# UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA


---

# VYUŽITÍ FLUORESCENČNÍ POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE V ČASNÉ PRENATÁLNÍ DIAGNOSTICE ANEUPLOIDIÍ AUTOZOMŮ A HETEROCHROMOZOMŮ

Disertační práce

---


**Martina Putzová**

**Školitel: Prof. MUDr. Petr Goetz, CSc.**



Praha 2008

OBSAH

Obsah ... - 1 -
1. Úvod ... - 2 -
1.1. Typy repetitivních sekvencí ... - 3 -
1.2. Mapování lidského genomu ... - 4 -
1.3. Polymorfizmus DNA ... - 5 -
1.4. STR lokusy ... - 6 -
1.4.1. Názvosloví alel STR lokusů ... - 8 -
1.5. Detekce a analýza fragmentů DNA ... - 8 -
1.6. Chromozomální aberace ... - 10 -
1.6.1. Vznik aneuploidií ... - 11 -
1.6.2. Přehled nejčastějších aneuploidií ... - 13 -
1.6.2.1. Nejčastější aneuploidie autozomů ... - 13 -
1.6.2.1.1. Downův syndrom ... - 13 -
1.6.2.1.2. Patauův syndrom ... - 14 -
1.6.2.1.3. Edwardsův syndrom ... - 14 -
1.6.2.2. Nejčastější aneuploidie pohlavních chromozomů ... - 15 -
1.6.2.2.1. Turnerův syndrom ... - 15 -
1.6.2.2.2. Klinefelterův syndrom ... - 16 -
1.6.2.2.3 Trizomie chromozomu X (Supefemale syndrom) ... - 16 -
1.6.2.2.4. XYY-Syndrom (Supermale syndrom) ... - 17 -
1.6.3. Původ nadbytečného chromozomu a mechanizmy vzniku Downova syndromu ... - 17 -
1.6.4. Rizikové faktory vzniku aneuploidií ... - 19 -
1.6.5. Diagnostika aneuploidií ... - 22 -
1.6.5.1. Kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce (QF-PCR) ... - 24 -
1.6.5.1.1 Metody detekce fluorescence ... - 29 -
2. Cíle práce ... - 31 -
3. Materiál a metodika ... - 32 -
3.1. Biologický materiál ... - 32 -
3.2. Metodika ... - 32 -
3.3. Vlastní pracovní postup ... - 33 -
4. Výsledky ... - 36 -
5. Diskuze ... - 46 -
6. Souhrn ... - 52 -
7. Definice a terminologie ... - 53 -
8. Přílohy ... - 54 -
9. Použitá literatura ... - 62 -

# 1. Úvod

Lidská molekulární genetika byla v minulosti v porovnání s ostatními genetickými odvětvími limitována především nedostatečným množstvím známých polymorfních markerů a nemožností experimentálního křížení. V rámci Projektu Lidského Genomu došlo k velkému rozvoji metod, které pomohly překonat tato omezení. Jsou to především technologie rekombinantní DNA a bioinformatika.

Předpokladem tohoto průlomu v oblasti lidské genetiky byla identifikace velkého množství polymorfních variant DNA, které se liší buď v jediném nukleotidu či v počtu repetitivních elementů. Znalost těchto polymorfizmů umožnila nejen stanovení detailní vazebné mapy lidského genomu, ale i zavedení zcela nových molekulárně genetických metod analýzy DNA.

Tyto nové metody nacházejí v současné době důležité uplatnění v lékařské genetice při prenatální, postnatální či preimplantační diagnostice některých závažných onemocnění, určování pohlaví nebo identifikaci původu specifických genů a nebo chromozomů. Ve forenzní biologii se využívají k individuální identifikaci osob, popřípadě k řešení paternitních sporů. V evoluční biologii pomáhají řešit otázky týkající se původu člověka a v populační biologii slouží při určování vztahu mezi populacemi, osvětlují způsoby jejich migrace apod.

V této disertační práci byla využita specifická třída vysoce polymorfních markerů, tzv. krátkých repetitivních sekvencí (Short Tandem Repeats - "STR lokusy") k prenatální i postnatální diagnostice nejčastějších lidských aneuploidií metodou kvantitativní fluorescenční polymerázové řetězové reakce (Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction - "QF-PCR").

STR lokusy jsou poměrně krátké, vysoce variabilní úseky DNA, které jsou v lidském genomu široce rozšířené. S použitím PCR (Polymerase Chain Reaction) jsou využitelné i v případě malého množství či částečně degradované DNA. Při běžných komparativních vyšetřeních v medicíně je možné srovnat zastoupení alel u testovaných jedinců (např. rodiče -dítě), při výpočtech příbuznosti či při individuální identifikaci jedince je nutné znát frekvence alel ve studovaných lokusech.

Nejčastější chromozomální aneuploidie zahrnují chromozomy 21, 18, 13 a pohlavní chromozomy. Tyto chromozomy jsou zodpovědné za více než 80 % chromozomálně podmíněných vývojových vad. Metoda QF-PCR umožňuje molekulární

detekci aneuploidií jmenovaných chromozomů. Tato metoda zároveň umožňuje zjištění rodičovského původu nadbytečného chromozomu a určení, zda k procesu nondisjunkce došlo v první či druhé meióze, popřípadě v mitóze.

### *1.1. Typy repetitivních sekvencí*

Lidský jaderný genom (Strachan a Read 1999) je pouze asi z 1-2 % tvořen unikátními či nízce repetitivními sekvencemi kódujícími proteiny, transferové a ribozomální RNA. Dalších přibližně 8 % tvoří introny, regulační oblasti genů, mezigenové sekvence, mezerníky, popřípadě genové fragmenty. Přibližně 90 % lidského jaderného genomu představuje extragenová DNA. Ta je z 70-80 % tvořena nekódujícími unikátními či repetitivními sekvencemi a z 20-30 % vysoce repetitivními sekvencemi. Tyto vysoce repetitivní sekvence jsou ještě dále rozdělovány na rozptýlené repetitivní sekvence (tvoří 15-20 % jaderného genomu) a tandemově uspořádané repetitivní sekvence (tvoří 10 % jaderného genomu).

Na základě rychlosti reasociace DNA (procesu spojování komplementárních polydeoxyribonukleotidových řetězců denaturovaného vzorku DNA, který je navozen pomalou teplotní renaturací) je repetitivní DNA (včetně nekódující repetitivní DNA a genů a genových fragmentů nacházejících se v genomu v mnoha kopiích) rozdělována na **středně repetitivní sekvence** ( do 100 000 kopií na haploidní genom - většinou tvoří regulační geny, geny pro tRNA, rRNA a histony, tvoří asi 30 % jaderného genomu) a **vysoce repetitivní sekvence** (více než 100 000 kopií na haploidní genom - většinou se vyskytují v oblasti centromer a tvoří tzv. satelitní DNA, která představuje asi 10 % jaderného genomu).

**Rozeznáváme následující druhy repetitivních sekvencí:**

***1. rozptýlené repetice***

**SINES** (Short Interspersed Elements)
- dlouhé méně než 500 bazí (bp), např. *Alu*-repetice, dlouhá asi 300 bp, vyskytuje se v lidském genomu asi v 20 000 - 50 000 kopiích, tvoří asi 5 % lidského genomu

**LINES** (Long Interspersed Elements)
- dlouhé více než 500 bazí, např. L1 nebo Kpn elementy, tvořící přibližně 1 - 2 % lidského genomu

***2. tandemové repetice***

**mikrosatelitní DNA** (**STR** - Short Tandem Repeats)

- motiv dlouhý 1 - 6 bazí, několik až několik stovek opakování, např. CA repeats, tetranukleotidové STR běžně používané v medicíně a kriminalistice

**minisatelitní DNA** (**VNTR** - Variable Number of Tandem Repeats)

- motiv dlouhý 10 - 70 bazí, několik až několik desítek opakování, např. Apo B, MCT118, YNZ22 (VNTR původně používané pro kriminalistickou identifikaci)

**satelitní DNA**

- motiv dlouhý desítky až tisíce bazí, stovky až tisíce opakování, charakteristická a většinou rodově či druhově specifická DNA z okolí centromer

**megasatelitní DNA**

- motiv dlouhý několik tisíc bazí až několik set tisíc bazí, nachází se na různých místech některých chromozomů

### *1.2. Mapování lidského genomu*

Myšlenka kompletního zmapování lidského genomu byla poprvé vyslovena v roce 1986 na vědeckém sympoziu "Molecular Biology of Homo Sapiens" v americkém Cold Spring Harbor. V roce 1988, opět na sympoziu v Cold Spring Harbor (USA), byla vytvořena mezinárodní organizace **HUGO** (Human Genom Organisation), která měla za úkol koordinaci HGP (Human Gene Project). Na projektu se podílely vědecké týmy mnoha zemí světa a své výsledky denně zveřejňovaly na internetu. V roce 1998 byla Craigem Venterem založena soukromá společnost **Celera Genomics** (podle latinského celer - rychlý, hbitý), která si vytkla stejný cíl. Projekt byl následně rychle a úspěšně dokončen. Oba týmy zveřejnily své výsledky současně (únor 2001), vědci pracující v rámci HGP v odborném časopise Nature, pracovníci z Celera Genomics v časopise Science.

Sekvence lidského genomu obou týmů jsou téměř shodné a přinášejí mnohá překvapení. Genetická výbava člověka obsahuje dle obou týmů méně než 35 tisíc genů oproti původně předpokládaným 60 - 100 tisícům. DNA dvou lidí, a to i příslušníků různých ras, se shoduje v 99,9 %. DNA kódující proteiny tvoří podle nejnovějších

informací pouze 1,1 -1,4 % DNA přítomné v buňce a tyto kódující sekvence tvoří pouze 5 % z celkových 28 % sekvencí přepisovaných do RNA (Baltimore 2001). V DNA mužů vzniká až dvojnásobek mutací v porovnání s DNA žen. Asi 220 genů, které člověk sdílí s bakteriemi, nemají nižší organismy jako jsou kvasinky, muška octomilka apod. Zatím není jisté, zda lidé "převzali" tyto geny od bakterií či bakterie od lidí.

### *1.3. Polymorfizmus DNA*

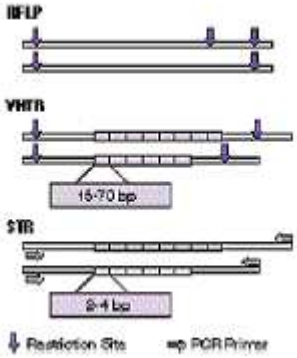
Znak s nejméně dvěma geneticky podmíněnými variantami, které se liší fenotypovým projevem, nazýváme genetickým polymorfizmem. Vzhledem ke struktuře lidského genomu se většina variací DNA nachází v nekódujících oblastech a ve fenotypu se neprojeví. V tomto případě hovoříme o polymorfizmu DNA, kde se nukleotidové sekvence liší nejen mezi dvěma jedinci, ale i na otcovském a mateřském chromozomu jednoho jedince. Polymorfní alela je taková, která má v populaci frekvenci vyšší než 1 % a nižší než 99 %. Tato hranice byla stanovena arbitrárně. Analýzou polymorfních lokusů získáme cenné informace o pohlaví, dědičných chorobách, příbuzenských vztazích apod.

DNA markery, rozlišující jedince mezi sebou, jsou známé od roku 1980 (Orkin 1986), kdy byl objeven polymorfizmus délky restrikčních fragmentů - **RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism) na chromozomu 14. Enzym restrikční endonukleáza (každá restrikční endonukleáza rozpoznává své specifické restrikční místo, tedy určitou sekvenci nukleotidů) přeruší na příslušném místě obě vlákna DNA. Při štěpení vznikají fragmenty různých délek, u lidské DNA podle typu restriktázy $10^5$ - $10^7$ fragmentů o délce několik párů bazí až tisíců párů bazí. Pokud mutace nastala právě v cílovém místě příslušné restrikční endonukleázy, k rozštěpení DNA nedojde a fragment bude delší než původní formy lokusu. Jedná se zde o tzv. *bodový polymorfizmus* (záleží na sekvenci restrikčního místa).

**VNTR** (Variable Number of Tandem Repeats) polymorfizmus byl popsán v roce 1985 (Jeffreys et al. 1985, Gill et al. 1985). Délka fragmentu DNA (tedy přítomná alela) nezáleží na přítomnosti či nepřítomnosti restrikčního místa, ale na počtu za sebou se opakujících základních motivů, které jsou dlouhé 15 - 70 bazí (mnohonásobně po sobě se opakující sekvence nukleotidů).

**STR** (Short Tandem Repeats) polymorfizmus (Jeffreys et al. 1985) je způsoben rozdílným počtem opakování mononukleotidových až hexanukleotidových sekvencí. V

molekulární diagnostice jsou využívány především polymorfismy s délkou motivu 2 - 4 párů bazí.




**Obr. 1**: Schéma znázorňující rozdílné typy polymorfních DNA markerů. Svislé šipky značí restrikční místo dané restriktázy, horizontální šipky značí primery ohraničující repetitivní sekvenci.
(převzato http://www.promega.com/pnotes/58/5189c/5189c.html#f1)

Délka RFLP markerů je závislá na přítomnosti či nepřítomnosti cílového místa pro příslušnou restrikční endonukleázu. VNTR a STR markery obsahují opakující se sekvence, jejichž základní opakující se motiv je dlouhý nejčastěji 15 - 70 bazí (VNTR) a 2 - 4 baze (STR).

### *1.4. STR lokusy*

Tandemové repetitivní sekvence jsou v lidském genomu široce rozšířené a vykazují v populaci vysokou variabilitu. Podskupinou tandemových repetic jsou mikrosatelity - **STR** (Short Tandem Repeats), jejichž základní opakující se sekvence sestává z jednoho až šesti nukleotidů. Podle počtu bazí, které tvoří opakující se motiv, jsou nazývány mononukleotidy, dinukleotidy, trinukleotidy, tetranukleotidy, pentanukleotidy a hexanukleotidy. STR lokusy jsou v genomu rozptýleny v mnoha kopiích a jsou lokalizovány jak v genech, tak mimo ně.

Mononukleotidové repetice, převážně sekvence tvořené adeninem (A) a tyminem (T), jsou velmi běžné a tvoří společně přibližně 0,3 % jaderného genomu. Naproti tomu sekvence tvořené guaninem (G) a cytozinem (C) jsou méně časté.

