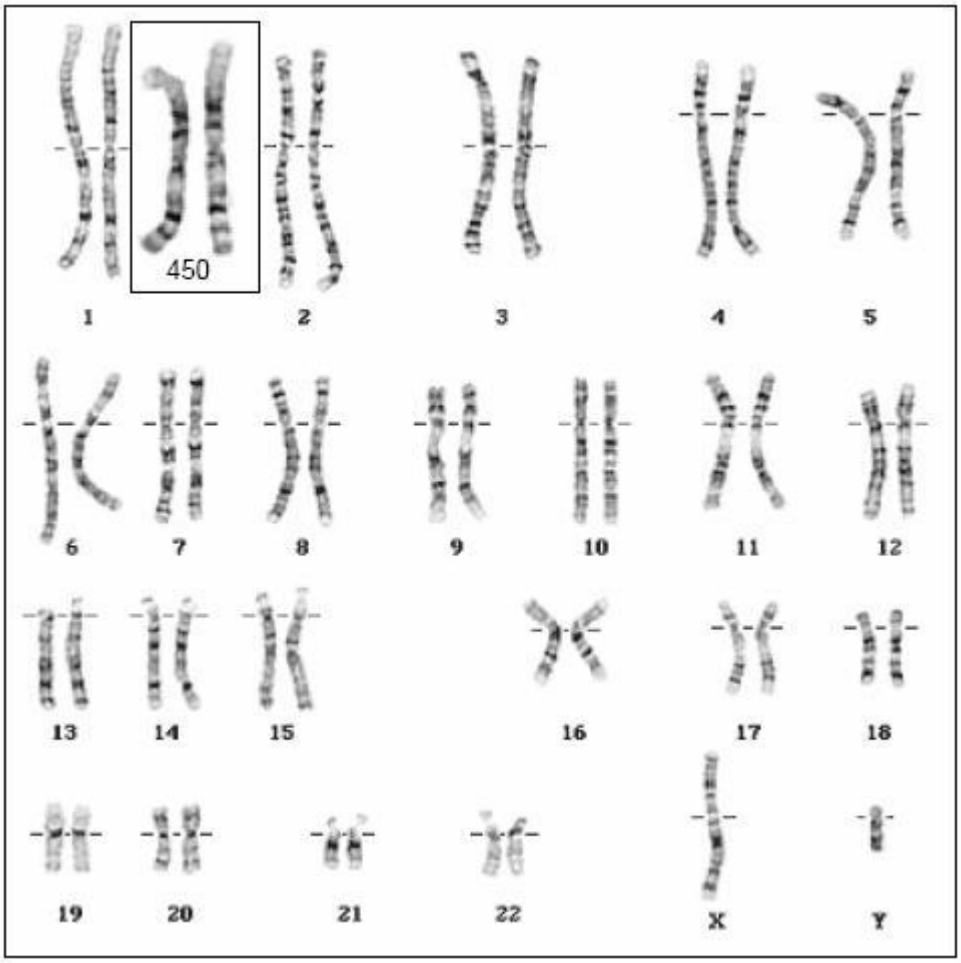
STRPs metoda se jeví jako levnější alternativa FISH (Fluorescence In Situ Hybridisation – viz 2.3) a na rozdíl od ní ji lze automatizovat. Ovšem generuje mnohem více falešně pozitivních než skutečně pozitivních výsledků. Dochází k tomu hlavně kvůli tzv. nulovým alelám (případům, kdy pro deleci většího či menší rozsahu chybí kus či celá alela anebo případy hemizigotních alel), alelickým mutacím a polymorfizmu telomer (*Biesecker, 2002*).

2.2. Cytogenetické pruhovací techniky

Nejčastěji užívanou metodou klasické cytogenetiky je tzv. G-pruhování („G-banding"), kdy jsou chromozómy po krátkém vystavení působení trypsinu obarveny roztokem Giemsa-Romanowski. Vzniknou tak na chromozómech nápadné příčné pruhy, jejichž počet a lokalizace jsou pro každý chromozóm specifické (*Kočárek a kol., 2002*). Citlivost metody je přímo úměrná počtu rozlišitelných pruhů. Např. při 400-550 pruzích nelze spolehlivě detekovat přestavby menší než 5 megabází (Mb) (*Knight a Flint, 2000*). Ke stanovení strukturálních aberací malého rozsahu slouží HRT (High Resolution Technique – vysoce rozlišující technika). Při ní se buněčné cykly všech buněk nejprve sesynchronizují (pozastavením v S-fázi) a následně všechny zastaví v prometafázi. Dále se již postupuje jako při G-pruhování. Prometafázické chromozómy jsou protáhlé a lze na nich pozorovat až 850 pruhů na genom. Nevýhodou pruhovacích metod je jejich nízká rozlišovací schopnost – řádově megabáze (Mb). HRT je navíc časově náročná a její dobré zvládnutí vyžaduje zkušenost. Nicméně využití HRT při vyšetřovaní subtelomer shledali Joyce a kol. (2001) a van Karnerbeek a kol. (2002) za schopnou detekce kryptických subtelomerických přestaveb.



Obrázek 3: Chromozómy v metafázi při G-pruhování (převzato z presentace *Joan HM Knoll, 2003*)

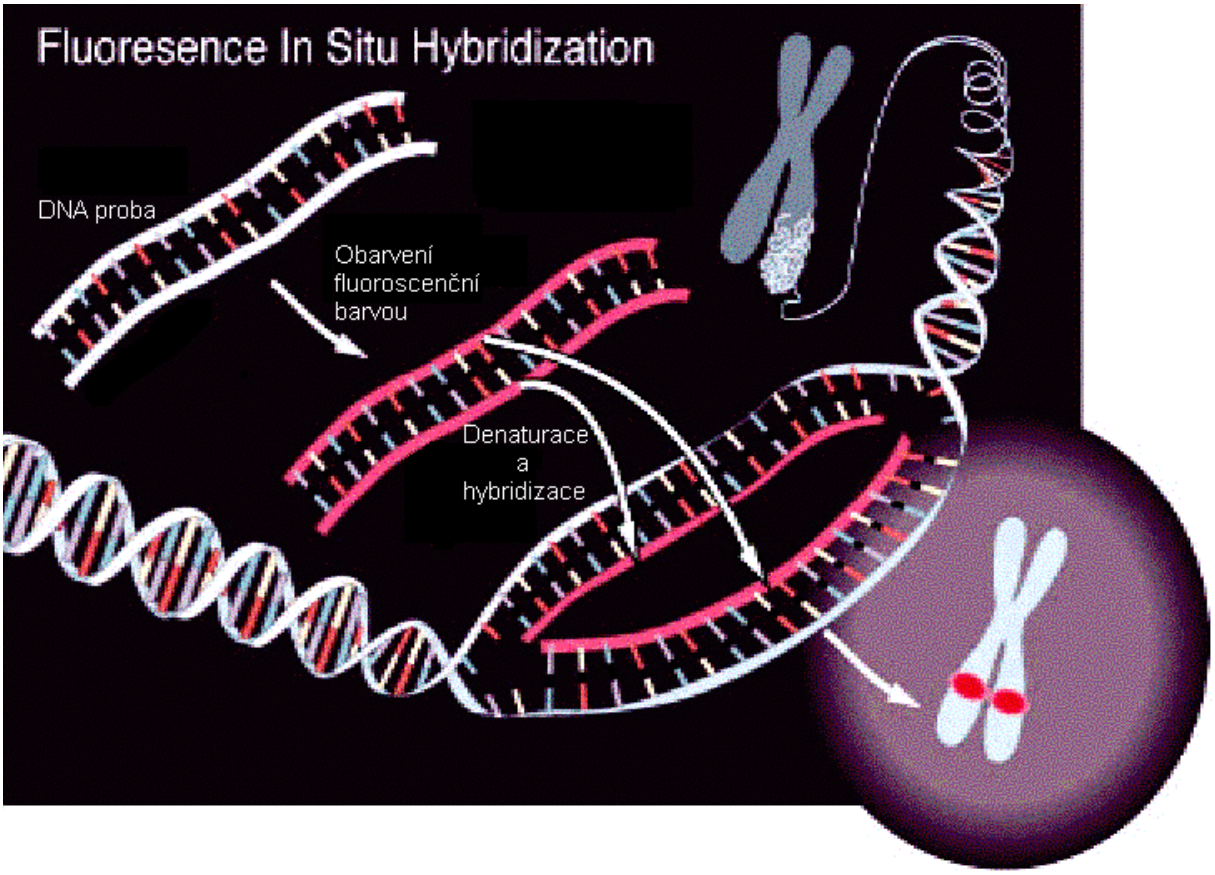


Obrázek 4: Mužský karyotyp – rozlišení více než 550 pruhů (pomocí HRT) – u chromozómu 1 pro srovnání klasické G-pruhy s rozlišením 450 pruhů (převzato z presentace *Joan HM Knoll, 2003*)