Dinukleotidové repetice tvořené opakováním CA (TG na komplementárním vlákně) jsou velmi časté a tvoří 0,5 % genomu. CT/AG opakování jsou také poměrně časté, vyskytují se přibližně každých 50 kb a tvoří 0,2 % genomu. CG/GC opakování se vyskytují velmi vzácně. Je to proto, že reaktivní skupiny C jsou cílem methylace a následné deaminace a tím se vytvoří TG/CA opakování.

Počet objevených trinukleotidových, tetranukleotidových, pentanukleotidových a hexanukleotidových repetic rychle stoupá. Jejich funkce v genomu však není dosud známa. V některých genech byly objeveny poměrně dlouhé sekvence specifických trinukleotidů, a to jak v intronech, tak v jejich kódujících sekvencích. V některých případech může dojít k jejich expanzi, což má za následek ztrátu funkce takto postiženého genu. Takový mechanizmus vzniku onemocnění byl zjištěn například u Huntingtonovy chorey, syndromu fragilního X chromozomu, spinocerebelární ataxie, myotonické dystrofie či Friedreichovy ataxie.

Di-, tri-, tetra- a pentanukleotidové STR lokusy jsou vysoce polymorfní. Odlišný počet tandemově se opakujícího základního sekvenčního motivu má za následek odlišnou délku jednotlivých alel. Tato vysoká variabilita je způsobena sklouznutím DNA polymerázy během procesu replikace, která vede k vytvoření delší či kratší STR sekvence. Tento proces vedl k vytvoření velkého množství různě dlouhých alel. Tato vlastnost se nazývá délkový polymorfismus STR alel. Vysoké procento polymorfizmu znamená, že náhodně vybraná osoba bude s velkou pravděpodobností heterozygotní pro sledovaný STR, tzn. ponese dvě alely s různým počtem opakování. Počet opakování zůstává během života stabilní. Tyto vlastnosti spolu s možností automatizace analýzy dinukleotidových, trinukleotidových a tetranukleotidových STR polymorfizmů z nich učinilo spolehlivý nástroj molekulárně genetické analýzy (Strachan a Read 1999). Využití je možné nejen v nepřímé molekulárně genetické diagnostice při sledování kosegregace neznámé mutace s danou STR alelou v rodinách probandů, ale také umožňuje přímou molekulárně genetickou diagnostiku delecí a duplikací.

Ze známých STR lokusů jsou v praxi preferované tzv. **tetranukleotidové repetice**, kde je opakující se motiv tvořen čtyřmi páry bazí. Amplifikace tetranukleotidových repetic je spolehlivá a vzniká při ní poměrně málo tzv. "stutter"

fragmentů (fragmenty o čtyři baze kratší, vznikající chybou DNA polymerázy) (Strachan a Read 1999), které by mohly být mylně považovány za alelu. Používání dinukleotidových repetic (např. CA repetice), kde "stutterů" vzniká hodně, může být z tohoto důvodu problematické. Často je proto velmi těžké rozlišit, zda se jedná o alelu, nebo "stutter". Repetic obsahujících tři, pět a šest nukleotidů není v genomu zatím mnoho známo, ale také se v některých případech používají. Kombinací několika tetranukleotidových lokusů dosáhneme vysokého stupně diskriminace mezi jednotlivci. Mezi důležité pozitivní vlastnosti STR polymorfizmů patří pravidelná repetitivní sekvence a poměrně malá velikost alel, proto lze rozlišit i fragmenty, které se liší pouze o jediný nukleotid. Při použití PCR reakce je možná analýza STR lokusů z velmi malého množství i degradované DNA.

V lidském genomu bylo nalezeno a popsáno tisíce STR lokusů. Stovky z nich byly nebo jsou testovány pro využití v medicíně. STR lokusy se nacházejí na všech chromozomech.

### 1.4.1. Názvosloví alel STR lokusů

Názvosloví alel STR lokusů bylo sestaveno nomenklaturní komisí HUGO. Názvy genů a pseudogenů jsou tvořeny dvěma až šesti znaky. P na konci názvu označuje pseudogen. DNA sekvence jsou označovány D (= DNA), následuje 1 - 22, X nebo Y označující chromozom, na kterém se tento STR lokus nachází. Poté následuje S - pro unikátní sekvenci (např. DYS29, D21S1411), Z pro chromozomálně specifickou repetitivní DNA rodinu, popřípadě F pro multilokusovou DNA rodinu. Následuje pořadové číslo sekvence. Písmeno E následující po pořadovém čísle značí, že sekvence je exprimována (např. D3S2550E)(Strachan a Read, 1999).

## *1.5. Detekce a analýza fragmentů DNA*

Při analýze polymorfních úseků DNA je v dnešní době velice hojně využívána polymerázová řetězová reakce - PCR. Při PCR je in vitro mnohonásobně namnožen vybraný úsek DNA, získané fragmenty DNA jsou poté elektroforeticky rozděleny a následně detekovány. Specifita reakce je zajištěna výběrem primerů, což jsou unikátní oligonukleotidové sekvence ohraničující místo, které chceme namnožit. Zavedení PCR umožňuje analýzu i velmi malého množství i částečně degradované DNA.

**Analýza fragmentů DNA** může být provedena několika způsoby.

1. Namnožíme-li úsek, ve kterém se vyskytuje STR či VNTR oblast (rozdílný počet opakování základního motivu), dostaneme jeden, nebo dva produkty podle toho, zda je jedinec v analyzovaném lokusu homozygotní, nebo heterozygotní. Následnou elektroforézou a srovnáním pozice fragmentu s pozicí velikostního markeru zjistíme délku analyzovaného fragmentu. Tento postup se využívá při zjišťování, zda jednotlivé vzorky pocházejí ze stejného jedince, při určování pohlaví, paternity nebo při identifikaci jedince. V případech (např. identifikace jedince), kdy je nutné zjistit, které konkrétní alely jsou ve vzorku přítomny, je možné použít komerční kity (např. PowerPlex16 (Promega, USA), se kterými jsou dodávány alelové žebříčky, které umožňují přesnou identifikaci přítomných alel.
2. Ohraničují-li primery pouze sekvenčně variabilní místo a PCR produkty jsou tedy u všech alel stejně dlouhé, nelze produkty odlišit běžnou elektroforézou. Alely v tomto případě rozlišíme reverzní dot-blot (bodovou) hybridizací. PCR produkty hybridizujeme k membráně, na které jsou navázány oligonukleotidové sondy specifické pro jednotlivé alely. Podle toho, na kterou sondu se produkt naváže, poznáme, o kterou alelu se jedná. Metoda se používá např. při určování HLA antigenů.
3. Pokud vybrané primery ohraničují polymorfní restrikční místo (RFLP), je možné PCR produkty příslušnou restrikční endonukleázou štěpit a elektroforézou zjistit, zda ke štěpení došlo. Tento postup se využívá například při určování krevních skupin či dědičných chorob.
4. Nejúplnější, ale časově nejnáročnější analýzu polymorfního místa DNA provedeme sekvenováním (přesným určením sekvence nukleotidů vybraného úseku DNA).

Další možností detekce velikosti restrikčních fragmentů (RFLP) je hybridizace těchto fragmentů se značenou sondou (známý a obvykle syntetický oligonukleotidový úsek DNA). Rozštěpené fragmenty DNA se nejprve rozdělí elektroforézou podle velikosti a takto rozdělené se přenesou a zakotví na membránu (tzv. "blotting"). Značená sonda hybridizuje k místům na DNA, které mají k této sondě komplementární sekvenci. Další možností je kombinace metody RFLP s PCR.

### *1.6. Chromozomální aberace*

Chromozomální aberace mohou být numerické nebo strukturální. Mohou postihnout jeden nebo více autozomů, pohlavní chromozomy nebo obě skupiny současně. Konkrétní abnormalita může být přítomná ve všech buňkách těla, nebo se může vyskytnout více buněčných linií. Stav, při kterém se kromě normální buněčné linie vyskytuje více abnormálních linií se nazývá **mozaicizmus**.

Počet chromozomů je typický pro každý druh (u člověka je to 2n = 46, resp. n = 23). Každý počet, který je násobkem haploidního počtu, se nazývá **euploidní**. U člověka je kromě normální diploidie (2n) známa **triploidie** (3n) i **tetraploidie** (4n), ale jen velice málo triploidních plodů se narodilo živých a tetraploidie byly zjištěny jen u plodů potracených v časné fázi těhotenství. Takové sady chromozomů, které jsou celým násobkem haploidního souboru, se nazývají **polyploidní**. Polyploidie může vzniknout několika mechanizmy. Triploidie vzniká selháním jednoho meiotického dělení ve vajíčku nebo ve spermii. Tetraploidní buňky obsahují vždy gonozomový komplement XXXX nebo XXYY. To vede k předpokladu, že tetraploidie vzniká neschopností dokončit první dělení rýhující se zygoty.

Takový počet chromozomů, který není celým násobkem n, je **aneuploidní**. Některé typy aneuploidie se označují jako **trizomie** (počet chromozomů je 2n + 1, přičemž se jeden z chromozomů vyskytuje třikrát - např. Downův syndrom), některé se označují jako **monozomie** (počet chromozomů je 2n - 1 , přičemž jeden z chromozomů se vyskytuje pouze jedenkrát) a další se označují jako dvojnásobné trizomie (počet chromozomů je 2n + 1 + 1, přičemž se v nadbytečné kopii vyskytují dva různé chromozomy). Počet chromozomů, který se liší od typického počtu n nebo 2n, se označuje jako **heteroploidní** bez ohledu na to, zda je euploidní nebo aneuploidní.

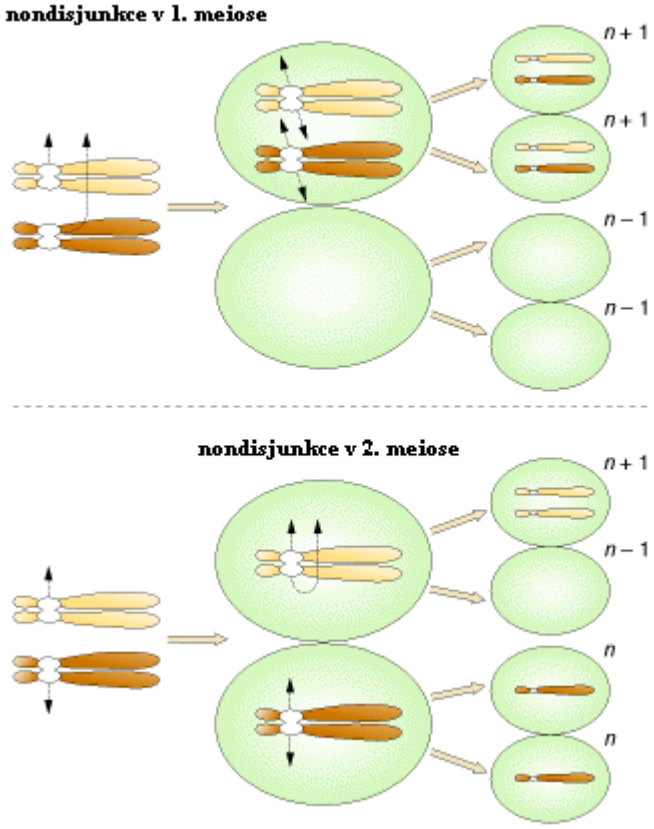
Dalším typem chromozomálních aberací jsou **strukturální aberace chromozomů.** Strukturní přestavby jsou následkem zlomů chromozomů, po kterých dochází k novotvorbě abnormálních kombinací chromozomálních fragmentů. Chromozomální zlomy se v nízké frekvenci vyskytují i za fyziologických podmínek, dají se však také vyvolat širokou škálou mutagenů (breaking agents), jako je například ionizující záření, některé virové infekce a mnohé chemikálie (chemomutageny). Změny, které vzniknou vlivem zlomů chromozomů, mohou být stabilní (to znamená, že jsou schopné bez poškození absolvovat buněčné dělení, neboť obsahují centromeru), nebo jsou nestabilní. Mezi stabilní typy aberací patří delece, duplikace, inverze, translokace,

inzerce a izochromozomy. Nestabilní typy, které nejsou schopné překonat normální buněčné dělení, jsou zejména acentrické fragmenty .

### 1.6.1. Vznik aneuploidií

Aneuploidie vznikají nondisjunkcí v průběhu buněčného dělení (viz. obr. 2). Nondisjunkce znamená nerozpojení - páry chromozomů nebo sesterských chromatid se nejsou schopny oddělit. To vede k nerovnoměrnému rozdělení páru chromozomů do dceřinných buněk. Nondisjunkce může nastat v prvním meiotickém dělení, druhém meiotickém dělení, nebo v mitóze. Následky jsou odlišné. Pokud nondisjunkce nastane v prvním meiotickém dělení, gameta, která obsahuje nadbytečný chromozom, obsahuje v páru s tímto nadbytečným chromozomem i jeden chromozom otcovského a jeden chromozom mateřského původu. Pokud však nondisjunkce postihne dvě chromatidy jednoho chromozomu v průběhu druhého meiotického dělení, gameta s n + 1 chromozomy bude obsahovat chromozom otcovského nebo mateřského původu v dvojnásobném množství (v tomto zjednodušeném výkladu byl pominut vliv crossing-overu). K nondisjunkci může dojít v obou po sobě následujících meiotických děleních. Takovéto aberace byly však zatím popsány pouze zřídka, výjimkou jsou polyzomie X chromozomu. Polyzomie může vzniknout i mitotickou nondisjunkcí především v některých liniích maligních buněk popřípadě v buněčných kulturách. Dvojnásobná aneuploidie (např. trizomie dvou různých chromozomů současně) není výjimkou.

**Mechanismus vzniku aneuploidie**




**Obr. 2**: Mechanizmus vzniku aneuploidie v průběhu meiotického dělení. Po nondisjunkci v prvním meiotickém dělení vznikají gamety, které mají buď oba chromozomy páru, nebo ani jeden. Po nondisjunkci v druhém meiotickém dělení vznikají gamety, které obsahují buď dva identické chromozomy, pocházející z jediného člena homologického páru, nebo neobsahují ani jeden chromozom.