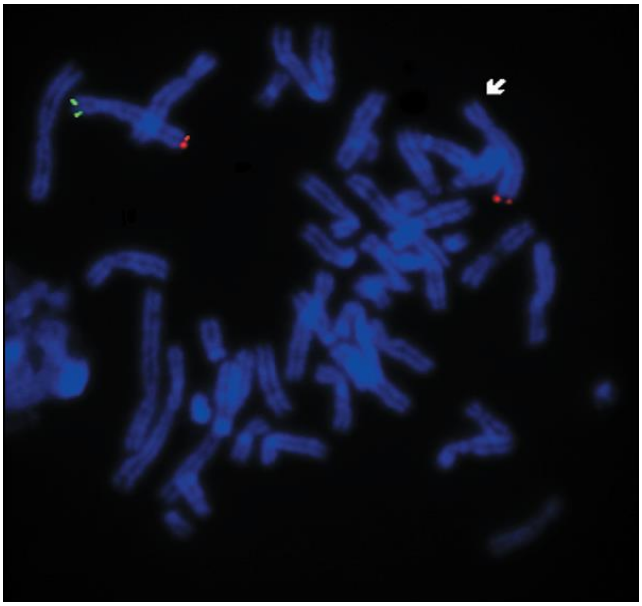
2.3. Fluorescence In Situ Hybridisation (FISH)

Tato metoda je založena na aplikaci fluorochromem značených prób (úseků DNA či RNA), specifických pro některou z unikátních subtelomerických sekvencí, přímo na matefazické chromozómy a jádra. Na základě komplementarity proběhne hybridizace próby se specifickým lokusem. Metafáze jsou vyhodnocovány pod fluorescenčním mikroskopem. Přítomnost 2 signálů na příslušných ramenech příslušných chromozómů vypovídá o normálním stavu. Absence či nadbytek 1 signálů svědčí o deleci resp. trizomii. Přítomnost signálu na rameni jiného chromozómu svědčí o translokaci. Próby užívané v současnosti jsou zejména BAC (Bacterial Artificial Chromosome – umělé bakteriální chromozómy), PAC (Plasmid Artificial Chromosome – plazmidové umělé chromozómy) a P1 (jako vektor použit P1-bakteriofág) klony lokalizované

nejdále 300 kb od telomery a proto jimi lze detekovat i malé subtelomerické přestavby. (*de Vries a kol., 2003; Walter a kol., 2004*)



Obrázek 5: Princip FISH (převzato z presentace *Joan HM Knoll, 2003*)



Obrázek 6: Výsledek FISH – pacient s delecí chromozómu 4; značení sond: červená pro 4q a zelená pro 4p – absence jednoho signálu pro 4p, druhý chromozóm 4 je normální (převzato z práce *Bocian a kol., 2004*)

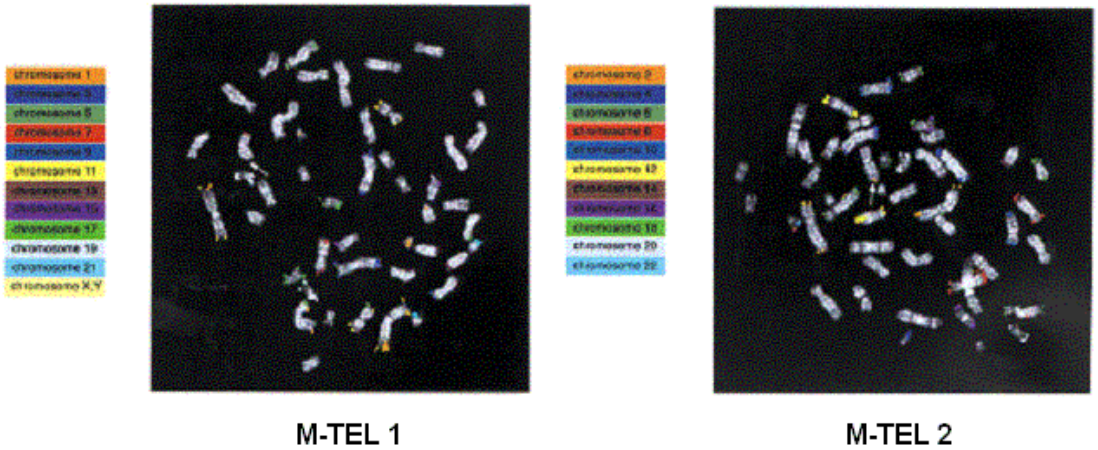
Knight a kol. navrhli roku 2000 set prób, s jejichž pomocí lze vyšetřit všech 41 lidských subtelomer na jednom podložním skle. Takový set komerčně vyrábí firma Cytocell (Chromoprobe Multiprobe-T System) a kromě sond pro 41 subtelomer obsahuje ještě sondu k detekci nejčastějšího polymorfizmu – polymorfizmu chromozómu 2q (*Vlčková, 2004, 2005*). Celkově se FISH sondy rozdělují na sondy první a druhé generace. Set první generace sond obsahoval klony kosmidové, P1 a PAC. Ty byly získány pomocí tzv. polovičních YAC (yeast artificial chromosome – kvasinkový umělý chromozóm) – kvasinkové chromozómy nesoucí terminální segmenty pocházející z lidských chromozómů. Většina těchto klonů byla lokalizována do 300 kb od chromozomálního konce. Některé z těchto klonů však vykazovaly cross hybridizaci (ad oddíl 3.4. a tabulka 7). Dále nebylo možno pomocí polovičních YAC získat klony pro 7 oblastí (1p, 5p, 6p, 9p, 12p, 15q a 20q). K získání sond pro tyto oblasti se využilo PAC knihoven. Zde však nebyla známa skutečná fyzická vzdálenost od konce chromozómu. Později se ukázalo, že např. 12p klon je od konce vzdálen více než 800 kb. To vše mělo za následek vytvoření druhé generace sond. Její klony jsou získány pomocí izolací z PAC, P1 a BAC klonů. U všech je známa skutečná vzdálenost od konce. U těchto sond se již neobjevují cross hybridizace a i některé problémy spojené s polymorfizmy (ad oddíl 3.4. a tabulka 7) se povedlo vyřešit (*Knight a Flint, 2000*).

Nevýhodou FISH je pracnost vyšetření. K vyšetření se nejčastěji používají lymfocyty z periferní krve pacienta. Jejich kultivace a přípravu podložních skel s metafázemi nelze nijak automatizovat a může se stát, že se nevydaří optimálně (*Biesecker, 2002*).

2.4. Dvanáctibarevná subtelomerická FISH – 12-color FISH asssay (M-TEL)

Tuto metodu vyvinuli a popsali roku 2001 Brown a kol. Použili set klonů specifických pro každou lidskou subtelomeru. Všechny (až na klon specifický pro 5p) jimi navržené klony hybridizovaly nejdále 500 kb od telomery. Ty obarvili pomocí 4 fluorochromů, jejichž kombinací získali 12 rozdílných barev. Vytvořili postup, který dovoluje vyšetřit všechny telomery ve dvou hybridizacích. U této metody jsou sondy pro krátká (p) i dlouhá (q) ramena chromozómů značena stejnou barvou. Metoda tedy není schopna detekovat translokace telomer mezi oběma rameny téhož chromozómu resp. chromozómu téhož páru. Dále vyvinuli software pro stanovení výsledku M-TEL. Nejprve M-TEL aplikovali na vzorky od pěti zdravých jedinců, čímž vyloučili možné falešně pozitivní nálezy. Jako pozitivní kontrolu použili osm pacientů s již známými přestavbami

(konkrétně dva s terminální delecí, pět s nebalancovanou translokací[1] a jednoho s balancovanou translokací). Ve všech případech pomocí M-TEL potvrdili nález.



Obrázek 7: Výsledek M-TEL vyšetření (převza-to z *Brown a kol., 2001*)

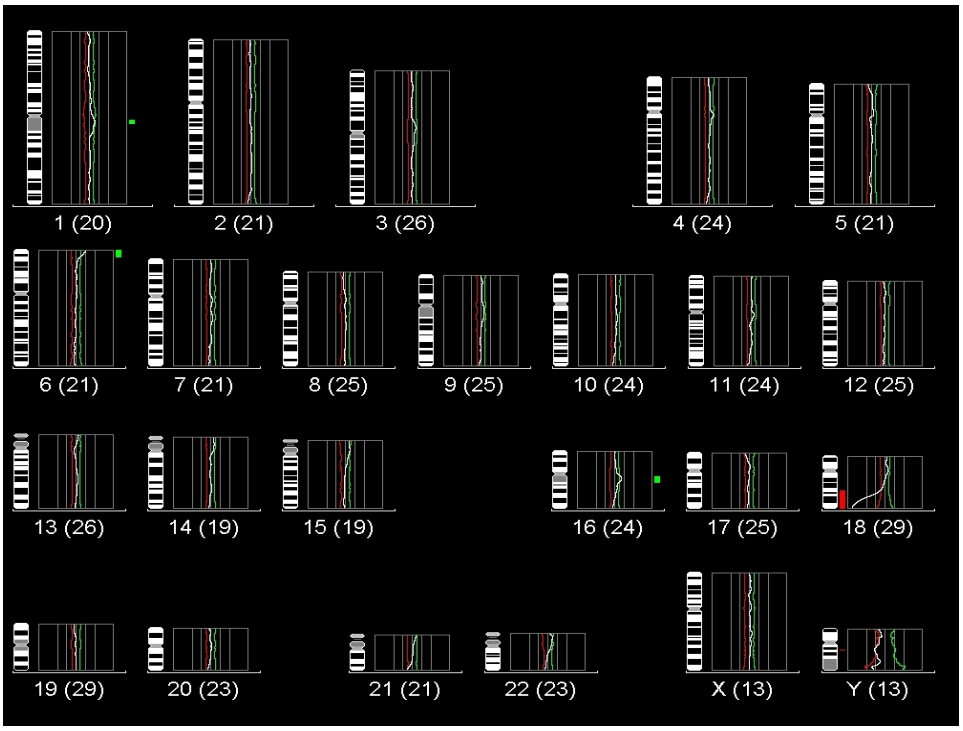
2.5. Comparative Genomic Hybridisation (CGH)