K nondisjunkci může dojít i po vytvoření zygoty, tedy v mitóze. V tomto případě jsou předmětem nondisjunkce chromatidy jednoho chromozomu podobně jako při druhém meiotickém dělení. Pokud k chybě dojde v časné fázi rýhování zygoty, vzniknou dvě linie buněk - trizomická a monozomická. Trizomická linie většinou přetrvá, zatímco monozomická obvykle zanikne. Chromozom X je i v tomto případě výjimkou. Buněčná linie s jedním chromozomem X je životaschopná. Mitotická nondisjunkce může být také důležitým mechanizmem stojícím na počátku některých forem nádorové transformace.
Fenotypický projev určitých typů aberací nezávisí pouze na četnosti buněk s patologickým nálezem, ale také na tom, zda byla aberace předána na mateřském či otcovském chromozomu, na mechanizmu takzvaného genomického imprintingu či na

tom, zda určitá aberace není důsledkem zdědění obou homologních chromozomů pouze od jednoho z rodičů - tzv. uniparentální dizomie. Uniparentální dizomie může být příčinou vrozených vývojových vad plodu či dítěte s normálním chromozomálním nálezem.

### 1.6.2. Přehled nejčastějších aneuploidií

Aneuploidie jsou jednou z významných příčin vrozených vývojových vad a úmrtnosti plodů během prenatálního období. Vyskytují se přibližně u 8 % všech zárodků. Většina takových zárodků je však během těhotenství spontánně potracena. Aneuploidie se proto nacházejí přibližně u poloviny potracených plodů, ale "pouze" u 0,7 % živě narozených dětí. Trizomie chromozomů 21, 18 a 13 a aneuploidie chromozomů X a Y jsou zodpovědné za 95 % chromozomálně podmíněných vrozených vývojových vad plodu (Hassold a Jacobs 1984, Thomson et al. 1991).

#### 1.6.2.1. Nejčastější aneuploidie autozomů

##### *1.6.2.1.1. Downův syndrom*

Downův syndrom (47,+21) je nejčastější a nejznámější chromozomální aberací. Poprvé jej popsal Langdon Down v roce 1866 (převzato z Thompson a Thompsonová 1988). Jeho příčina však zůstala utajena ještě dalších sto let. V roce 1932 upozornil Waardenburg, že by tento nález mohl být způsoben chromozomální anomálií. Až v roce 1959 se toto podezření potvrdilo (Lejeune et al. 1959). Ve světové literatuře se uvádí incidence přibližně 1 případ na 700 živě narozených dětí (Hassold a Jacobs 1984; Cuckle a Wald 1990). Mezi nejdůležitější fenotypové znaky patří psychomotorické retardace, mongoloidní vzhled, velký jazyk, krátké a široké ruce, zvýšené riziko vzniku leukémie. Častý je u těchto dětí výskyt vrozených vývojových vad srdce či atrézie střeva. Délka života pacientů bývá obvykle zkrácena.

Více než 95 % případů Downova syndromu je způsobeno volnou trizomií chromozomu 21 (Giraud a Mattei 1975) vzniklou nondisjunkcí během meiotického dělení. Jen asi 5 % případů je způsobeno translokacemi či nondisjunkcí během mitotického dělení v somatických buňkách, která vede k mozaikovým formám Downova

syndromu (Antonarakis et al. 1993). U mozaikových forem trizomie dochází k zmenšení výskytu a snížení závažnosti jednotlivých fenotypových projevů v závislosti na procentuálním zastoupení trizomických buněk v jednotlivých tkáních.

Byly též popsány parciální trizomie chromozomu 21. Tyto případy upozornily na to, která část chromozomu je v převážné míře zodpovědná za fenotypové projevy Downova syndromu. Jedná se o pruh 21q22.3 v distální části dlouhého raménka (Reeves et al. 2001).

#### *1.6.2.1.2. Patauův syndrom*

Patauův syndrom (47,+13) jako první diagnostikoval Patau v roce 1960. Vzhledem k tomu, že se tři páry chromozomů ze skupiny D nedaly dříve spolehlivě odlišit, je ve starší literatuře tento syndrom popisován jako trizomie D1. Vyskytuje se v četnosti přibližně 1 případ na 4 000 až 10 000 živě narozených dětí. O něco častěji postihuje děvčata. Pacienti mají výrazně zkrácenu délku života - až 86 % umírá do konce 1. roku života. Třetina těchto dětí se rodí předčasně. V klinickém obraze jsou nejnápadnější mnohočetné anomálie na obličeji a končetinách. Psychický a somatický vývoj je velmi retardován. Cytogenetickým podkladem uvedených klinických projevů je v přibližně 75 % případů volná trizomie chromozomu 13. Její výskyt podobně jako u trizomií chromozomů 21 a 18 souvisí s vyšším věkem matky. Asi 20 % případů je způsobených translokací (nejčastější je nevyvážená robertsonská translokace 13q/Dq), což je častější než u Downova syndromu. Nebezpečí narození analogicky postiženého dítěte z další gravidity je však poměrně malé, a to i v případě, že je jeden z rodičů přenašečem translokace. Dále může být tento syndrom způsoben mozaikou normálních a 13-trizomických buněk (v 5 % případů)(Thomson et al. 1991).

#### *1.6.2.1.3. Edwardsův syndrom*

Edwardsův syndrom (47,+18) popsal jako první Edwards v roce 1960. Ve starší literatuře je často označován jako trizomie E. Výskyt této anomálie je přibližně 1 na 7 500 živě narozených dětí. Ženské pohlaví je postiženo čtyřikrát častěji, což je pravděpodobně způsobeno častějším odumřením plodů mužského pohlaví během prenatálního vývoje. Až 95 % plodů s Edwardsovým syndromem je během těhotenství

spontánně potraceno. Délka života pacientů je výrazně zkrácena. Většina těchto dětí umírá před dokončením šestého měsíce života. Charakteristická je těžká psychomotorická retardace a mnohočetné vrozené vývojové vady. Cytogenetickým podkladem je trizomie chromozomu 18, která se nejčastěji vyskytuje jako volná, méně často v mozaice (asi v 10 % případů), popřípadě jako translokační formy. U mozaikových forem mají pacienti mírnější klinické příznaky a déle přežívají (Thomson et al. 1991).

### 1.6.2.2. Nejčastější aneuploidie pohlavních chromozomů

V porovnání s autozomálními aberacemi jsou anomálie gonozómů podstatně rozmanitější, ale v podstatně méně závažné. Mezi jejich hlavní příznaky patří anomálie pohlavních orgánů a s tím spojené poruchy reprodukce. Obecně platí, že čím více je nadpočetných X, tím výraznější je mentální retardace u postižených jedinců. Nejčastějšími gonozomálními aberacemi je Turnerův syndrom (monozomie chromozomu X), Klinefelterův syndrom (47,XXY), trizomie chromozomu X a XYY-syndrom.

#### *1.6.2.2.1. Turnerův syndrom*

Turnerův syndrom je způsoben monozomií chromozomu X (45,X). Četnost výskytu této gonozomální aberace je přibližně 1 případ na 2 500 živě narozených děvčat. Pacientky s kompletním Turnerovým syndromem mají ženský fenotyp. Poměrně častá bývá sterilita a v některých případech se může vyskytnout porucha intelektu. I přes to, že je tato chromozomální aberace slučitelná se životem, dochází ke spontánnímu potracení vysokého procenta (v literatuře je uváděno až 95%) plodů s karyotypem 45,X. Při kompletním Turnerově syndromu je cytogeneticky zjištěna absence X-chromatinu a analýza chromozomů odhalí monozomii X. Přítomný chromozom X je v 80 % případů mateřského původu, z čehož vyplývá, že k nondisjunkci v meióze dochází převážně u otce. Při nálezu fenotypu typického pro Turnerův syndrom a negativním nálezu X-chromatinu může jít o gonozomové mozaiky. Asi jedna pětina pacientek s Turnerovým syndromem má pozitivní nález X-chromatinu. Nejčastější je mozaika typu 45,X/46,XX. Linie buněk s normálním karyotypem 46,XX zmírňují fenotypové projevy Turnerova syndromu. V případě, že normální linii buněk

představují buňky s gonozomovým komplementem představujícím mužský karyotyp (46,XY), nebo jeho aberace (47,XXY; 47,XYY), případně jejich kombinace, dochází opět ke zmírnění projevů Turnerova syndromu, ale je možné současně pozorovat různý stupeň virilizace. Oba tyto jevy (zmírnění, virilizace) opět závisí na procentuálním zastoupení zmiňovaných typů buněk. Výskyt mozaikových forem a jiných gonozomálních aberací kromě klasického karyotypu 45,X se odhaduje na téměř 50 % (Thomson et al. 1991).

#### *1.6.2.2.2. Klinefelterův syndrom*

Klinefelterův syndrom (47,XXY) je relativně častá gonozomální aberace u mužského pohlaví. Její výskyt je přibližně 1 případ na 1 000 narozených chlapců. Typicky se vyskytuje habitus mužského typu. Pacienti jsou eunuchoidní, vyššího vzrůstu, převážně neplodní v důsledku hypoplázie varlat. IQ kolísá v širokém rozpětí. Vyšetření X-chromatinu odhalí u pacientů s Klinefelterovým syndromem jeho přítomnost. Skutečný stav je odhalen až chromozomálním vyšetřením. V karyotypu je nejčastěji (až v 80 % případů) zjištěn gonozomální komplement XXY. Nadbytečný chromozom X pochází ve většině případů od matky. Většina těchto nadbytečných chromozomů mateřského původu je důsledkem poruchy v 1. meiotickém dělení. Její výskyt závisí přímo úměrně na věku matky. Stejně jako u Turnerova syndromu existuje i u Klinefelterova syndromu velká řada atypických forem tohoto onemocnění. Z cytogenetického hlediska jde o polyzómii chromozomů X a Y a rozličné druhy mozaik, z kterých je nejčastější typ 46,XY/47,XXY. Se stoupajícím počtem X chromozomů se zhoršuje mentální postižení pacienta. Mozaikové formy tvoří okolo 20 % všech případů Klinefelterova syndromu (Thomson et al. 1991).

#### *1.6.2.2.3 Trizomie chromozomu X (Supefemale syndrom)*

Výskyt trizomie chromozomu X (47,XXX) se odhaduje na 1 případ na 1 000 živě narozených děvčat. Fenotypickým příznakem může být mentální retardace, vyšší vzrůst, popřípadě poruchy fertilizace. Cytogenetickým podkladem je trizomie

chromozomu X (47,XXX), která se může vyskytovat i v mozaice a přítomnost dvou X-chromatinových tělísek. Výskyt trizomie X u plodu se zvyšuje s věkem matky.

#### *1.6.2.2.4. XYY-Syndrom (Supermale syndrom)*

Výskyt XYY-Syndromu (47,XYY) je odhadován na jeden případ na 1 000 živě narozených chlapců. Pacienti jsou obvykle vyšší postavy. Častý je jejich sklon k agresivitě (Sršeň a Sršňová 1995). Cytogenetickým podkladem je gonozomální trizomie 47,XYY s nálezem dvou Y chromozomů. Kromě klasické formy byly zjištěny i různé typy mozaik.

### 1.6.3. Původ nadbytečného chromozomu a mechanizmy vzniku Downova syndromu

Určení rodičovského a meiotického původu nadbytečného chromozomu u pacientů s Downovým syndromem, způsobeným volnou formou trizomie chromozomu 21, napomáhá k pochopení mechanizmů nondisjunkce v meióze a k objasnění vlivu rizikových faktorů. Sleduje se, jaká část dětí dostala nadbytečný chromozom od matky a jaká část od otce a zda k nondisjunkci došlo v prvním nebo druhém meiotickém dělení. Při sledování vlivu rizikových faktorů se využívá skutečnosti, že oogeneze začíná u ženy již v průběhu jejího prenatálního období a první meiotické dělení je přerušeno v pozdní profázi již ve třetím měsíci jejího prenatálního vývoje. První meiotické dělení je dokončeno až v období ovulace a druhé meiotické dělení je iniciováno oplozením. Naproti tomu spermatogeneze probíhá u muže nepřetržitě od puberty až do smrti. Z tohoto důvodu je vliv vnějších faktorů na oogenezi omezen na druhé meiotické dělení, zatímco na spermatogenezi mohou vnější faktory působit v průběhu prvního i druhého meiotického dělení.

Ve starší literatuře se uvádí, že k meiotické nondisjunkci dochází v 75,3 % případů u matky a v 24,3 % případů u otce, u obou pohlaví převážně v prvním meiotickém dělení (Hassold et al. 1979, Mikkelsen et al. 1980).

V současnosti se při molekulárně-genetickém studiu původu nadbytečného chromozomu hojně využívají STR markery (Hassold a Jacobs 1984; Petersen et al. 1991, Antonarakis et al. 1991, 1992, 1993). Novější studie aneuploidních plodů naznačují vztah mezi aneuploidií a změněným rekombinačním podílem v četnosti

otcovských i mateřských chyb (Antonarakis et al. 1992, 1993, Hassold et al. 1991, Koehler et al. 1996, Lamb et al. 1996, 1997, Savage et al. 1998). Byl navržen dvoukrokový systém, který tuto změnu v rekombinačním podílu vysvětluje. V prvním kroku, který je na věku nezávislý, dochází k založení rizikové chiasmatické konfigurace v oocytu v průběhu první meiozy. V druhém kroku dochází k chybnému zpracování takového rizikového bivalentu v první metafázi meiotického dělení. V tomto kroku může dojít k selhání kterékoliv části meiotického aparátu. To by znamenalo, že proces nondisjunkce je stejný u mladých i starších žen, pouze u starších žen k němu dochází častěji, pravděpodobně vlivem věkově závislé degradace proteinů buněčného cyklu či meiotických proteinů, které jsou zodpovědné za udržení koheze sesterských chromatid a za segregaci homologů. Nezanedbatelný vliv má i delší doba působení faktorů vnějšího prostředí a životního stylu (např. kouření) u starších žen.

V poslední době bylo provedeno několik studií, které sledovaly původ nadbytečných chromozomů (Antonarakis et al. 1991, 1992, Petersen et al. 1992, Yoon et al. 1996, Muller et al. 1999). V těchto studiích je uváděn podíl vzniku maternální nondisjunkce v 89-92 % všech případů, z toho v prvním meiotickém dělení přibližně 75 % a v druhém meiotickém dělení přibližně 20 % případů a 5 % případů vzniká mitoticky. Paternální původ trizomie je v těchto studiích uváděn okolo 8-11 %, z toho množství asi 40 % vzniká v první a 60 % v druhé meióze (Antonarakis et al. 1992). Jsou dvě možná vysvětlení této nízké četnosti paternálně způsobených trizomií: 1) chromozom - specifické variace v mechanizmu paternální meiotické nondisjunkce a 2) genomový imprintig, který by ovlivňoval pravděpodobnost přežití trizomických plodů způsobených paternální, či maternální nondisjunkcí.