CGH je svým principem obdobou FISH. Na referenční vzorek zdravého jedince (již připraveného na sklíčku) se aplikuje směs dvou vzorků DNA – první opět od zdravého jedince obarvená jednou fluorescenční barvou a druhá od vyšetřovaného pacienta obarvená odlišně. Během hybridizace musí oba DNA vzorky kompetovat o možnost hybridizace se vzorkem na podložním skle. Pokud je DNA určitého lokusu jednoho vzorku v nadbytku, projeví se tento stav převahou jedné barvy. Ať už je v kompetici zvýhodněna referenční DNA, protože u pacienta je v dané oblasti delece, či pacientova DNA, protože je v této oblasti amplifikace. Intenzita zastoupených signálů je hodnocena speciálním počítačovým programem. CGH umožňuje zpracování DNA z jakýchkoliv tkání bez nároku na kultivaci.

Rozlišovací schopnost této metody je odvozena od faktu, že je vyhodnocována fluorescenčním mikroskopem a pohybuje se tedy okolo 3 Mb. I tato metoda má svou vysokorozlišovací (HR-

[1] Translokace: Jedná se o chromozomální přestavbu, při které dochází k přesunu části chromatidy jednoho chromozómu na jiný chromozóm nebo k výměně genetického materiálu mezi dvěma a více různými chromozómy. Pokud vlivem zlomů nedojde k porušení nebo ztrátě některých genů, mluvíme o balancované translokaci. V těchto případech má nositel zpravidla zcela normální fenotyp. Aberace se však může po germinální linii předat dalším generacím a zde se (vlivem segregace chromozomálních párů během meiózy) vyskytnout v nebalancované formě.

CGH) obdobu, která je schopna dosáhnout rozlišení 2 Mb (*Joly a kol., 2001*). Nevýhodou CGH je fakt, že není schopna odhalit balancované translokace, protože v jejich případě je množství referenční i testované DNA totožné.

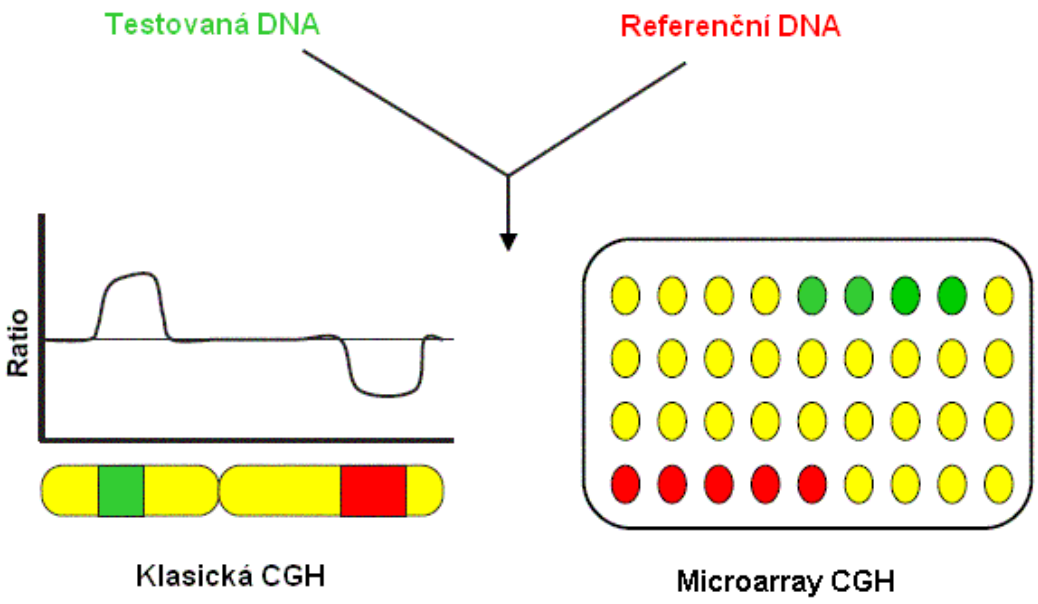


Obrázek 8: CGH u pacienta s karyotypem: 46,XX,der(18)t(6;18)(p24.1;q21.1) (zeleně značená DNA pacienta, červeně referenční) (převzato od *MUDr. Vlčkové*)

CGH metodu k vyšetření subtelomerických oblastí použili Joly a kol. (2001). Vyšetřili 17 pacientů ze 14 rodin a u 7 z nich nalezli přestavby. Své výsledky následně potvrdili i subtelomerickou FISH. Zde je však nutno dodat, že u dvou translokací CGH odhalila pouze jeden derivovaný chromozóm. V prvním případě diagnostikovali pouze monozomii 2q místo nebalancované translokace mezi chromozómy 2 a 5 (neodhalili částečnou trizomii chromozómu 5). Ve druhém případě místo nebalancované translokace mezi chromozómy 7 a 16 detekovali pouze trizomii 16q. Nicméně jejich práce ukázala, že CGH má jistý potenciál diagnostikovat přestavby, které mohou zůstat neodhaleny při klasickém vyšetření pomocí G-pruhů. Baker a kol. (2002) pomocí HR-CGH zachytili u 4% svých pacientů subtelomerické přestavby.

Veltman a kol. roku 2002 vyvinuli tzv. microarray CGH systém využívající přímo BAC a PAC DNA k analýze subtelomerických přestaveb a navrhli též využití tzv. DOP-PCR (Degenerate

oligonucleotide primer – PCR – PCR užívající degenerující oligonukleotidové primery) produkty místo DNA přímo z BAC a PAC. Vyšetření pomocí DOP-PCR produktů může být méně citlivé (*Harada a kol., 2004*). Harada a kol. (2004) navázali na Valtmanův tým a vyvinuli vlastní microarray CGH systém s použitím DOP-PCR amplifikovanou subtelomerickou DNA.

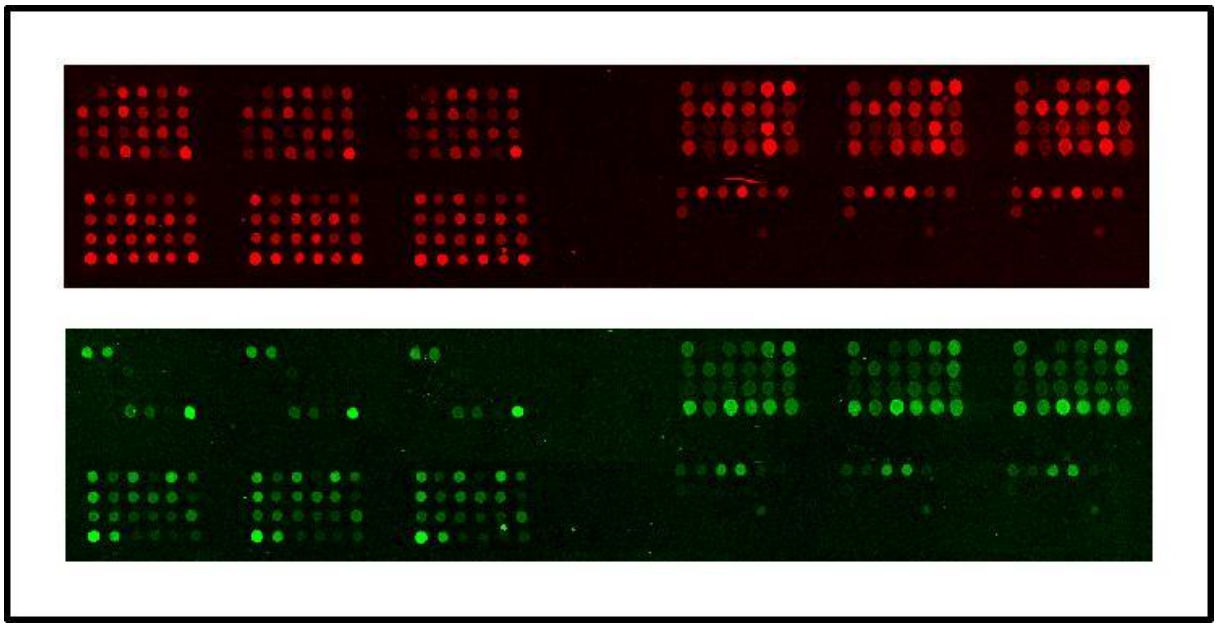


Obrázek 9: Princip CGH a microarray CGH (převzatu z *Molinaro, Laan a moore, 2002*)

U microarray CGH na rozdíl od klasické hybridizuje značená DNA ne s chromozómy, ale s velkým počtem malých úseků genomu. Ty jsou ve formě malých mikroskopických teček navázány na podložním skle. Každý takový bod má své přesné umístění v rámci mřížky (sloužící k vyhodnocení). Lze tak vyšetřit řádově tisíce úseků DNA (genů) najednou. Ke snímání výsledků je zapotřebí speciálního skeneru a k vyhodnocení patřičného software. Tato metoda je velmi citlivá. Umí nejen diagnostikovat delece a amplifikace, ale zvládne stanovit i jejich rozsah (*Kočárek a kol., 2002*).