Bylo zjištěno, že u pacientů s volnou formou trizomie 21 je zvýšený poměr mužů (okolo 1,15). Tento poměr je zvýšen především u paternálně podmíněných trizomií chromozomu 21 (Mikkelsen et al. 1990, Petersen et al. 1993). Příčina tohoto zvýšeného počtu mužů probandů není známa, nicméně studie aneuploidních spermií nesoucích dva chromozomy 21 ukázala, že vysoké procento těchto spermií nese zároveň Y chromozom, což by naznačovalo, že nerozdělený chromozom 21 ve zvýšené míře segreguje s chromozomem Y (Griffin et al. 1996).

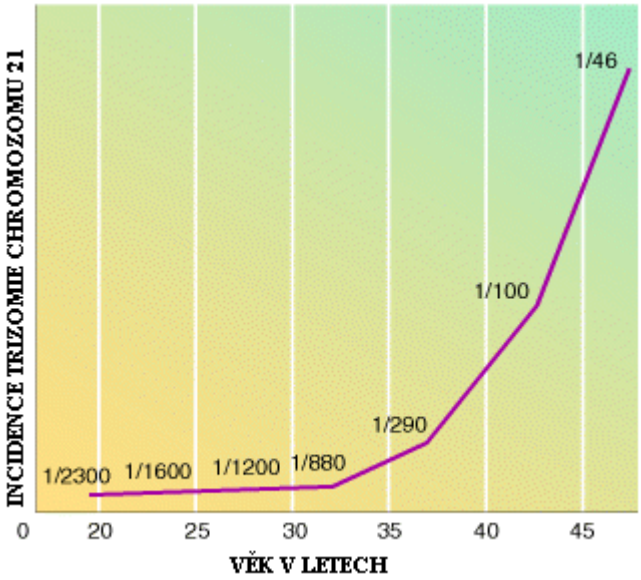
### 1.6.4. Rizikové faktory vzniku aneuploidií

Morfologické mechanismy vzniku numerických a strukturálních aberací chromozomů jsou v dnešní době poměrně dobře známy. Naproti tomu víme poměrně málo o genetických faktorech a vlivech prostředí, které jsou predispozicí k vzniku těchto aberací. Většina prací, které se snažily objasnit příčiny vzniku chromozomálních aberací, se zabývala Downovým syndromem, který je nejčastější chromozomální aberací.

Jak již bylo řečeno, 95 % případů Downova syndromu je způsobena volnou trizomií chromozomu 21. Volná trizomie 21 se vyskytuje hlavně u plodů starších matek a je možné u ní dokázat jednoznačnou přímo úměrnou závislost na věku matky (Penrose 1933, Hassold a Chui 1985). Riziko se exponenciálně zvyšuje u matek po 35. roku věku (viz obr. 3). Matky mezi 20. a 24. rokem věku mají jen velmi malé riziko narození postiženého dítěte (1 : 1400). Naproti tomu riziko u matek po 45. roce věku je 1 : 25 (Cuckle a Wald 1990). Pokud se narodí dítě s Downovým syndromem mladé matce, je riziko rekurence pro dítě z následující gravidity asi 1 %, což je proti běžnému populačnímu riziku pro matky pod 30 let věku riziko podstatně vyšší. (Daniel et al. 1982, Stene a Mikkelsen 1984).

Některé cytogenetické studie dokumentují poměrně vysoké procento (až 4 %) výskytu mozaicismu chromozomu 21 u rodičů, kterým se opakovaně narodilo dítě postižené Downovým syndromem (Harris et al. 1982, Uchida a Freeman 1985). To, že zmíněný rodičovský mozaicismus je významným etiologickým faktorem, dokazuje i několik molekulárně-genetických studií (Pangalos et al. 1992, James et al. 1998, Cozzi et al. 1999, Bruyere et al. 2000). Mozaicismus chromozomu 21 může být v některých případech omezen pouze na zárodečné tkáně (Cozzi et al. 1999).

Také u člověka můžeme předpokládat výskyt genů, které jsou predispozicí vzniku nondisjunkce, protože takové geny jsou známé u jiných organizmů. Některé studie naznačily, že někteří lidé, nebo některé rodiny mají predispozici k tomu, aby se jim narodilo dítě s Downovým syndromem (Alfi et al. 1980, Amiel et al. 2000), jiné práce však tuto hypotézu nepodporují (DeVoto et al. 1985).




**Obr. 3**: Růst závislosti incidence trizomie chromozomu 21 u plodu v závislosti na věku matky v době porodu (v letech).

Nebylo prokázáno, že by se riziko porodu dítěte s aneuploidií zvyšovalo v inbredních populacích, nebo u rodičů, kteří by mohli být s větší pravděpodobností homozygotní pro "gen nondisjunkce" (DeVoto et al. 1985). Také se nezdá, že by měli vyšší riziko porodu dítěte s Downovým syndromem příbuzné matek postižených dětí (s výjimkou případů translokačních forem).

Vyšší věk matky je nejzávažnějším faktorem etiologie Downova syndromu. V menší míře toto platí i pro ostatní trizomie.

Za možnou příčinu nondisjunkce se považuje také radioaktivní záření. Uchidová et al. (1977) zveřejnila experimentální údaje a vypracovala přehled epidemiologických studií o vztahu mezi ozářením matky, jejím vyšším věkem a nondisjunkcí. Ve svých pokusech srovnávala frekvenci vzniku trizomie v metafázi druhého meiotického dělení v ozářených a neozářených oocytech stejně starých myší a zjistila až čtyřnásobně vyšší výskyt u ozářených myší v porovnání s kontrolní populací. Do konce osmdesátých let následovalo ještě dalších 11 epidemiologických studií, které sledovaly radiační anamnézu matek pacientů s Downovým syndromem (převzato z Thompson a Thompsonová 1988). V devíti z těchto studií byla zjištěna zvýšená expozice u matek dětí s Downovým syndromem, ale tento rozdíl byl statisticky významný pouze ve čtyřech souborech. Na základě těchto výsledků není možné konstatovat, že záření (jako příčina nondisjunkce) zvyšuje výskyt trizomie 21, je však jasné, že je vhodné vyvarovat se zbytečných dávek radioaktivního záření.

Po roce 1986, kdy došlo k výbuchu jaderné elektrárny v Čemobylu, bylo publikováno především v západní a střední Evropě velké množství populačních studií, které se zabývaly vlivem radiačního záření na zdravotní stav takto exponované populace. Byla sledována jak zvýšená incidence nádorových onemocnění, zvýšení potratovosti, zvýšení incidence různých malformací u plodů, tak právě incidence Downova syndromu.

Sperling et al. (1991, 1994) publikoval populační studii incidence Downova syndromu v západním Berlíně, kdy srovnával incidence v letech 1980 - 1988 a zjistil významný nárůst incidence v lednu 1987, tedy přesně 9 měsíců po výbuchu Černobylské elektrárny. V tomto období se na území západního Berlína narodilo 12 takto postižených dětí místo očekávaných 2 až 3. Po vyloučení ostatních faktorů, které by mohly ovlivnit zvýšení běžné incidence, jako je například vyšší věkový průměr postižených matek, životní styl a jiné rizikové faktory, zůstal vliv expozice ionizujícímu záření v období koncepce jedním z možných působících faktorů. V šesti ze sedmi případů, u kterých bylo možné provést molekulární cytogenetické vyšetření, byl potvrzen maternální původ nadbytečného chromozomu a zároveň vznik nondisjunkce v druhém meiotickém dělení.

Uvádí však také, že tyto výsledky nejsou v souladu s celonárodní studií, která byla sestavena ze všech výsledků prenatálních vyšetření získaných v letech 1986 - 1987 a v níž nebyl pozorován žádný významný nárůst incidence v celonárodním měřítku. Mírný nárůst incidence Downova syndromu byl pozorován v severních oblastech Německa a v Bavorsku (Irl et al. 1995), kde došlo dle autorů k těžší kontaminaci ovzduší, než na jiných územích Evropy. Naproti tomu Burkart et al. (1997) se domnívá, že radiační záření pocházející z Černobylské elektrárny nemělo na Německou populaci vliv, protože kumulativní dávka byla zanedbatelná ve srovnání s ostatními faktory prostředí. Ramsay et al. (1991) publikoval podobnou studii, která se zabývá incidencí Downova syndromu v letech 1978 - 1989 ve Skotsku a také pozoroval signifikantní nárůst v roce 1987, a to především u matek starších 35 let. Tato studie však byla o pět let později rozšířena o nově získaná data a znovu analyzována (Huether et al. 1996). Výsledky této rozšířené studie se spíše přiklánějí k dlouhodobému trendu nárůstu incidence Downova syndromu v populaci.

Naproti tomu ve Finsku (Harjulehto et al. 1991), Švédsku (Moberg a Reizenstein 1993), Norsku (Lie 1992), Francii (Stoll et al. 1990), Maďarsku (Czeizel et al. 1991) či Chorvatsku (Ligutic et al. 1989) nepozorovali po roce 1986 žádné odchylky od běžné

incidence pozorované v letech před černobylským incidentem. Tyto závěry podporuje i jedna z nejnovějších komplexních celoevropských studií (Dolk a Nichols 1999).

K podobným závěrům došla i studie celkem 124 nukleárních rodin dětí postižených Downovým syndromem narozeným po roce 1987 z Ruska, Ukrainy a Berlína, na které autorka participovala. Výsledky byly publikovány v Machatková et al. 2005 (P3).

V posledních letech byl v některých západoevropských zemích pozorován nárůst incidence Downova syndromu (Huether 1996, Rosch et al. 2000). Tento trend však pravděpodobně souvisí s trendem zvyšování věku rodiček a s jinými negativně působícími faktory prostředí.

Z dalších rizikových faktorů, které, jak se zdá, ovlivňují vznik Downova syndromu, je nosičství rizikových variant některých genů. Byla například publikována zvýšená frekvence alely ε4 apolipoproteinu E (APOE) u matek s chybou v druhé meióze (Avramopoulos et al. 1996), či intronovým polymorfizmem v genu pro presenilin-l (Petersen et al. 2000), či zvýšené procento C677T mutace v genu pro metylentetrahydrofolátreduktázu (James et al. 1999)

V patogenezi nondisjunkce mohou hrát úlohu i autoimunitní onemocnění. Byla např. pozorována zvýšená hladina antityreoidních protilátek v séru matek dětí s Downovým syndromem (Fialkow et al. 1965).

### 1.6.5. Diagnostika aneuploidií

Prenatální diagnostika chromozomálních aneuploidií bývá ve většině případů prováděna klasickou cytogenetickou analýzou kultivovaných buněk získaných z plodové vody nebo choriových klků. Tento postup vyžaduje dlouhodobou kultivaci fetálních buněk a výsledek vyšetření je ve většině případů k dispozici až 12 - 15 dnů po odběru biologického materiálu. Cytogenetická analýza umožňuje detekci všech chromozomálních aberací, její hlavní nevýhodou je časová náročnost vyšetření. Interval mezi odběrem vzorku a vydáním výsledku zvyšuje anxiozitu budoucích rodičů, hlavně v případech, kdy neinvazivní screeningové testy (biochemické testy a/nebo ultrazvukové vyšetření plodu) provedené během prvního a druhého trimestru těhotenství naznačují zvýšené riziko chromozomální aberace (Marteau *et al.* 1992).

Cytogenetická analýza je rutinně používána v prenatální diagnostice od sedmdesátých let, od té doby však prodělala pouze dílčí změny; vylepšení kultivačních médií umožnilo pouze zkrátit inerval nutný pro dokončení vyšetření (Chang *et al.*, 1982, 1985). Většina patologických nálezů identifikovaných v prenatálních vzorcích zahrnují trizomie chromozomů 13, 18 a 21 a aneuploidie pohlavních chromozomů X a Y. (Crandall *et al*. 1980; Ferguson-Smith *et al*. 1984). Včasná identifikace těchto chromozomálních aberací je velmi významná pro klinický management patologických těhotenství. V minulých letech bylo proto zavedeno mnoho nových metod molekulární cytogenetiky, které umožňují jejich identifikaci do 24-48 hodin po odběru vzorku.

Jeden z přístupů je fluorescenční hybridizace in situ (FISH), která je používána od devadesátých let minulého století. Metoda je založena na použití chromozomově specifických kopií sekvencí genomové DNA (sond), které jsou přímo či nepřímo fluorescenčně značeny a poté aplikovány na buňky nacházející se v interfázi buněčného cyklu. Metoda FISH je v některých laboratořích stále hojně používána; její výsledky byly ověřeny a publikovány na velkém počtu klinických vzorků (Klinger *et al*. 1992, Bryndorf *et al*. 1997, Eiben *et al*. 1998). Metoda má však přes svou vysokou efektivitu i nevýhody, hlavními z nich jsou vysoká časová a finanční náročnost vyšetření. To ji předurčuje k vyšetření pouze omezeného počtu vybraných, vysoce rizikových těhotenství (Evans *et al*. 1999, Pergament *et al*. 2000, Tepperberg *et al*. 2001).

Další metodou, která je v rychlé diagnostice nejčastějších aneuploidií využívána je i tzv. „multiplex ligation-dependent probe amplification“ (MLPA). Metoda je v porovnání s FISH levnější a časově méně náročná, což ji zvýhodňuje pro použití v rutinních diagnostických laboratořích. I přes nesporné výhody této technologie, které umožňují spolehlivou detekci rozličných typů mutací, ať již duplikací i delecí, pro diagnostiku nejčastějších aneuploidií se neukázala tato metoda být příliš vhodná a to hlavně z důvodu neschopnosti odlišit triploidní vzorek mužského pohlaví od kontaminace normálního diploidního mužského vzorku biologickým materiálem matky a rovněž neschopností diagnostikovat triploidní vzorek ženského pohlaví (Gerdes *et al*. 2005). Další nevýhodou je poměrná náročnost metody na vstupní množství DNA (vyžaduje 20-100 ng na 1 MLPA reakci, což odpovídá izolaci z 4-5 ml plodové vody (PV) (Gerdes et al. 2005) v porovnání s 1 ml v případě QF-PCR). Tato metoda detekce

nejčastějších aneuploidií z PV je používána převážně v Holandsku, hlavně z důvodu dostupnosti lokálně vyráběného komerčního kitu (MRC-Holland).

Další metodou molekulární cytogenetiky, kterou je možné použít k rychlé diagnostice aneuploidií je komparativní genomová hybridizace (comparative genomic hybridisation – CGH). Je to velice citlivá a perspektivní metoda, umožňující zjišťovat nebalancované chromozomální přestavby v celém genomu (Copy Number Variants). V současnosti je převážně využívána k detekci mikrodelečních / mikroduplikačních syndromů u pacientů s mentální retardací a jinými odchylkami vývoje (autismus) a rovněž k detekci chromozomálních přestaveb v nádorových buňkách (Shinawi *el al*. 2008). V nedávné době byly publikovány i práce, kdy se CGH podařilo využít k detekci aneuploidií z jediné buňky při preimplantační genetické diagnostice (Fiegler *et al*. 2007). Nevýhodou metody, která pravděpodobně neumožní její rutinní využití v prenatální diagnostice aneuploidií je její finanční náročnost.

Dalšími zaváděnými metodami jsou například metody DOP - PCR (degenerate oligonucleotide primer PCR)(Müller-Navia et al. 1995), PRINS (Oligonucleotide primed in situ DNA synthesis)(Gosden et al. 1991, Pellestor et al. 1996, Phillips et al. 1997), SKY (spectral karyotyping)(Schröck et al. 1996) či M-FISH (multicolor FISH). Tyto metody, i přes některé své nesporné výhody však zatím nejsou, mimo jiné i z důvodu své finanční náročnosti, v prenatální diagnostice plošně využívány.

Velice rychlou alternativní metodou molekulární cytogenetiky je metoda QF-PCR. Vyšetření je možné provést do jednoho dne po odběru biologického materiálu a patří k nejperspektivnějším metodám prenatální cytogenetické diagnostiky (Ferguson-Smith 1997).

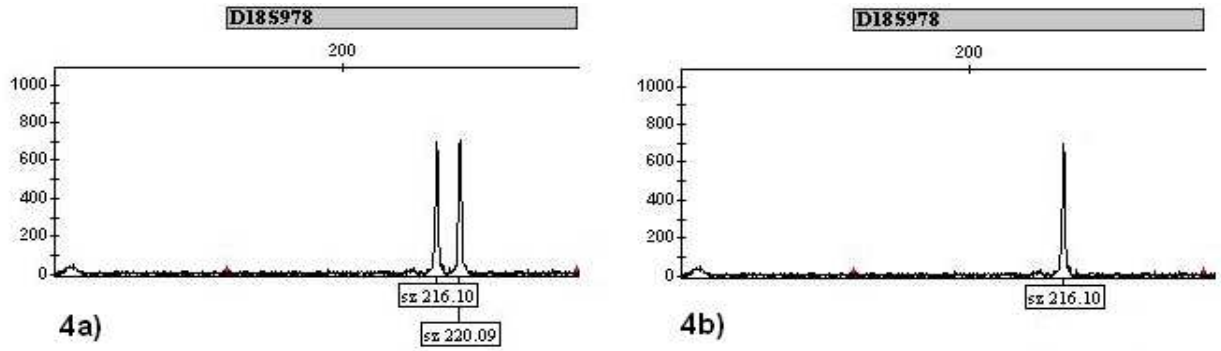
### 1.6.5.1. Kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce (QF-PCR)

QF-PCR je molekulárně genetická metoda, která umožňuje rychlou diagnostiku nejčastějších aneuploidií. Principem metody je PCR amplifikace vybraných STR lokusů; tyto lokusy jsou vysoce polymorfní, v průběhu života jedince velmi stabilní a mohou po PCR amplifikaci sloužit jako markery pro detekci vybraných chromozomálních

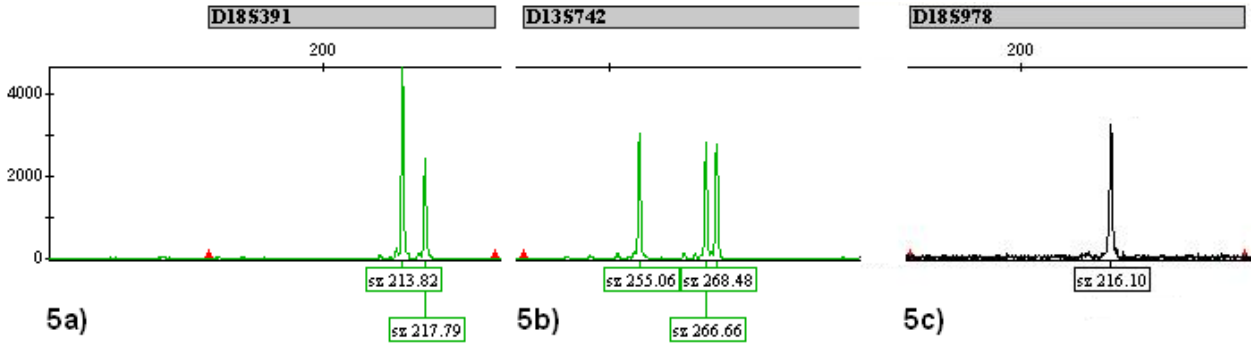
aneuploidií (Adinolfi *et al*. 1997, Mansfield 1993, Sherlock *et al*. 1998, Tóth *et al*. 1998, Pertl *et al*. 1994, 1996, 1997, 1999a, 1999b, Cirigliano *et al*. 2001, 2004, 2006). Tato metoda umožňuje nejen detekci aneuploidií, ale zároveň umožňuje velmi přesně určit parentální původ nadbytečného chromozomu a lokalizovat vznik nondisjunkce do prvního či druhého meiotického dělení, což bylo donedávna možné jen pomocí radioaktivních metod (Antonarakis et al. 1992, Sherman et ai. 1994).

PCR amplifikace vybraných STR lokusů je prováděna pomocí dvojic specifických primerů, z nichž vždy jeden je fluorescenčně značen. Dostaneme fluorescenčně označené fragmenty DNA, jejichž délka závisí na počtu STR opakování v daném lokusu a jejichž množství je závislé na množství templátové DNA, která byla vnesena do PCR reakce. Vzhledem k tomu, že tyto lokusy jsou specifické pro jednotlivé chromozomy, můžeme určit, v kolika kopiích se testovaný chromozom (na kterém leží testovaný STR lokus) v buňce nachází. Vzhledem k tomu, že v normální diploidní buňce se nacházejí dvě kopie každého chromozomu, mohou nastat dvě situace: buď se na každé alele nachází jiný počet opakování STR motivu - pak jsou detekovány dva hroty, jejichž a plocha je přibližně v poměru 1 : 1 ( daný jedinec je pro tento lokus heterozygotní), nebo je na obou alelách počet opakování STR motivu shodný - pak je detekován jen jeden hrot a jedinec je v daném markeru homozygotní (viz. obr. 4).

U trizomických buněk je situace obdobná - buď se nachází na každém ze tří kopií testovaného chromozomu rozdílný počet opakování STR motivu - pak jsou detekovány tři hroty, jejichž výška a plocha je přibližně v poměru 1 : 1 : 1 (trialelická forma trizomie), nebo se na dvou z tří kopií nachází shodný a na jedné odlišný počet opakování STR motivu - pak jsou detekovány dva hroty, jejichž výška a plocha je přibližně v poměru 1:2 (dialelická forma trizomie), nebo se shodný počet opakování STR motivu nachází na všech třech alelách - pak je detekován jeden hrot a daný marker hodnotíme jako neinformativní (monoalelická forma trizomie)(viz. obr. 5).




**Obr. 4:** Možné výsledky vyšetření u normálních (dizomických) vzorků: 2 hroty v poměru 1:1 (4a) a neinformativní výsledek (4b)




**Obr. 5:** Možné výsledky vyšetření u trizomického vzorku u třech nezávislislých markerů na kapilární elektroforéze: dva informativní markery s poměrem hrotů 2:1 (5a), 1:1:1 (5b) a neinformativní marker s jedním hrotem.

Detekce tří hrotů v poměru přibližně 1:1:1, stejně tak jako detekce dvou hrotů v poměru 2:1 jednoznačně potvrzují diagnózu trizomie. Pokud se poměry liší od ideálně uvedených, je nutné dbát zvýšené pozornosti hlavně v případě, že byla dialelická forma trizomie zjištěna u všech informativních markerů. Kritéria rozptylu, který je považován za průkazný v případě dialelické formy trizomie se u jednotlivých autorů liší (Adinolfi *et al*. 1995, Mann *et al*. 2004, Pertl *et al*. 1996, Sherlock *et al*. 1998).

Obdobně je tomu i u pohlavních chromozomů, kdy vyšetření metodou QF-PCR umožňuje zjistit počet, druh a původ pohlavních chromozomů přítomných v buňce. Některé z STR specifických lokusů, používaných při detekci pohlavních chromozomů, jsou umístěny v pseudoautozomálních oblastech (X22, DXYS218), některé jsou

chromozomálně-specifické (XHPRT, DXS1187). Vedle těchto markerů se využívají k diagnostice pohlavních chromozomů i nepolymorfní markery, jako je například amelogeninový marker (AMX/Y). Při jeho použití se využívá skutečnosti, že na chromozomu X i Y se nachází evolučně konzervovaný gen pro amelogenin. Na chromozomu Y se však vyskytuje ve formě pseudogenu s mnoha delecemi. Stačí proto použít jeden pár primerů v okolí delece pro detekci obou chromozomů, které bude po amplifikaci možné rozlišit podle specifické délky produktů této amplifikace (Sullivan *et al*. 1993).

Při použití vhodných markerů by mělo pouze omezené množství analyzovaných vzorků vykazovat nedostatečnou informativitu (Pertl *et al.* 1994; 1996; 1997; 1999a,b; Adinolfi *et al.* 1995, 1997; Sherlock et.al. 1998; Verma et al.1998; Cirigliano et al.1999, 2001; Adinolfi et al., 2001). Mezinárodně uznávanými kritérii jsou za dostatečně informativní považovány takové výsledky, které jsou založeny na informativním výsledeku minimálně dvou STR markerů na každém testovaném chromozomu (Mann *et al*. 2004).

Do současné doby bylo nalezeno velké množství polymorfních STR markerů. Pravděpodobnost informativního výsledku je dána výší heterozygozity konkrétního markeru. Heterozygozita ( a tudíž informativita) se stejně jako frekvence jednotlivých alel v jednotlivých studovaných populacích liší (Sacchetti et al. 1999).

Výběr STR markerů pro analýzu je proto velice důležitý. Pokud je selekce použitých markerů založena na skutečných heterozygozitách v analyzované populaci, umožní tento přístup minimalizovat riziko nedostatečně informativního výsledku.

Metoda QF-PCR využívá převážně tetranukleotidové STR markery, které jsou stabilní při amplifikaci metodou PCR. Při jejich amplifikaci nedochází k tak časté tvorbě "stutterů" vlivem sklouzávání DNA polymerázy ani k tak výrazné preferenční amplifikaci kratších alel jako je tomu u dříve hojně používaných dinukleotidových markerů (Utah Marker Development Group, 1995).

Výhody použití QF-PCR jako doplňujícího vyšetření ke klasickému cytogenetickému vyšetření dokumentuje mnoho publikací (Adinolfi et al. 1995, Pertl et al- 1996, 1997, 1998, 1999a, Findlay et al. 1998, Valero el al. 1999, Schmidt et al. 2000, Putzova *et al*. 2008).

Kvantitativní PCR je založena na teoretickém předpokladu, že množství amplifikovaného produktu se v každém cyklu dvakrát zvyšuje. V praxi nemusí reakce

probíhat vždy 100% efektivně v důsledku přítomnosti nejrůznějších inhibitorů PCR a nižší polymerační efektivitě v pozdějších cyklech polymerázové reakce. Dalším jevem, který negativně ovlivňuje kvantifikaci, je tak zvaný "plateau" efekt, ke kterému dochází přibližně mezi 25 - 30. cyklem PCR reakce. Nastává v okamžiku, kdy dojde k vyčerpání některých reakčních komponent. Nárůst množství specifického produktu poté přestane probíhat exponenciálně. Měření koncentrace specifického produktu v reálném čase umožňuje pouze metoda RQ-PCR (Real Quantitative-PCR). Principem metody je kontinuální měření koncentrace produktu po každém PCR cyklu, což umožňuje určit množství DNA vstupující do reakce v širokém rozpětí koncentrací (Walker et al. 1996, Wittwer et al. 1997).

K vizulizaci fluorescenčně značených fragmentů DNA po PCR amplifikaci se v drtivé většině laboratoří provádějících QF-PCR analýzu používá tzv. **kapilární elektroforéza (CE).** Systém umožnuje automatickou fluorescenční detekci, kdy separace, detekce a analýza DNA fragmentů probíhá současně. Detekce zde probíhá během elektroforézy, fluorescenčně označené fragmenty zaznamená v průběhu průchodu laser. Fragmenty procházejí gelem, který je umístěn do velmi úzké kapiláry (vnitřní průměr 50 - 75 μm). Za pomoci tepla a vysokého napětí dochází k rychlé separaci fragmentů DNA. Při CE může být detekce DNA fragmentů plně automatizovaná. V roce 1995 byl představen první Genový Analyzátor ABI Prism® 310 (Applera, USA), plně automatický přístroj, který umí separovat, detekovat a analyzovat fragmenty DNA s velkou efektivitou. Dnes je novější verze tohoto přístroje rutinně používána v mnoha DNA laboratořích světa (Reeder, 2000). Přístroj rozliší fluorescenčně označené fragmenty (rozeznává až pět různých fluorescenčních značek) s přesností na 1 bázi. Genové Analyzátory ABI Prism® 3100 a 3130 byl použit i v této práci.

QF-PCR také umožňuje neinvazivní vyšetření aneuploidie plodu z buněk získaných odběrem z děložního hrdla (TCC) (Adinolfi et a1. 1995, Tutschek et al. 1995, Adinolfi a Cigriliano 2000, Adinolfi a Scherlock 2001), popřípadě z fetálních buněk či fetální DNA nacházející se v krvi matky (Pertl et al. 1999b, 2000, Samura et al. 2000). Kruciální pro validní výsledek je však metoda separace fetálních buněk od majoritní populace buněk maternálního původu v biologickém vzorku před samotnou PCR analýzou.

Nevýhody vyšetření metodou QF-PCR jsou spíše technického rázu. Jednou z nevýhod je, že metoda není komplexním vyšetřením celého karyotypu, ale testuje

pouze vybrané lokusy na vybraných chromozomech. Testovat více lokusů na různých chromozomech je možné, metodu využíváme například k analýze tkání potracených plodů, kdy kromě již zmíněných aneuploidií testujeme i chromozomy 2, 7, 15, 16 a 22. Tyto testy lze využít i v případech, kdy jsou na základě sonografického vyšetření detekovány těžké VVV v prvním trimestru těhotenství, které nasvědčují aneuploidii některého ze zmíněných chromozomů.