Veltman a kol.(2002) vyšetřili pomocí microarray CGH 20 pacientů se známými abnormalitami jedné či více telomer. U všech vyšetřovaných byl nález potvrzen a dále ve třech případech nalezli novou přestavbu, do té doby nedetekovanou. Bohužel ke stanovení počtu

falešně pozitivních nálezů autoři vyšetřili pouze 5 zdravých jedinců a navíc u některých použitých klonů bylo spočítáno až 15% riziko abnormálního nálezu u zdravého jedince (*Veltman a kol., 2002*).



Obrázek 10: Výsledky microarray CGH (převzato z http://www.geocities.com/kimdesok/Seminars/Cgh/index.htm)

2.6. Spektrální karyotypování (SKY)

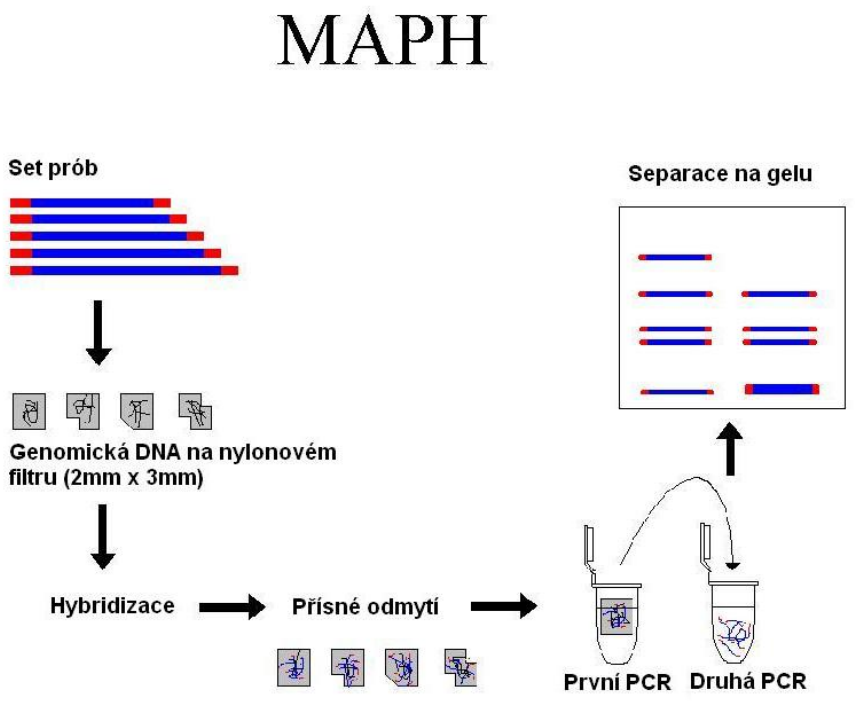
Spektrální karyotypování nebo také spektrální karyotypizace (SKY – spectral karyotyping) je podobně jako CGH obdobou základní metody FISH. Zde se k detekci používá směs tzv. malovacích sond. Každá malovací sonda hybridizuje s jiným chromozómem, takže lze na základě jediné hybridizace označit všech 24 lidských chromozómů. Odlišnosti se dosahuje nejen použitím různých fluorochromů, ale také jejich rozdílnou kombinací. K označení všech chromozómů je třeba pěti fluorescenčních barviv. U metody SKY se k odlišení barev a jejich vzájemných kombinací používá spektrometr. Podobně jako u FISH a CGH je k vyšetření třeba kultivace buněk a získání dobře rozprostřených mitóz (*Kočárek a kol., 2002*).

SKY k detekci subtelomerických přestaveb použili Clarkson a kol (2002). Vyšetřili 50 dětí bez nálezu při klasickém G-pruhování. Pro srovnání pacienty vyšetřili též FISH metodou. Ta odhalila 3 přestavby (včetně 2q polymorfizmu)., zatímco SKY pouze jednu. Autoři proto konstatovali, že ve srovnání s FISH metodou je SKY méně citlivá (*Clarkson a kol., 2002*).

Dalšími, kdo využili vyšetření pomocí SKY metody k detekce terminálních přestaveb, byli Anderlind a kol.(2002). Pomocí FISH metody nalezli 10 přestaveb (resp. 11 – mezi vyšetřovanými byl i sourozenecký pár), z nichž byly 4 nebalancované translokace. Právě u pacientů s těmito aberacemi a u jejich rodičů, nosičů translokací v balancované formě, provedli též vyšetření pomocí SKY metody, aby zjistili, jak je tato citlivá a aby stanovili alespoň hrubý odhad velikosti přestavby. Ve třech případech zaznamenali translokaci a to jak u pacienta, tak i u rodiče s balancovanou formou. V jednom případě SKY nevykazovala žádné patologie. Dále autoři použili SKY u 50 pacientů, u kterých nebyly nalezeny žádné přestavby pomocí FISH, aby vyloučili intersticiální přestavby, ale žádné detekovány nebyly (*Anderlind a kol., 2002*).

2.7. Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation (MAPH)

Tato metoda, vynalezená roku 2000 Armourem a jeho kolektivem, umožňuje stanovení počtu kopií specifických genetických lokusů. K detekci subtelomerických přestaveb ji roku 2001 použili Sismani a kolektiv. Je založena na PCR kvantifikaci prób znovunabytých po hybridizaci s vyšetřovanou DNA vázanou na nylonovém filtru. Všechny próby obsahují vazebná místa pro běžný pár primerů.

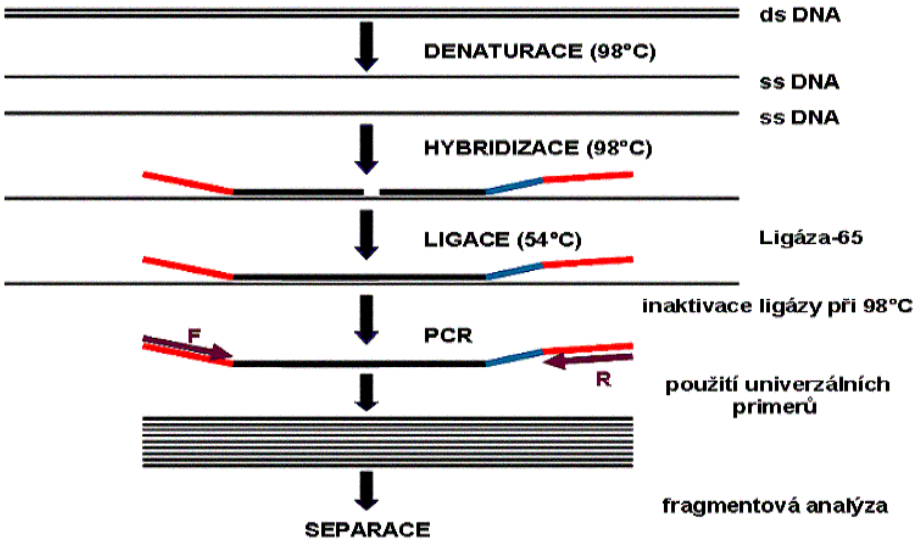


Obrázek 11: Princip MAPH (převzato z: http://www.dmd.nl/)

Hollox a kol. (2002) použili MAPH k detekci subtelomerických přestaveb. Zachytili v cca 4% falešně pozitivní nálezy a ve 2% falešně negativní. I přes mnoho falešně pozitivních nálezů, shledávají autoři tuto metodu jako užitečnou zejména ke zúžení výběru pacientů doporučovaných na vyšetření subtelomer pomocí pracnější FISH metody (*Hollox a kol., 2002*).

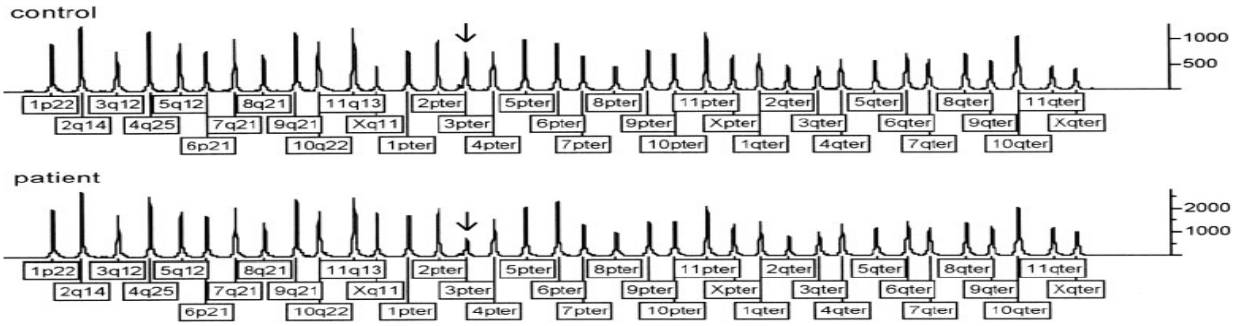
2.8. Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA)

Jedná se o metodu, při níž jsou pomocí PCR amplifikovány dvojice ligovaných lokus specifických sond. Ke každé vyšetřované sekvenci je zapotřebí mít dvě těsně sousedící sondy nesoucí primerové sekvence. Po hybridizaci se sekvencí dojde k ligaci, čímž z nich vznikne jedno vlákno, které je možno amplifikovat pomocí PCR. Následuje denaturace a PCR amplifikace s primery specifickými pro sondy. Pokud je cílová oblast deletovaná, ligace neproběhne a ve výsledku bude chybět patřičný produkt. Dnes se komerčně vyrábí sondy takové, že lze vyšetřit 41 telomer ve dvou multiplexních reakcích. Jednotlivé produkty se liší svou délkou (každý o 9 bazí), což umožňuje odečtení výsledků.