Ve většině případů jsou však testovány pouze chromozomy 13, 18, 21, X a Y. Metoda je vhodná především pro detekci volných (kompletních) aneuploidií chromozomů, ale není příliš vhodná pro detekci jemnějších chromozomálních přestaveb. Za druhou hlavní nevýhodu byla dlouho považována neschopnost této metodoy spolehlivě detekovat mozaikové formy trizomií. V roce 2001 se však objevila práce (Mann et al. 2001), která dokládá možnost detekce mozaikové formy trizomie, vzniklé nondisjunkcí v prvním meiotickém dělení, pokud se nachází minimálně v 30 % buněk. Nondisjunkci v mitóze, ke které by došlo v průběhu vývoje normálního dizomického plodu a která by vedla k podobnému procentuánímu zastoupení trizomických buněk, by však bylo velmi obtížné zjistit. Při hodnocení suspektních mozaikových forem trizomie je vždy nutné mít na paměti, že kontaminace materiálu plodu materiálem matky při invazivním odběru by poskytla při vyšetření jednoho chromozomu obdobný obraz vyšetření.

#### *1.6.5.1.1 Metody detekce fluorescence*

Fluorescence je proces, při kterém molekula fluoroforu nejprve adsorbuje energii fotonu z vnějšího zdroje (žárovka nebo laser) za vzniku excitovaného elektronového singletového stavu. Tento stav existuje poměrně krátkou dobu (obvykle 1-10x$10^{-9}$ sekundy), během níž dojde k určité malé ztrátě energie (konformační změny, interakce s molekulárním prostředím). Poté dojde k emisi světla a fluorochrom se vrací do základního stavu. V důsledku ztrát energie je energie fotonu nižší a má proto delší vlnovou délku než excitační foton (rozdíl v energiích nebo vlnových délkách $hv_{EX}$ - $hv_{EM}$ se nazývá Stokesův posuv). Tento rozdíl ve vlnových délkách je základem pro citlivost fluorescenčních technik, neboť umožňuje rozlišit emisní a excitační fotony .

Fluorescenční detekční systém tedy obsahuje tyto prvky:
1. zdroj excitace

2. fluorofor

3. filtry s vlnovými délkami vhodnými pro izolaci emisních fotonů od excitačních

4. detektor, který registruje emisní fotony a produkuje záznamový výstup, obvykle elektrický signál nebo fotografii

Bez ohledu na způsob použití je pro optimalizaci fluorescenční detekce nutná kompatibilita těchto čtyř prvků.

Mezi hlavní typy fluorescenčních detekčních přístrojů patří kromě kapilární elektroforézy (CE), kde je využito CCD kamery (typ videokamery) k zaznamenání průchodu molekul určitou oblastí gelu i např. spektrofluorometry, fluorescenční mikroskopy, průtokové cytometry, "fluoroimagery" apod.

**Vícebarevné fluorescenční značení primerů** umožňuje současně namnožit a analyzovat i lokusy s velikostně se překrývajícími alelami. Pokud je v jedné reakci použito dva a více fluorescenčně značených primerů značených různými fluorescenčními značkami, je izolace signálu a analýza dat závislá na dokonalé spektrální separaci mnohačetných emisí. Pro vícebarevné aplikace jsou vhodné fluorofory s úzkým rozmezím spekter. Ideální kombinace barviv pro vícečetné značení by měla mít silnou absorpci ve společné excitační vlnové délce a dobře separovaná emisní spektra.

# 2. Cíle práce

Cílem předkládané disertační práce bylo zkvalitnit, rozšířit a standardizovat diagnostiku aneuploidií chromozomů 13, 18, 21, X a Y metodou QF-PCR a její aplikace v klinické praxi. Pro standardizaci metody bylo nutné především zavedení nových STR markerů s vysokou heterozygozitou (a tudíž informativitou).

**Pracovní hypotézy:**

(1) Ověření senzitivity a specificity QF-PCR vyšetření aneuploidií chromozomů 13, 18, 21, X a Y na velkém množství klinických vzorků.

(2) Ověření možnosti analýzy pouze trizomie chromozomu 21 v případech indikovaných výhradně na základě pozitivního biochemického screeningu v druhém trimestru těhotenství (ověření senzitivity, specificity a kalkulace reziduálního rizika dalších chromozomálních aberací).

(3) Kalkulace reziduálního rizika jiné chromozomální aberace ve vyšetřovaném souboru klinických vzorků.

(3) Do jaké míry by ovlivnilo informativitu vyšetření, pokud by se podařilo sestavit diagnostický set z STR markerů vybraných na základě skutečně zjištěných heterozygozit v české populaci.

# 3. Materiál a metodika

## *3.1. Biologický materiál*

Soubor zpracovaný v rámci prenatálního a postnatálního vyšetření tvořilo více než 7 200 vzorků. Všechny vzorky, indikované k vyšetření metodou QF-PCR byly indikovány současně na klasické cytogenetické vyšetření karyotypu (duální testování). Výsledky vyšetření metodou QF-PCR byly nicméně uzavřeny bez znalosti výsledků cytogenetického vyšetření.

## *3.2. Metodika*

V období od listopadu 2002 do února 2007 bylo k vyšetření nejčastějších aneuploidií metodou QF-PCR indikováno celkem 6349 vzorků – soubor sestával z 142 vzorků choriových klků a 6207 vzorků plodové vody. Vyšetření bylo ve všech případech provedeno jako rychlé doplňkové vyšetření vybraných nejčastějších aneuploidií za současné cytogenetické analýzy celého karyotypu. U 2764 vzorků (44.5%) byla provedena analýza chromozomů 13, 18, 21, X a Y. Indikační kritéria tohoto vyšetření byla následující:

(1) pozitivní ultrasonografický nález

(2) riziko trizomie chromozomu 18 zjištěné na základě biochemických testů

(3) pozdní záchyt suspektně patologického těhotenství

(4) anxiozita matky

V 3443 případech bylo provedeno pouze vyšetření chromozomu 21 (55.5%). Test byl indikován na základě rizika trizomie chromozomu 21 vyššího než 1:250 stanoveného výhradně biochemickými testy v druhém trimestru těhotenství s negativním ultrasonografickým nálezem.

### *3.3. Vlastní pracovní postup*

Izolace DNA z nativní plodové vody i choriových klků byla prováděna komerčně dodávaných kitem Qiagen (Qiagen, USA) za použití standardních izolačních protokolů s modifikacemi pracovního postupu (popsáno v Putzova *et al.* 2008 (P1)). Pokud byla k analýze dodána krev (fetální krev popř. periferní krev matky pro srovnávací analýzu) DNA izolována pomocí kitu Qiagen (Qiagen, USA) nebo za použití izolačního přístroje MagNA Pure Compact (Roche, Switzerland).

Od roku 2002 došlo několikrát ke změně kompozice vyšetřovacích markerů pro vyšetření aneuploidií chromozomů 13, 18, 21, X a Y za účelem zvýšení efektivity vyšetření. V letech 2002 až 2004 byly používány markery popsané v publikaci Pertlové et al. 1997. Markery X22, P39 a amelogeninový marker (X-106 bp/Y-112bp) byly doplněny na počátku roku 2003 pro přesnější stanovení aneuploidií pohlavních chromozomů (Cirigliano et al. 1999). Od roku 2004 byly k vyšetření používány dva multiplexní sety: multiplex popsaný Mann et al. 2004 obsahující 13 markerů specifických pro chromozomy 13, 18 a 21 a set k vyšetření aneuploidií pohlavních chromozomů popsaný Donaghue et al. 2003. Složení obou multiplexních setů viz. Tabulka 1.

**Tabulka 1**: STR markery používané k vyšetření aneuploidií chromozomů 13, 18, 21, X a Y v letech 2004-2007.

| ***Test chromozomů 13, 18, 21, X a Y*** | | | | ***Test k vyšetření trizomie chromozomu 21*** | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Multiplex 1*** | | **Multiplex 2*** | | | |
| **Marker** | **Lokalizace** | **Marker** | **Lokalizace** | **Marker** | **Lokalizace** |
| D13S305 | 13q13.3 | DXS981 | Xq13.1 | D21S1432 | 21q21.1 |
| D13S628 | 13q31.1 | DXS1187 | Xq26.2 | D21S1446 | 21q22.3 |
| D13S634 | 13q21.33 | XHPRT | Xq26.1 | D21S11 | 21q21.1 |
| D13S742 | 13q12.12 | P39 | Xq28 | D21S1411 | 21q22.3 |
| D18S978 | 18q12.3 | DXS996 | Xp22.3 | AMEL | Xp22.22/ Yp11.2 |
| D18S386 | 18q22.1 | DXS1283E | Xp22.3 | | |
| D18S499 | 18q21.32 | X22 | Xq28/ Yq12 | | |
| D18S391 | 18p11.31 | AMEL | Xp22.22/ Yp11.2 | | |
| D18S535 | 18q12.3 | SRY | Yp11.2 | | |
| D21S11 | 21q21.1 | DYS448 | Yq11.2 | | |
| D21S1270 | 21q22.11 | | | | |
| D21S1411 | 21q22.3 | | | | |
| D21S1435 | 21q21.3 | | | | |

* Markery použité v multiplexech 1 a 2 byly popsány v dříve publikovaných pracech (Donaghue et al. 2003 a Mann et al. 2004)

Změny do roku 2007 byly popsány v Putzová et al. 2008. (P1) Od února 2007 je

aplikován nově sestavený diagnostický set markerů. Postup sestavení setu a výsledky jeho aplikace popsány v Putzova et al. in press (P2).

Při sestavování nového diagnostického setu STR markerů jsem využívala internetové databáze, především Human Genom Database (http://www.gdb.org, zrušena 2008). Všímala jsem si následujících parametrů:

- zjištěný stupeň heterozygozity v populaci, pokud jsme s STR lokusem neměli předchozí zkušenosti, využívali jsme údaj o heterozygozitě uvedený v dostupných databázích (GDB, UCSC, případně Marschfield)
- vzdálenost mezi nejfrekventovanějšími alelami
- vzdálenost mezi nejvzdálenějšími alelami
- distribuce alel
- rozmezí velikostí fragmentů po amplifikaci PCR
- zjištěná frekvence mikroduplikací u STR markeru

STR markery byly vybrány (1) na základě skutečně zjištěných heterozygozit v naší populaci (2) na základě jejich umístění na testovaných chromozomech (3) preferovány byly STR markery s nízkou frekvencí zjištěných mikroduplikací v naší populaci. U nově zaváděných STR markerů byly preferenčně vybírány markery s vysokou uváděnou heterozygozitou, ale malým počtem repetic (tedy malou vzdáleností mezi nejkratší a nejdelší detekovanou alelou) a to z důvodu ztíženého hodnocení markerů s velkou vzdáleností mezi detekovanými alelami (≥ 25 bp) v důsledku preferenční amplifikace.

Sekvence všech použitých primerů byly navrženy pomocí databází volně přístupných na internetu (např. http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway, http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi, http://ngrl.man.ac.uk/SNPCheck/SNPCheck.html, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome, http://research.marshfieldclinic.org/genetics/GeneticResearch/compMaps.asp).

Soubor STR markerů k vyšetření trizomie chromozomu 21 v letech 2002 až 2007 sestával z markerů D21S1432, D21S1446, D21S11, D21S1411 a AMX/Y (Putzová et

al. 2008 (P1)). V roce 2007 byl tento set rovněž modifikován, byly doplněny markery D21S1435, D21S1437 a D21S1412 a z analýzy byl vypuštěn marker D21S1446.

Chemikálie používané při kapilární elektroforéze (CE) jsou výhradně od firmy Applera (USA). CE byla prováděna na Genovém Analyzátoru ABI Prism® 3100 a 3130 (Applera, USA) na pracovišti Centra Prenatální Diagnostiky GENNET. Fragmenty DNA jsou do CE nasávány elektrokineticky (působením vysokého napětí dochází k natahování elektricky nabitých molekul), případné ionty by tedy zabraňovaly vstupu záporně nabitých molekul DNA do kapiláry.

Při analýze byla použita 36 cm dlouhá kapilára o průměru 50 μm a optimalizovaný polyakrylamidový polymer POP 7$^{TM}$ (Applera, USA). Analýza probíhala při konstantně nastaveném napětí 15 kV a konstantní teplotě bloku 60℃. Čas nasávání vzorku do kapiláry byl měněn dle potřeby v rozmezí 5 - 10 sec. Při analýze byl použit filtr G pro analýzu emisních spekter.

# 4. Výsledky

V letech 2002 až 2007 byly vzorky testovány pomocí dříve publikovaných setů STR markerů (Donaghue *et al.* 2003, Mann *et al.* 2004, Pertl *et al.* 1997) a setu k detekci trizomie 21 na souboru 6 349 klinických vzorků. Výsledky aplikace těchto multiplexních setů STR markerů jsme publikovali v Putzová *et al*. 2008 (P1). Všechny vzorky v tomto souboru byly duálně testovány.

Soubor byl rozdělen na základě indikace k vyšetření do dvou kategorií:

1) vzorky testované na CHAs 13, 18, 21, X a Y obsahoval 2 906 vzorků (všechny CVS (142) a 2764 PV) s následujícími indikačními kritérii: 1) pozitivní UTZ, 2) zvýšené riziko trizomie chr. 18 zjištěné na základě biochemického testu, 3) pokročilý TT při vyžádání vyšetření, 4) anxiozita matky

2) vzorky testované na pouze markery specifickými pro chromozom 21 – celkem 3443 PV. Jediným indikačním kriteriem byl pozitivní výsledek biochemického screeningu (≥1:250) s negativním UTZ nálezem.

Všechny pozitivně testované vzorky (celkem 242) byly rozděleny do čtyř kategorií: 1) chromozomální aberace diagnostikovatelné RAD, 2) nebalancované chromozomální aberace (CHA) a trizomie autozomů nediagnostikovatelné RAD, 3) CHAs s nejasnou prognózou (balancované *de novo*, mozaikové formy a marker chromozomy), 4) ostatní CHAs, pravděpodobně bez klinického významu v probíhající graviditě (familiární balancované přestavby a polymorfismy). Abnormální nálezy a frekvence jejich nálezu v našem souboru je shrnuta v tabulce 2.

**Tabulka 2:** Abnormální cytogenetické nálezy duálně testovaných vzorků (n=6349) a frekvence jejich výskytu v testovaném souboru

| Cytogenetická kategorie | Počet | Část (%) | Frekvence nálezu (1 pozitivní nález na počet testovaných vzorků) |
|---|---|---|---|
| **CHA diagnostikovatelné QF-PCR** | **175** | **72.3** | **1 : 36** |
| **Všechny CHA nediagnostikovatelné RAD** | **67** | **27.7** | **1 : 90** |
| Nebalancované | 10 | 4.1 | 1 : 600 |
| Nejistá prognóza | 12 | 5.0 | 1 : 500 |
| Bez klinického významu v probíhající graviditě | 45 | 18.6 | 1 : 140 |
| **CELKEM** | **242** | **100** | |

V kategorii těhotenství s nejistou prognózou bylo 5/12 (42%) ukončeno s ohledem na přání pacientek: ve čtyřech případech byl cytogenetický nález podpořen pozitivním UTZ nálezem, v jednom případě bylo těhotenství ukončeno na základě anxiozity těhotné (mozaická forma 46, XY, der (4), negativní UTZ nález). Ostatní pacientky v této kategorii pokračovaly v těhotenství po genetické konzultaci a normálním UTZ nálezu do termínu porodu (7 případů). Výsledek těhotenství je znám u 2 těchto případů, kdy bylo hlášeno narození 2 dětí bez kongenitálních defektů. 5 těhotenství ukončených v kategorii těhotenství s nejistou prognózou, společně s 175 případy pozitivně testovaných v kategorii CHAs diagnostikovatelných RAD a 10 případů z kategorie nebalancovaných CHAs tvořilo soubor 190 klinicky signifikantních CHAs.

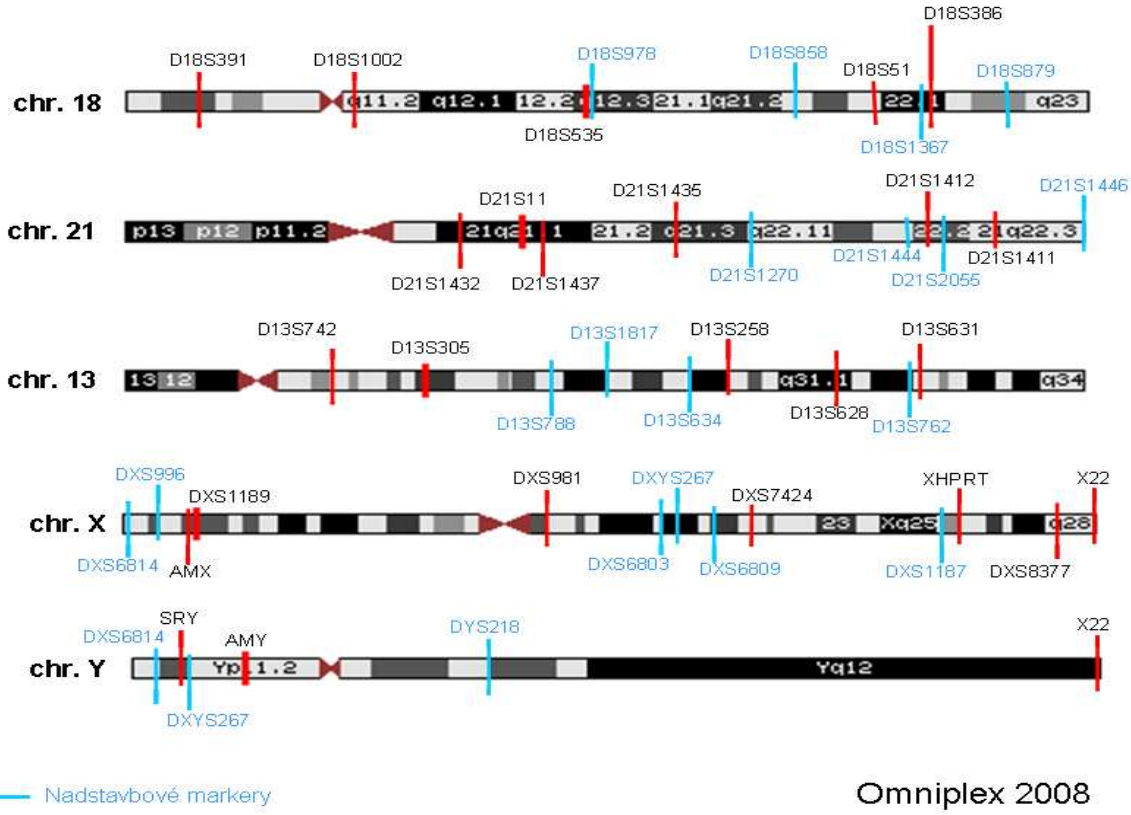
QF-PCR test, testující chromozomy 13, 18, 21, X a Y detekoval 91,5% CHAs (130/142) signifikantních CHAs v souboru 2906 testovaných vzorků. V kategorii testované pouze na trizomii chromozomu 21 bylo zachyceno 87,5% (42/48) signifikantních CHAs. Detailní klinické informace o všech klinicky signifikantních CHAs nedetekovaných metodou QF-PCR v tomto souboru byl publikován v Putzova et al. 2008 (P1).

Na základě těchto výsledků byla také stanovena heterozygozita jednotlivých použitých STR markerů a sestaven nový diagnostický set STR markerů tak, aby bylo sníženo na minimum riziko neinformativního výsledku. Tento diagnostický set je v naší laboratoři (Gennet, Praha) aplikován od února 2007. Metodika sestavení setu a první výsledky získané na 960 klinických vzorcích budou publikovány zanedlouho (Putzova et al. Prenat Diagn, in press, P2). Informace o vybraných STR markerech použitých

v novém diagnostickém setu jsou shrnuty v tabulce č. 3, umístění vybraných STR lokusů na vyšetřovaných chromozómech viz obr. č. 6.

**Tabulka 3**: Složení nového diagnostického setu STR markerů (OmniPlex)

| | | Velikost v bp | | Heterozygozita | | Počet alel | Umístění na chromozomu |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Marker | min | max | uváděná | detekovaná | | |
| **13** | D13S258 | 280 | 339 | 0.875 | 0.876 | 21 | 13q21.33-q22.1 |
| | D13S305 | 438 | 474 | 0.75 | 0.809 | 11 | 13q13.3 |
| | D13S628 | 444 | 482 | 0.688 | 0.782 | 12 | 13q31.1 |
| | D13S631 | 164 | 184 | 0.938 | 0.827 | 8 | 13q32.1 |
| | D13S742 | 392 | 439 | 0.75 | 0.891 | 24 | 13q12.12 |
| **18** | D18S1002 | 104 | 132 | 0.812 | 0.788 | 12 | 18q11.2 |
| | D18S386 | 309 | 370 | 0.875 | 0.956 | 35 | 18q22.1 |
| | D18S391 | 138 | 156 | 0.75 | 0.636 | 6 | 18p11.31 |
| | D18S51 | 197 | 243 | 0.889 | 0.827 | 13 | 18q21.33 |
| | D18S535 | 180 | 207 | 0.76 | 0.782 | 9 | 18q12.3 |
| **21** | D21S11 | 219 | 259 | 0.9 | 0.9 | 16 | 21q21.1 |
| | D21S1411 | 348 | 498 | 0.933 | 0.909 | 15 | 21q22.3 |
| | D21S1412 | 273 | 329 | 0.8 | 0.908 | 28 | 21q22.2 |
| | D21S1432 | 152 | 177 | 0.65 | 0.709 | 10 | 21q21.1 |
| | D21S1435 | 389 | 430 | 0.81 | 0.755 | 10 | 21q21.3 |
| | D21S1437 | 449 | 478 | 0.785 | 0.818 | 14 | 21q21.1 |
| **X/Y** | AMX/AMY | 109 | 114 | | - | | Xp22.2/Yp11.2 |
| | DXS1189 | 258 | 287 | 0.8 | 0.836 | 15 | Xp22.2 |
| | DXS7424 | 186 | 210 | 0.819 | 0.845 | 13 | Xq22.1 |
| | DXS8377 | 393 | 447 | 0.95 | 0.966 | 19 | Xq28 |
| | DXS981 | 349 | 365 | 0.86 | 0.83 | 12 | Xq13.1 |
| | SRY | 110 | | | - | | Yp11.31 |
| | X22 | 207 | 250 | 0.825 | 0.818 | 11 | Xq28/Yq12 |
| | XHPRT | 269 | 293 | 0.779 | 0.765 | 10 | Xq26.2 |




**Obr. 6**: Umístění vybraných STR lokusů na vyšetřovaných chromozómech. Černě jsou zobrazeny markery, které jsou obsaženy v nově sestaveném vyšetřovacím setu, modře markery obsažené v nadstavbových setech.

Na základě našich zkušeností (Putzová *et al*. 2008 (P1)) je poměr hrotů kromě vstupního DNA templátu závislý také na vzdálenosti hodnocených alel a to v důsledku preferenční amplifiakce kratších alel při PCR. Poměry hrotů, které jsme hodnotili jako průkazně trizomické a takové, které jsme hodnotili jako neprůkazné jsou shrnuty v následujících tabulkách (Tab. č. 4 a 5).

**Tabulka 4**: Poměrová kritéria dialelických markerů.

| Poměr | 1:2 | Neprůkazný | 1:1 | Neprůkazný | 2:1 |
|---|---|---|---|---|---|
| Vzdálenost hrotů <24 bp | <0,65 | 0,65-0,74 | 0,75-1,44 | 1,45-1,80 | >1,80 |
| Vzdálenost hrotů ≥24 bp | <0,65 | 0,65-0,74 | 0,75-1,54 | 1,55-1,80 | >1,80 |

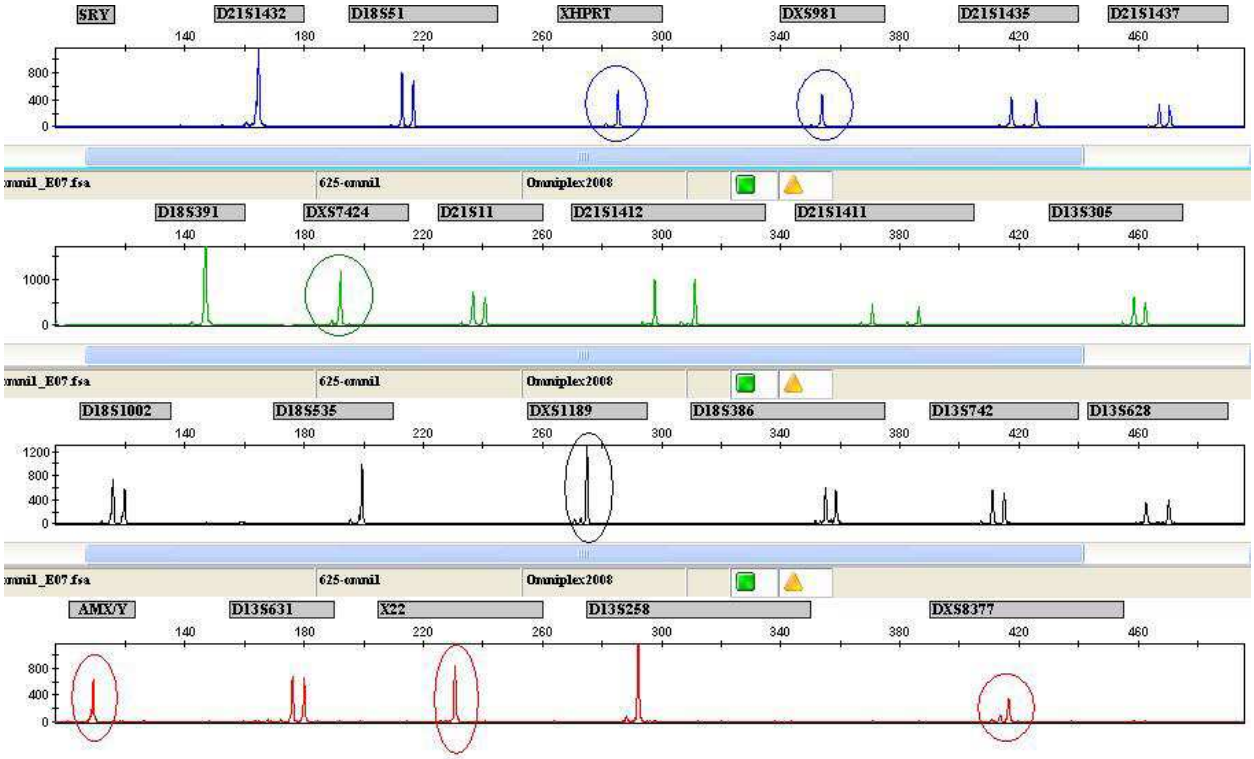
**Tabulka 5**: Poměrová kritéria trialelických markerů.

| Poměr | Neprůkazný | 1:1:1 | Neprůkazný |
|---|---|---|---|
| Vzdálenost hrotů <24 bp | <0,74 | 0,75-1,44 | >1,45 |
| Vzdálenost hrotů ≥24 bp | <0,74 | 0,75-1,54 | >1,55 |

Hodnoty ≤1:0,7 a ≥1:1,4 neposkytují spolehlivý výsledek a vyšetření je v takovém případě nutné opakovat. Poměry hrotů menší než 0,25 a větší než 4 byly hodnoceny jako PCR artefakty a anylýza byla provedena znovu.

Na obrázku č. 7 a 8 jsou uvedeny příklady výsledků vyšetření metodou QF-PCR získaných pomocí nově sestaveného základního setu STR markerů.

**Obrázek 7:** Příklad výsledku vyšetření QF-PCR pomocí nově sestaveného setu STR markerů. Délky fragmentů jsou (v bp) uvedeny na horizontální ose, arbitrární fluorescenční jednotky jsou uvedeny na vertikální ose. STR markery jsou identifikovány na základě fluorescečního značení a délky fragmentu. Karyotyp vyšetřovaného plodu 47, XY + 21: produkty markerů D21S1432 a D21S1411 vykazují poměr hrotů 2:1, markery D21S1435, D21S1437, D21S11 vykazují 3 hroty v poměru 1:1:1. Výsledek markeru D21S1412 vykazuje neinformativní výsledek.




**Obrázek 8**: Průkaz monozomie chromozomu X (karyotyp 45, X) na základě vyšetření metodou QF-PCR. Marker AMX/Y vykazuje pouze X-specifický produkt, ostatní X-specifické markery vykazují pouze 1 hrot.