Obrázek 12: Princip MLPA (převzato z www.pr-lab.cz/laborky/METODY.pdf)

MLPA výsledek se stanovuje na základě kvantitativního hodnocení, proto je třeba provést též další vyšetření (nejlépe FISH) k potvrzení diagnózy v případě nálezu patologie (*Vlčková Z., 2004, 2005*). Tato metoda není schopna odhalit balancovanou translokaci, pokud nedošlo ke zlomu právě v oblasti mezi dvěma sondami.



Obrázek 13: Výsledek MLPA; zdravá kontrola (nahoře) a pacient s delecí v oblasti dlouhých ramen chromozómu 2 (převzato od *MUDr. Vlčkové*)

3 VYUŽITÍ SUBTELOMERICKÉ FISH U PACIENTŮ S MENTÁLNÍ RETARDACÍ

Byla publikována celá řada studií zabývajících se vyšetřením subtelomer u pacientů s MR s neobjasněnou příčinou – idiopatickou mentální retardací (IMR). Z většiny z nich vyplývá, že subtelomerické přestavby jsou signifikantní příčinou MR. Výjimku tvoří práce Joyce a kol. (2001), jejichž závěr zněl opačně. Ve skupině pacientů s MR nenalezli žádnou přestavbu, zato nalezli 2 přestavby v kontrolní skupině zdravých pacientů. Procento nalezených přestaveb se ve vybraných pracích se pohybuje od 0% (*Joyce a kol., 2001*) až po 29,41% (*Joly a kol.,2001*) (viz. tabulka 1). Rozdíly jsou dány odlišnými kritérii, podle kterých byli pacienti indikováni k vyšetření subtelomer.

Studie	počet vyšetřovaných	nalezené přestavby	podíl přestaveb	familiární	paternální	maternální	metoda
Anderlind a kol. (2002)	111	11 (10)[1)]	9,91%	5 (4)[1)]	4 (3)[1)]	1	FISH, SKY
Clarkson a kol (2002)	50	3	6,00%	3	1	1 (2 - pol)[3)]	FISH, SKY
Knight a kol. (1999)	466 (75c)[2)]	22 (0c)[2)]	4,72%	10	6	4	FISH
Joyce a kol. (2001)	150 (150c)[2)]	0 (2c)[2)]	0,00%	X	X	X	FISH
Helias-Rodzewicz a kol. (2002)	33	3	9,09%	3	3[4)]	X[4)]	FISH
Joly a kol. (2001)	17	7 (5)[1)]	41,18%	6 (4)[1)]	5 (3)[1)]	1	FISH,CGH
Bocian a kol. (2004)	84	10	11,90%	8	6	2	FISH
Walter akol. (2004)	50	10	20,00%	5	2	3	FISH
Sogaard a kol. (2005)	132 (131)[1)]	9 (8)[1)]	6,82%	3 (2)[1)]	1	2 (1)[1)]	FISH, PCR
van Karnebeek a kol. (2002)	281	29	10,32%	2	0	2	FISH, PCR
celkem	1374	101	7,35%	45	25	16	
průměr	137,40	10,10	11,99%	4,50	2,50	1,60	

1) Do studie byli zahrnuti i sourozenci; čísla v závorkách jsou zohledňují na tento fakt a berou záchyt stejné přestavby u dvou sourozenců jako jeden případ

2) Do studie byla zahrnuta též kontrolní (zdravá) skupina; čísla v závorkách s označením c jsou hodnoty pro kontrolní skupinu

3) Ve studii byl zachycen polymorfimus s možným klinickým dopadem; číslo v závorce je výsledkem, pokud by byl tento polymorfizmus považován za příčinu klinického nálezu

4) Ve studii byly popsány tři rozsáhlé rodiny s výskytem subtelomerické přestavby; u všech primárních pacientů byly přestavby získány od otce. V rámci celých rodin se včak tyto přestavby předávaly i po maternální linii

tabulka 1: Přehled výsledků vybraných studií

Přibližně polovinu zachycených případů přestaveb tvoří *de novo* vzniklé delece a polovinu tvoří nebalancované translokace vzniklé segregací balancovaných translokací vyskytujících se v rodině pacienta. (*Flint a Knight, 2003*). Anderlind a kol.(2002) a Bocian a kol. (2004) ve svých pracích zaznamenali vyšší zastoupení paternálního původu přestavby (u Bocian a kol. to bylo 6 z 8 familiárních přestaveb; u Anderlinda a kol. to byly 4 přestavby z 5 resp. 3 z 4 – v 1 případě se jednalo o sourozence). Roberts a kol. (2004) zaznamenali 2 familiární přestavby a obě byly maternálního původu.

3.1. Výběrová kriteria – Checklist

Jak již bylo řečeno výše, jednotlivé studie se od sebe liší výběrovými kriterii. Přísnější výběr pacientů sice zvýší procento záchytu přestavby, ale někteří pacienti se subtelomerickou přestavbou zůstávají nevyšetřeni.

Roku 2001 zveřejnili svou práci de Vries a kol., v níž se zabývali zastoupením jednotlivých fenotypických znaků u pacientů s prokázanými subtelomerickými přestavbami. Na základě své studie vypracovali tzv. checklist, podle kterého lze zúžit výběr pacientů k vyšetření subtelomer. Jejich checklist obsahuje celkem pět kategorií: výskyt MR v rodině, prenatální růstová retardace, postnatální růstové abnormality, výskyt dvou a více obličejových dysmorfických[2] znaků a výskyt jednoho a více mimoobličejových dysmorfických znaků.

Kategorie	*Skóre*
Výskyt MR v rodině	
podléhající pravidlům Mendelovské dědičnosti	1
nepodléhající pravidlům Mendelovské dědičnosti	2
Prenatální růstová retardace	2
Postnatální růstové abnormality za každou z následujících 1 bod (celkem max. 2): mikrocefalie, krátká postava, makrocefalie, vysoká postava	2
Výskyt 2 a více faciálních dysmorfizmů zejména hypertelorizmus, abnormality nosu a uší	2
Výskyt mimoobličejových deformit a vrozených vývojových vad za každou anomálii 1 bod (celkem max. 2) zejména anomálie rukou a srdce, hypospadie, nesestouplá testes	2

tabulka 3: Checklist podle de Vries a kol. (2001)

Minimální skóre	*Senzitivita (95% CI*)*	*Specifita (95% CI*)*
≥ 3	1,00 (0,87-1,00)	0,27 (0,18-0,39)
≥ 4	0,89 (0,71-0,98)	0,43 (0,32-0,55)
≥ 5	0,70 (0,50-0,68)	0,69 (0,57-0,79)
≥ 6	0,56 (0,35-0,75)	0,88 (0,79-0,95)
≥ 7	0,33 (0,17-054)	0,94 (0,86-0,98)
≥ 8	0,19 (0,06-0,38)	0,95 (0,87-0,99)
≥ 9	0,11 (0,02-0,29)	0,99 (0,93-1,00)

* 95% interval spolehlivosti

tabulka 2: Senzitivita a specifita checklistu podle de Vries a kol.

[2] Dysmorfický: Charakterizovaný změnami a poruchami (anomáliemi) v anatomické stavbě (těla, různých orgánových systémů apod.)

Dalším, kdo navrhl checklist pro výběr pacientů, byl Dr. Oliver Bartsch z Institutu klinické genetiky v Drážďanech a to pro studii Walter a kol. zveřejněnou roku 2004 (viz. tabulka 2). Jeho checklist má 4 kategorie: MR nebo vývojové opoždění, dysmorfizmus, růstový defekt a abnormální rodokmen (tj. výskyt jedinců s abnormálním fenotypem či aborty v rodině). Maximum možných dosažených bodů v tomto checklistu je 8. Selekční kritérium pro vyšetření subtelomer je získání tří a více bodů ve třech různých kategoriích nebo získání čtyř a více bodů ve dvou kategoriích. Jeho checklist převzala a upravila firma Cytocell a doporučuje právě na jeho základě vybírat pacienty pro vyšetření subtelomerických přestaveb (viz tabulka 4).

Kritéria, ke kterým se všeobecně přihlíží při výběru pacientů, tvoří též neznámá etiologie jejich MR a karyotyp na úrovni 450-550 pruhů bez nálezu (popř. též vyloučení známé submikroskopické přestavby, ke které se svým klinickým popisem pacient přibližuje) (*Walter a kol., 2004*).

1. Mentální retardace	
■ nespecifická nebo lehká	1
■ Střední nebo těžká	2
2. Růstové abnormality	
■ nízká porodní váha (-2SD[1)]) nebo IUGR[2)]	1
■ Postnatální malá výška (-2SD[1)])	1
■ mikrocephalie/makrocephalie (-2SD[1)]/+2SD[1)])	1
3. Dysmorfologie	
■ 2 a více obličejové anomálie	1
■ 2 a více jiné VVV[3)]	1
4. Abnormality v rodokmenu	
■ IMR sourozenec, teta, strýc, bratranec, sestřenice	1
■ VVV[3)] sourozenec, teta, strýc, bratranec, sestřenice	1
■ exitus neonatalis, předčasný porod, 2 a více abortů	1

1) směrodatná odchylka (SD – Standard deviation); 2) nitroděložní růstová retardace (IUGR – intra-uterine growth retardation)3) vrozená vývojová vada (VVV)

poručovaný
5)

3.2. Delece subtelomerických oblastí

De Vries a kol. (2003) publikovali souhrnný článek zabývající se nálezy přestaveb v jednotlivých subtelomerických oblastech. Převzali výsledky vyšetření více než 2 500 pacientů s podezřením na subtelomerické přestavby. Ty byly nalezeny přibližně u 5% z nich. V závěru své práce poukázali na stále nedostatečný počet odhalených přestaveb.

Jedna z mnoha otázek, vznášejících se kolem detekcí subtelomerických přestaveb, zní, kdy lze submikroskopickou deleci považovat za příčinu MR. Všeobecně se má za to, že pouze v případě,

kdy byla stejná delece pozorována u nepříbuzného pacienta taktéž s MR. Bohužel existují i delece, které nezpůsobují MR u všech svých nositelů. Příkladem takové přestavby může být delece v subtelomerické oblasti krátkého ramene chromozómu 18. Dalším problémem je polymorfizmus telomer. Například v poslední době se ukazuje, že 2q subtelomerický polymorfizmus je běžnější než se zprvu předpokládalo(*de Vries a kol., 2003*).

V neposlední řadě existují i subtelomerické delece, které byly zaznamenány pouze v jednom případě popř. se nevyskytly vůbec (viz tabulka 5). O příčině této skutečnosti se lze jen dohadovat. Jedno z nejjednodušších vysvětlení zní, že jen zatím nebyly detekovány a s nástupem nových technologií a stále vzrůstajícího počtu vyšetřovaných pacientů je jejich nález jen otázkou času. Jiné vysvětlení říká, že tyto delece nejsou spojeny s fenotypem napovídajícím chromozomální přestavbu (jako např. absence MR a/nebo malformací[3]). To má za následek, že tito pacienti nejsou odesíláni na podrobná cytogenetická vyšetření. Dále je možné, že by tyto byť submikroskopické delece byly letální. Úskalí této teorie tkví v tom, že u některých chromozomálních ramen jako např. 18p či 19p byly pozorovány mikroskopicky viditelné delece konců (včetně subtelomer a telomer), zatímco pouze submikroskopické delece subtelomer nikoliv. A na konec teorie, která vysvětluje tento jev vysokou stabilitou některých subtelomerických oblastí. To způsobuje, že v těchto oblastech k přestavbám prakticky nedochází (*de Vries a kol., 2003*).

Počet zaznamenaných případů	**Telomerická oblast**
více než 50	4p, 5p, 9p, 16p, 17p
11 až 50	1p, 2q, 22q
2 až 10	1q, 2p*, 3p*, 4q, 5q, 6q, 7q, 8p, 9q, 10p, 10q, 11q, 12p, 13q, 14q, 18q, 20p*
pouze jediný	3q, 6p, 7p, 11p, 16q, 17q
žádný	8q, 12q, 15q, 18p, 19p, 19q, 20q, 21q

*více něž jeden případ, ale v rámci jedné rodiny

tabulka 5: Frekvence delecí jednotlivých subtelomerických oblastí (*převzato z de Vries a kol., 2003*), stav k roku 2003

[3] Malformace: Vrozená úchylka tvaru vzniklá za nitroděložního vývoje zárodku. Jiné názvy jsou zrůdnost, monstrozita, vrozená vývojová vada

3.3. Syndromy asociované s přestavbami subtelomer

Wolf-Hirschhornův syndrom[4] (4p-), Cri-du-chat syndrom (5p-), 9p- syndrom, 13q- syndrom a 18p- syndrom představují příklady mikroskopicky viditelných delecí, které většinou zasahují i do oblastí subtelomer a způsobují MR spojené se specifickým fenotypem (*de Vries a kol., 2003*). Nástup nových molekulárních a molekulárně cytogenetických metod s sebou přinesl popis pacientů s terminálními delecemi do té doby nenalézanými. Na jejich základě byly popsány další fenotypicky specifické a klinicky dobře rozpoznatelné deleční syndromy. Nejvýznamnější z nich je 1p- syndrom. Ten je dnes již dobře popsán a je považován za nejběžnější syndrom terminální delece (*de Vries a kol., 2003*). Dnes se též uvažuje, že Pittův a Wolf-Hirschhornův syndrom reprezentují fenotypické varianty téže mikrodelece (*Sogaard a kol., 2005*).

Přesný popis pacientů s některými delecemi umožnil popis několika zcela nových syndromů se subtelomerickou delecí jako příčinou. Mezi takové syndromy patří i monozomie 22q. Společné znaky pacientů s touto přestavbou jsou vývojové opoždění, MR, absence rozvoje řeči a snížené svalové napětí (hypotonie). Mezi již méně často pozorované projevy patří záhyb kožní řasy při vnitřním očním koutku (epikantu), nedostatečně vyvinuté (hypoplastické) uši a prodloužení hlavy v předozadním směru (dolichocefalie). Jako u jedné z mála subtelomerických delecí se u tohoto syndromu můžeme setkat i s nadměrným růstem (*de Vries a kol.,2001; Roberts a kol., 2004*).

Jak již bylo řečeno výše, 1p36 deleční syndrom patří dnes mezi nejvýznamnější subtelomerické deleční syndromy. Je znám širokým rozpětím klinických projevů, mezi které patří různý stupeň MR, růstová retardace, abnormální EEG záznam, hypotonie, vývojové opoždění, časný nástup puberty, orofaciální rozštěpy nebo jiné abnormality patra, poruchy sluchu a kardiomyopatie. Dále jen možno pozorovat, že tito pacienti vykazují mezi sebou známky podobnosti dané zejména výskytem široké přední (anteriorní) fontanely, poruch vývoje uší, hluboko položených očí, ploché, hlouběji posazené horní části nosního hřbetu, ostré brady a trvale zakřiveného (klinodaktylie) pátého prstu ruky. Molekulární studie ukázaly, že prevalence určitých fenotypických projevů může korelovat s velikostí delece. Frekvence výskytu tohoto syndromu se pohybuje kolem 1:5000 živě narozených dětí (*Ballif a kol., 2003; Knight a Flint, 2000; de Vries a kol., 2001; Roberts a kol., 2004*).

Dalším dnes již dobře popsaným syndromem spojeným s přestavbu v subtelomerické oblasti je 18p deleční syndrom. Pacienti s tímto syndromem vykazují lehké až středně těžké růstové

[4] Syndrom: Soubor příznaků (symptomů) charakterizující určité onemocnění

opoždění, hypotonii, nápadně malou hlavu (mikrocefalii), prominující uši, široká ústa a trvalé zakřivení (klinodaktylie) pátého prstu ruky. V některých případech byly popsány též anomálie genitálu a srdeční defekty (*Roberts a kol., 2004*).

18q deleční syndrom je příznačný výskytem MR často spojené s mikrocefilií, úzkým vstupem do zvukovodu, širokým kořenem nosu, obličejových hypoplasií (nedostatečného vyvinutí) a tzv. kapřími ústy. Dále se u tohoto onemocnění vyskytuje malý vzrůst, deformity nohou, poruchy sluchu, deficience růstového hormonu či IgA deficience (*Katz a kol., 1999; Roberts a kol., 2004*).

U pacientů s monozomií 2q37 byla pozorována variabilita klinického projevu odvíjející se od velikosti delece. U všech však bylo možno pozorovat určitý stupeň MR a obličejové dysmorfizmy. Dnes se i tato delece řadí mezi syndromy. V této oblasti se však může vyskytovat též polymorfizmus. Je proto třeba vždy vyšetřit též příbuzné pacienta a pokud je to možné, stanovit přesný rozsah delece. Na stanovení přesné hranice mezi polymorfizmem a patologií se v současné době zaměřují některé studie.

3.4. Polymorfizmy v subtelomerických oblastech a cross hybridizace

Polymorfizmy a cross hybridizace jsou dvě nejběžnější komplikace při FISH vyšetření subtelomer. Pokud se hovoří o polymorfizmu subtelomer, hovoří se v první řadě o polymorfní délce cílových sekvencí některých FISH sond. Prodloužení cílové sekvence má za následek zesílení signálu, zkrácení pak zeslabuje signál a ten se může jevit mdlým až neprůkazným. V případě polymorfizmu v oblasti 2q může být signál sondy tak slabý, že je zde diagnostikována delece. V případě Xp a Yp polymorfizmu mohou cílové sekvence úplně chybět. Při takovém nálezu je vždy třeba vyšetřit oba rodiče k vyloučení delece či polymorfizmu (*Knight a Flint, 2000*).

Polymorfizmus	*Počet případů*	*Zdrojová studie*
17q	1	*Joyce a kol, 2001*
4q	1	*Joyce a kol, 2001*
2q	7	*Van Karnebeek a ko., 2002*
Xp/Yp	4	*Van Karnebeek a ko., 2002*
2q	14	*Knight a kol., 1999*
3q	1	*Riegel a kol., 2001*
Xp	1	*Riegel a kol., 2001*
2q	14	*Rosenberg a klo., 2001*
7q	9	*Rosenberg a klo., 2001*
9p	27	*Rosenberg a klo., 2001*

tabulka 6: Neutrální polymorfizmy nalezené ve vybraných studiích

Delece 2q se často posléze nalezne i u dalších členů rodiny. Patří proto mezi nejčastěji detekované polymorfizmy (*Flint a Knight, 2002*). Pro ověření, zda se v daném případě jedná

skutečně o deleci nebo jen o polymorfizmus, se vyšetřuje oblast vzdálená 240-290 kb od telomery. Tato oblast je pro 2q subtelomeru unikátní a nevykazuje žádný polymorfizmus (*van Karnebeek a kol.,2002*). Delece v oblasti 2q se také často nachází u dětí s autizmem. Zdá se, že by tato delece mohla být predispozicí pro toto onemocnění (*Velagaleti a kol., 2005*).

U cross hybridizace je situace jiná. Cross hybridizace je způsobována podobností sekvencí mezi jednotlivými telomerami. To má za následek, že některé sondy mohou hybridizovat s více chromozómy. Situace pak může působit jako amplifikace s translokací. Jak již bylo zmíněno výše, degenerované (TTAGGG)n repetice rozdělují subtelomerickou oblast na distální a proximální část s odlišnými vzory homologie s jinými chromozómy. Pokud je klon (DNA, kterou nese sonda) odvozen z distální oblasti obsahující bloky krátkých sekvencí, může hybridizovat s více chromozómy. Klony odvozené od proximální oblasti hybridizují jen s malým počtem jiných chromozómů, se kterými sdílí homologní úseky (*Knight a Flint, 2000*).

	Telomera	*Klon*
Polymorfizmy	2q	210E14 (P1), 2112b2 (cosmid)
	Xp, Yp	CY29 (cosmid)
Cross hybridizace	5p s krátkými rameny akrocentrických chromozómů	114j18 (BAC)
	5q s centromerami akrocentrických chromozómů	B22a4 (cosmid)
	8p s 1q	2205a2 (cosmid)
	11p se 17p	2209a2 (cosmid)
	12s s 6p a 20q	496a11 (PAC)

tabulka 7: Polymorfizmy a cross hybridizace u první generace telomerických sond (převzato z *Knight a Flint, 2000*)

Z á v ě r

Odhalení malých přestaveb u mentálně retardovaných pacientů a jejich charakterizace nám mohou pomoci lépe porozumět biologii intelektuálních funkcí (*Flint a Knight, 2003*). Pro rodinu postiženého pak přesná diagnóza a určení příčiny MR skýtá možnosti preventivního vyšetření v případě těhotenství např. u nosiče balancované formy translokace. Stále zůstává mnoho přestaveb nalezených pouze v jednom případě. Další nálezy a popisy fenotypů spojených s určitými přestavbami může v budoucnu zefektivnit vyšetření takto postižených jedinců. Takový pacient by podle svého fenotypu mohl být odeslán pouze na vyšetření konkrétních přestaveb, u nichž byl podobný fenotyp již popsán.

Zatím nejužívanější metodou k vyšetření subtelomer je FISH. Tato metoda se hojně využívá i k potvrzování diagnóz stanovených jinou metodou. Je tak považována za standardní na poli vyšetřování subtelomer.

Tato bakalářská práce je stručným souhrnem metod užívaných k detekci přestaveb v subtelomerické oblasti spolu s nastíněním problematiky jejich výskytu u pacientů s mentální retardací. Měla by sloužit jako podkladový materiál pro mou budoucí diplomovou práci. V té bych ráda publikovala výsledky vyšetření subtelomer pomocí FISH metody u pacientů s mentální retardací ve Fakultní nemocnici v Motole.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:

1. **Adeyinka A, Adams SA, Lorentz CP, Van Dyke DL, Jalal SM**: Subtelomere Deletions and Translocations Are Frequently Familial, *American Journal of Medical Genetics* 2005, 135A:28–35
2. **Anderlid BM, Schoumans J, Anneren G, Sahlen S, Kyllerman M, Vujic M, Hagberg B, Blennow E, Nordenskjold M**: Subtelomeric rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation. *American Journal of Medical Genetics*,2002; 107: 275-84
3. **Armour JA, Sismani C, Patsalis PC, Cross G:** Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucleic Acids Research 28(2000):*605–609
4. **Ballif BC, Gajecka M, Shaffer LG**: Monosomy 1p36 breakpoints indicate repetitive DNA sequence elements may be involved in generating and/or stabilizing some terminal deletions. *Chromosome Research 12* 2004: 133–141
5. **Ballif BC, Wakui K, Gajecka M, Shaffer LG**: Translocation breakpoint mapping and sequence analysis in three monosomy 1p36 subjects with der(1)t(1;1)(p36;q44) suggest mechanisms for telomere capture in stabilizing de novo terminal rearrangements. *Human Genetics* (2004) 114: 198–206.
6. **Ballif BC, Yu W, Shaw CA, Kashork CD, Shaffer LG**: Monosomy 1p36 breakpoint junctions suggest pre-meiotic breakage-fusion-bridge cycles are involved in generating terminal deletions. *Human Moecularl Geneics* 2003. 12: 2153-2165
7. **Biesecker LG**.: The end of the beginning of chromosome ends. *American Journal of Medical Genetics* 2002;107:263–6
8. **Bocian E, Hélias-Rodzewicz Z, Suchenek K, Obersztyn E, Kutkowska-Kaźmierczak A, Stankiewicz P, Kostyk E, Mazurczak T**: Subtelomeric rearrangements: results from FISH studies in 84 families with idiopathic mental retardation, *Medical Scencei Monitor*, 2004; 10(4): CR143-151
9. **Brown J, Saracoglu K, Uhrig S, Speicher MR, Eils R, Kearney L**: Subtelomeric chromosome rearrangements are detected using an innovative 12-color FISH assay (M-TEL). *Nature Medicine*, 2001; 7: 497-501
10. **Clarkson B, Pavenski K, Dupuis L, Kennedy S, Meyn S, Nezrati MM, Nie G, Weksberg R, Withers S, Quercia N, Teebi AS, Teshima I**. Detecting rearrangements in children using subtelomeric FISH and SKY. *American Journal of Medical Genetics* 2002;107:267-74.
11. **de Vries BB, White SM, Knight SJ, Regan R, Homfray T, Young ID, Super M, McKeown C, Splitt M, Quarrell OW, Trainer AH, Niermeijer MF, Malcolm S, Flint J, Hurst JA, Winter RM**: Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *Journal of Medical Genetics* 2001;38:145–50
12. **de Vries BB, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C**.: Telomeres: A diagnosis at the end of the chromosomes. *Journal of Medical Genetics* 2003. 40: 385-398.
13. **Harada N, Hatchwell E, Okamoto N, Tsukahara M, Kurosawa K, Kawame H, Kondoh T, Ohashi H, Tsukino R, Kondoh Y, Shimokawa O, Ida T, Nagai T, Fukushima Y, Yoshiura K, Niikawa N, Matsumoto N**: Subtelomere specific microarray based comparative genomic hybridisation: a rapid detection system for cryptic rearrangements in idiopathic mental retardation, *Journal of Medical Genetics* 2004;41:130-136
14. **Flint J, Knight S**: The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2003; 13: 310-16
15. **Flint J, Wilkie AOM, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE**:. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nauret Geneicst* 1995 9: 132-140
16. **Helias-Rodzewicz Z, Bocian E, Stankiewicz P, Obersztyn E, Kostyk E, Jakubów-Durska K, Kutkowska-Kazmierczak, Mazurczak T**: Subtelomeric rearrangements detected by FISH in three of 33 families with idiopathic mental retardation and minor physical anomalies. *Journal of Medical Genetics*, 2002; 39: e53: Available from: *http://www.jmgjnl.com/cgi/content/full/39/9e53*
17. **Hollox EJ, Atia T, Cross G, Parkin T, Armour JA: High** throughput screening of human subtelomeric DNA for copy number changes using multiplex amplifiable probe hybridisation (MAPH). *Journal of Medical Genetics* 2002, 39:790-795**.**
18. **Hwang KS, Pearson MA, Stankiewicz P, Lennon PA, Cooper ML, Wu J, Ou Z, Cai WW, Patel A, Cheung SW**: Cryptic unbalanced translocation t(17;18)(p13.2;q22.3) identified by subtelomeric FISH and defined by array-based comparative genomic hybridization in a patient with mental retardation and dysmorphic features, *American Journal of Medical Genetics* 2005, 137A:88–93
19. **Joan H.M. Knoll, PhD**: Clinical Consequences of Subtelomeric Chromosomal Rearrangements, přednáška 17. 9. 2003 *P.A.C.E. Seminar*

20. **Joly G, Lapierre JM, Ozilou C, Gosset P, Aurias A, de Blois MC, Prieur M, Raoul O, Colleaux L, Munnich A, Romana SP, Vekemans M, Turleau C**: Comparative genomoc hybridization in mentally retarded patients with dysmorphic features and normal karyotype. *Clinical Genetics*, 2001; 60: 212-19
21. **Joyce CA, Dennis NR, Cooper S, Browne CE**.: Subtelomeric rearrangements: Results from a study of selected and unselected probands with idiopathic mental retardation and control individuals by using high-resolution G-banding and FISH. *Human Genetics* 2001.109:440–451.
22. **Katz SG, Schneider SS, Bartuski A, Trask BJ, Massa H, Overhauser J, Lalande M, Lansdorp PM, Silverman GA**: An 18q- syndrome breakpoint resides between the duplicated serpins SCCA1 and SCCA2 and arises via a cryptic rearrangement with satellite III DNA. *Human Moecularl Geneics.* 1999 Jan;8(1):87-92
23. **Knight SJL, Christa M. Lese CM, Precht KS, Kuc J, Ning Y, Lucas S, Regan R, Brenan M, Nicod A, Lawrie NM, Cardy DLN, Nguyen H, Hudson TJ, Riethman HC, Ledbetter DH, Flint J**: An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *American Journal of Human Genetics* 67, 2000: 320-332
24. **Knight SJ, Flint J**.: Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *Journal of Medical Genetics* 2000. 37: 401-409.
25. **Knight SJL, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J**: Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet*, 1999; 354: 1676-81
26. **Kočárek E, Novotná D, Novotná K, Strnad M, Zapletal R, Goetz P**: Diagnostika chromozomálních aberací (cytogenetické vyšetření a jeho význam v medicíně). *Postgraduální medicína 05, 2002*: 502-510
27. **Molinaro AM, van der Laan MJ, Moore DH:** Comparative Genomic Hybridization Array Analysis. *U.C. Berkeley Division of Biostatistics Working Paper Series*: paper106 (2002)
28. **Pettenati MJ, Jackle B, Bobby P,Stewart W, Von Kap-Herr C, Mowrey P, Rao PN, May KM**: Unexpected retention and concomitant loss of subtelomeric regions in balanced chromosome anomalies by FISH, *American Journal of Medical Genetics* 2002, 111:48–53
29. **Riegel M, Baumer A, Jamar M, Delbecque K, Herens C, Verloes A, Schinzel A:** Submicroscopic terminal deletions and duplications in retarded patients with unclassified malformation syndromes. *Human Genetics* 2001, 109:286-294.
30. **Roberts AE, Cox GF, Kimonis V, Lamb A, Irons M:** Clinical presentation of 13 patients with subtelomeric rearrangements and a review of the literature, *American Journal of Medical Genetics* 2004, 128A:352-363
31. **Rosenberg MJ, Killoran C,Dziadzio L, Chang S, Stone DL, Meck J, Aughton D, Bird LM, Bodurtha JS, Cassidy B, Graham JM, Grix A, Guttmacher AE, Hudgins L, Kozma C,Michaelis RC, Pauli R, Peters KF, Rosenbaum KN, Tifft CJ, Wargowski D, Williams MS, Biesecker LG**: Scanning for telomeric deletions and duplications and uniparental disomy using genetic markers in 120 children with malformations. *Human Genetics* 109, 2001: 311–318
32. **Rosenberg MJ, Vaske D, Killoran CE, Ning Y, Wargowski D, Hudgins L, Tifft CJ, Meck J, Blancato JK, Rosenbaum K, Pauli RM, Weber J, Biesecker LG**: Detection of Chromosomal Aberrations by a Whole-Genome Microsatellite Screen. *American Journal of Human Genetics: 66 2000:419–427,*
33. **Rossi E, Piccini F, Zollino M, Neri G, Caselli D, Tenconi R, Castellan C, Carrozzo R, Danesino C, Zuffardi O, Ragusa A, Castiglia L, Galesi O, Greco D, Romano C, Pierluigi M, Perfumo C, Di Rocco M, Faravelli F, Dagna Bricarelli F, Bonaglia M, Bedeschi M, Borgatti R**.: Cryptic telomeric rearrangements in subjects with mental retardation associated with dysmorphism and congential malformations. *Journal of Medical Genetics* 38 (2001): 417-420
34. **Saccone S, De Sario A, Della Valle G, Bernardi G**.: The highest gene concentrations in the human genome are in the telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992. 89: 4913-4917.
35. **Sismani C, Armour JA, Flint J, Girgalli C, Regan R, Patsalis PC** Screening for subtelomeric chromosome abnormalities in children with idiopathic mental retardation using multiprobe telomeric FISH and the new MAPH telomeric assay. *Europien Journal of Human Genetics 9*(2001):527–532
36. **Sogaard M, Tümer Z, Hjalgrim H, Hahnemann J, Friis B, Ledaal P, Pedersen VF, Baekgaard P, Tommerup N, Cingöz S, Duno M, Brondum-Nielsen K**: Subtelomeric study of 132 patients with mental retardation reveals 9 chromosomal anomalies and contributes to the delineation of submicroscopic deletions of 1pter, 2qter, 4pter, 5qter and 9qter, *BMC Medical Genetics* 2005, 6:21
37. **Van Karnebeek CDM, Koevoets C, Sluijter S, Bijlsma EK, Smeets DFMC, Redeker EJ, Hennekam RCM, Hoovers JMN**: Prospective screening for subtelomeric rearrangements in

children with mental retardation of unknown aetiology: the Amsterdam experience. *Journal of Medical Genetics*,2002; 39: 546-53

38. **Velagaleti GV, Robinson SS, Rouse BM, Tonk VS, Lockhart LH**: Subtelomeric rearrangements in idiopathic mental retardation, *Indian Journal of Pediatrics* 2005;72:679-685
39. **Veltman JA**, **Schoenmakers EF, Eussen BH, Janssen I, Merkx G, van Cleef B, van Ravenswaaij CM, Brunner HG, Smeets D, van Kessel AG**.: High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. *American Journal of Human Genetics* 2002;70:1269–76
40. **Vlčková Z.:** Prezentace a přednášky z let 2004 až 2005; *Seminář ÚBLG 2. LF UK a FN Motol*
41. **Walter S, Sandig K, Hinkel GK, Mitulla B, Ounap K, Sims G, Sitska M, Utermann B, Viertel P, Kalscheuer V, Bartsch O**: Subtelomere FISH in 50 children with mental retardation and minor anomalies, identified by a checklist, detects 10 rearrangements including a de novo balanced translocation of chromosomes 17p13.3 and 20q13.33. *American Journal of Medical Genetics* 2004, 128A:364-373.
42. **Wei-guo Li1, Qing-huan Li1, Zheng Tan1**: Detection of telomere damage as a result of strand breaks in telomeric and subtelomeric DNA. *Electrophoresis* 2005, *26*, 533–53

REJSTŘÍK

12-color FISH asssay ..... *viz* M-TEL
BAC 7, 10
CGH 9
Comparative Genomic Hybridisation ..... *viz* CGH
cross hybridizace 21
Cross hybridizace 22
Degenerate oligonucleotide primer – PCR. *viz* DOP-PCR
DNA polymorfizmy 4
DOP-PCR 10
Dvanáctibarevná subtelomerická FISH .... *viz* M-TEL
FISH 6
Fluorescence In Situ Hybridisation ..... *viz* FISH
genetické pruhovací techniky **5**
G-pruhování **5**
High Resolution Technique ..... *viz* HRT
HRT **5**
Checklist 1 7
malovací sonda 12
MAPH 13
microarray CGH 10
mikrosatelitní markery 4
MLPA 14
M-TEL 8
Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation *viz* MAPH
Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification *viz* MLPA
P1 ..... 7, 8
PAC 7, 8, 10
PCR 5, 13, 14
PCR užívající degenerující oligonukleotidové primery ..... *viz* DOP-PCR
Polymerase chain reaction ..... *viz* PCR
polymerázová řetězová reakce ..... *viz* PCR
polymorfizmus
  2q polymorfizmus 8
polymorfizmus krátkých tandemových repetic ..... *viz* STRPs
SKY 12
spektrální karyotypizace ..... *viz* SKY
Spektrální karyotypování ..... *viz* SKY
STRPs 5
Subtelomerické delece 18
  18p 19
Subtelomerický polymorfizmus 21
  2q 19,22
  Xp 22
  Yp 22
Syndromy asociované s přestavbami subtelomer ... 20
  18p 21
  18q 21
  1p36 ..... 20, 21
  22q 20
  2q37 21
TAR 2
telomera 2
VNTR 4
Výběrová kriteria ..... *viz* Checklist
vysoce rozlišující technika ..... *viz* HRT
YAC 8