Současně byla vytvořena soustava nadstavbových markerů vhodných k samostatnému testování jednotlivých chromozomů. Tyto sety jsou využívány (1) k samostatnému testování jednotlivých chromozomů v případě potřeby ověření patologického výsledku zjištěného základním setem STR markerů; (2) k samostatnému testování jednotlivých chromozomů v případě nedostatečně informativního výsledku konkrétního chromozomu po vyšetření základním setem STR markerů. Nadstavbové sety byly konstruovány tak, že obsahují všechny STR markery na testovaný chromozom obsažené v základním setu a 4-7 vybraných nadstavbových markerů.

Jednotlivé markery použité v nadstavbových setech jsou charakterizovány v tabulce č. 6. Na obrázcích 9 - 13 uvádím příklady vyšetření pomocí nadstavbových setů STR markerů specifických pro jednotlivé vyšetřované chromozómy.

**Tabulka 6**: Koncept setů nadstavbových markerů, sloužících k ověření patologických nálezů jednotlivých testovaných chromozomů a k dovyšetření vzorků v případě neinformativity

## Chromozomy X a Y

| | | Velikost v bp | | Heterozygozita | | Značení | Umístění na chromozomu |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Marker | min | max | uváděná | detekovaná | | |
| **X/Y** | AMX/AMY | 109 | 114 | | - | Pet | Xp22.2/Yp11.2 |
| | DXS1189 | 258 | 287 | 0,8 | 0,816 | Ned | Xp22.2 |
| | DXS7424 | 186 | 210 | 0,819 | 0,845 | Vic | Xq22.1 |
| | DXS8377 | 393 | 447 | 0,95 | 0,966 | Pet | Xq28 |
| | DXS981 | 349 | 365 | 0,86 | 0,83 | 6-Fam | Xq13.1 |
| | SRY | 110 | | | - | 6-Fam | Yp11.31 |
| | X22 | 207 | 250 | 0,825 | 0,818 | Pet | Xq28/Yq12 |
| | XHPRT | 269 | 293 | 0,779 | 0,765 | 6-Fam | Xq26.2 |
| | | | | *Nadstavbové markery* | | | |
| **X/Y** | DXYS218 | N/A | 280 | 0.74 | N/A | Vic | Xp22.32/Yp11.3 |
| | DXS6814 | N/A | 156 | 0.73 | N/A | 6-Fam | Xp22.33/Yp11.32 |
| | DXYS267 | N/A | 250 | 0.87 | N/A | 6-Fam | Xq21.31/Yp11.31 |
| **X** | DXS1187 | N/A | 144 | 0.75 | N/A | Vic | Xq26.2 |
| | DXS6809 | N/A | 335 | 0.74 | N/A | Pet | Xq21.33 |
| | DXS6803 | N/A | 381 | 0.86 | N/A | Ned | Xq21.31 |
| | DXS996 | 130 | 168 | 0.82 | 0.906 | Ned | Xp22.3 |

## Chromozom 13

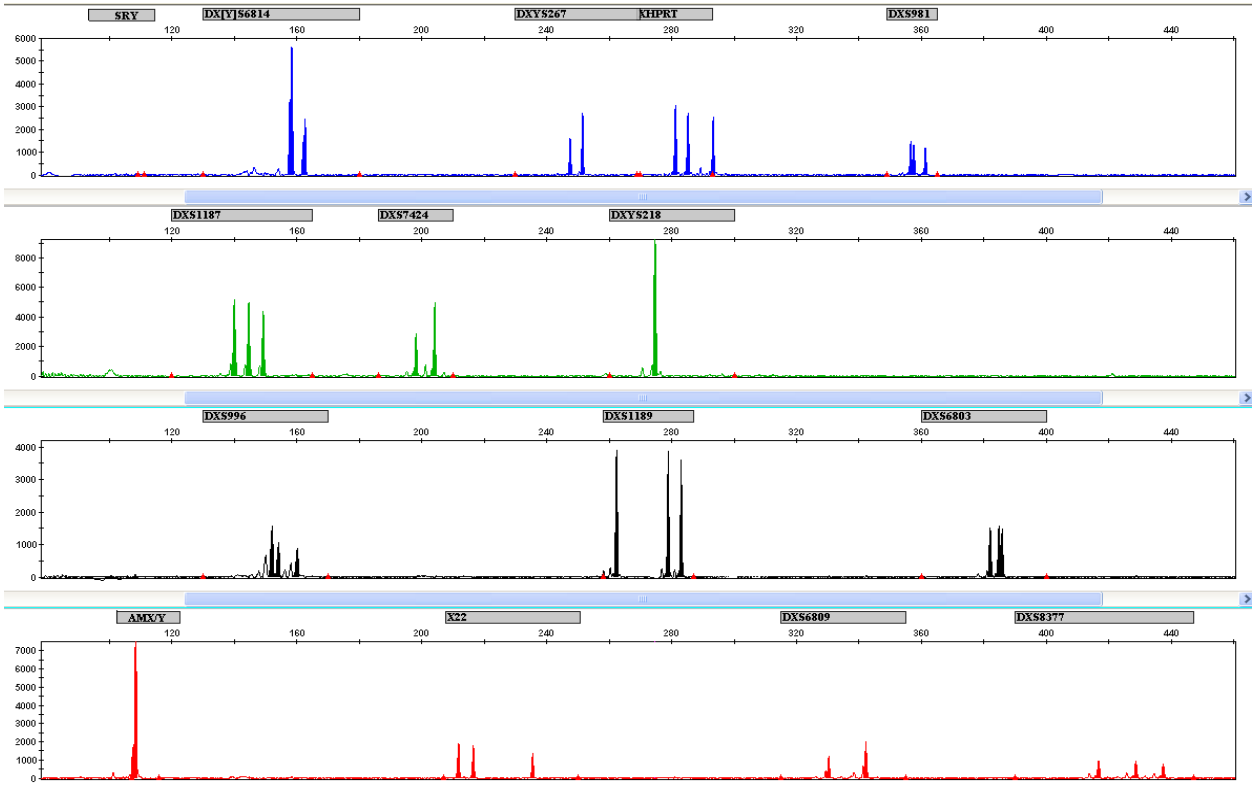
| | | Velikost v bp | | Heterozygozita | | Značení | Umístění na chromozomu |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Marker | min | max | uváděná | detekovaná | | |
| **13** | D13S258 | 280 | 339 | 0,875 | 0,873 | Pet | 13q21.33-q22.1 |
| | D13S305 | 438 | 474 | 0,75 | 0,809 | Vic | 13q13.3 |
| | D13S628 | 444 | 482 | 0,688 | 0,782 | Ned | 13q31.1 |
| | D13S631 | 164 | 184 | 0,938 | 0,827 | Pet | 13q32.1 |
| | D13S742 | 392 | 439 | 0,75 | 0,891 | Ned | 13q12.12 |
| | | | | *Nadstavbové markery* | | | |
| | D13S634 | 380 | 440 | 0.81 | 0.836 | 6-Fam | 13q21.33 |
| | D13S762 | N/A | 200 | N/A | N/A | 6-Fam | 13q31.3 |
| | D13S788 | N/A | 278 | N/A | N/A | Vic | 13q14.3 |
| | D13S1817 | N/A | 216 | N/A | N/A | Ned | 13q21.1 |

## Chromozom 18

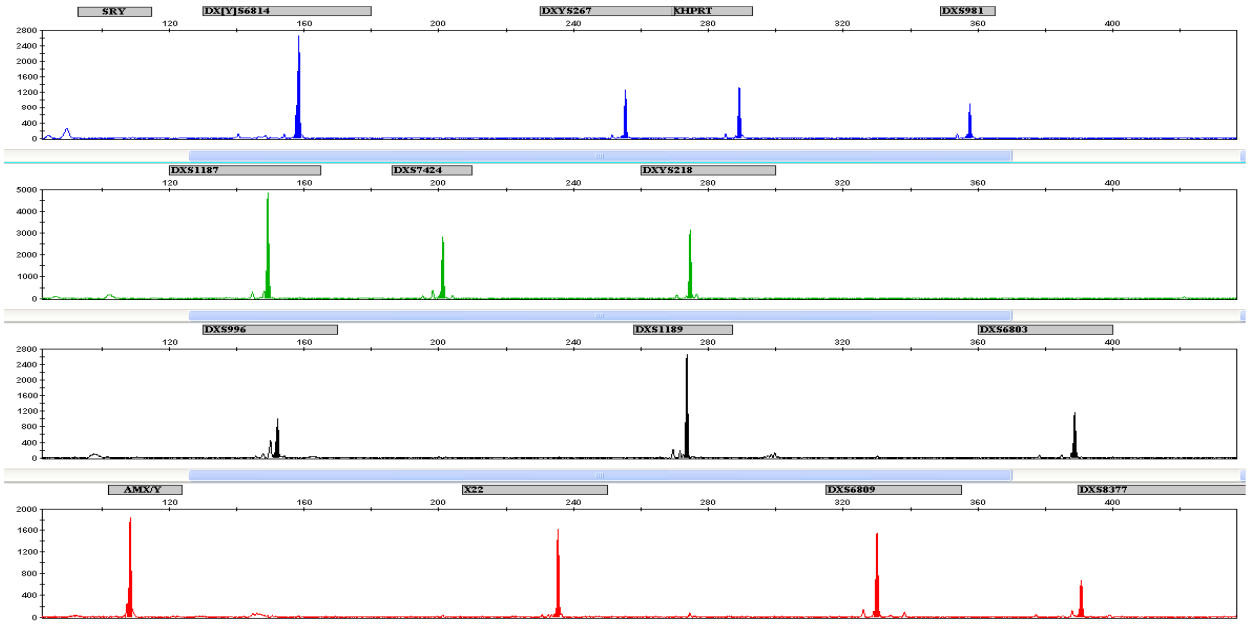
| | | Velikost v bp | | Heterozygozita | | Značení | Umístění na chromozomu |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Marker | min | max | uváděná | detekovaná | | |
| **18** | D18S1002 | 104 | 132 | 0,812 | 0,827 | Ned | 18q11.2 |
| | D18S386 | 309 | 370 | 0,875 | 0,936 | Ned | 18q22.1 |
| | D18S391 | 138 | 156 | 0,75 | 0,636 | Vic | 18p11.31 |
| | D18S51 | 197 | 243 | 0,889 | 0,827 | 6-Fam | 18q21.33 |
| | D18S535 | 180 | 207 | 0,76 | 0,782 | Ned | 18q12.3 |
| | | | | *Nadstavbové markery* | | | |
| | D18S879 | N/A | 250 | 0.86 | N/A | Vic | 18q22.3 |
| | D18S978 | N/A | 217 | 0.77 | N/A | Pet | 18q12.3 |
| | D18S858 | N/A | 320 | N/A | N/A | Pet | 18q21.31 |
| | D18S1367 | N/A | 165 | 0.74 | N/A | 6-Fam | 18q22.1 |

## Chromozom 21

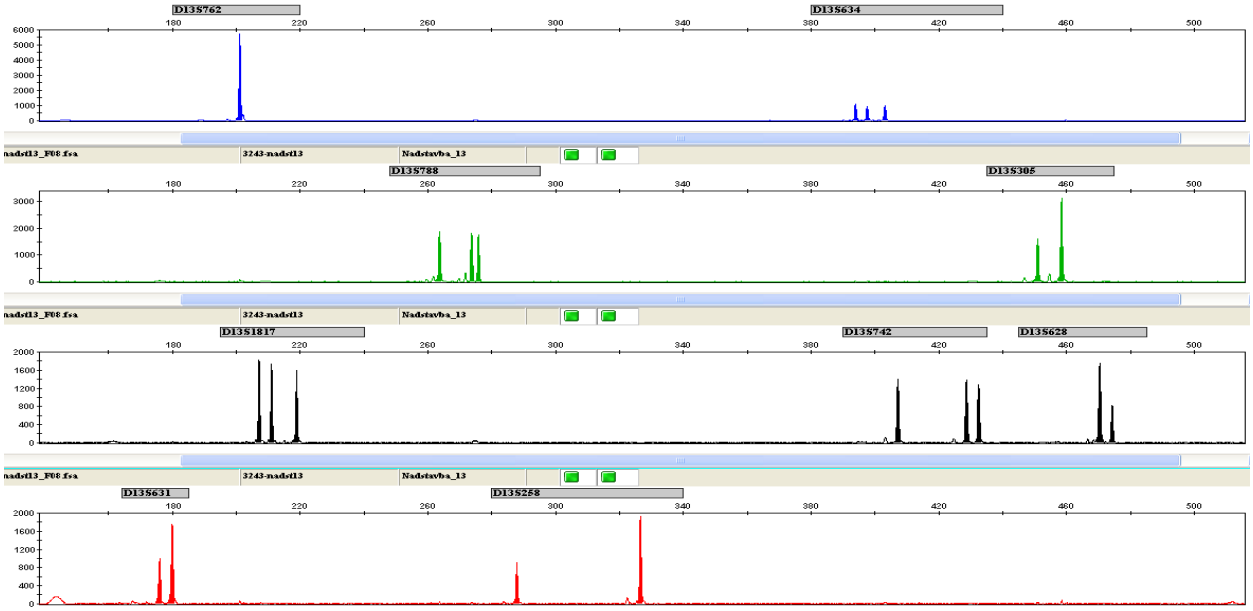
| | Marker | Velikost v bp min | Velikost v bp max | Heterozygozita uváděná | Heterozygozita detekovaná | Značení | Umístění na chromozomu |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **21** | D21S11 | 219 | 259 | 0,9 | 0,9 | Vic | 21q21.1 |
| | D21S1411 | 348 | 498 | 0,933 | 0,909 | Vic | 21q22.3 |
| | D21S1412 | 273 | 329 | 0,8 | 0,9 | Vic | 21q22.2 |
| | D21S1432 | 152 | 177 | 0,65 | 0,709 | 6-Fam | 21q21.1 |
| | D21S1435 | 389 | 430 | 0,81 | 0,755 | 6-Fam | 21q21.3 |
| | D21S1437 | 449 | 478 | 0,785 | 0,818 | 6-Fam | 21q21.1 |
| | | | | *Nadstavbové markery* | | | |
| | D21S1446 | N/A | 300 | 0.78 | 0.769 | Pet | 21q22.3 |
| | D21S1270 | N/A | 275 | N/A | N/A | Ned | 21q22.11 |
| | D21S2055 | N/A | 422 | N/A | N/A | Ned | 21q22.2 |
| | D21S1444 | N/A | 240 | N/A | N/A | Pet | 21q22.13 |



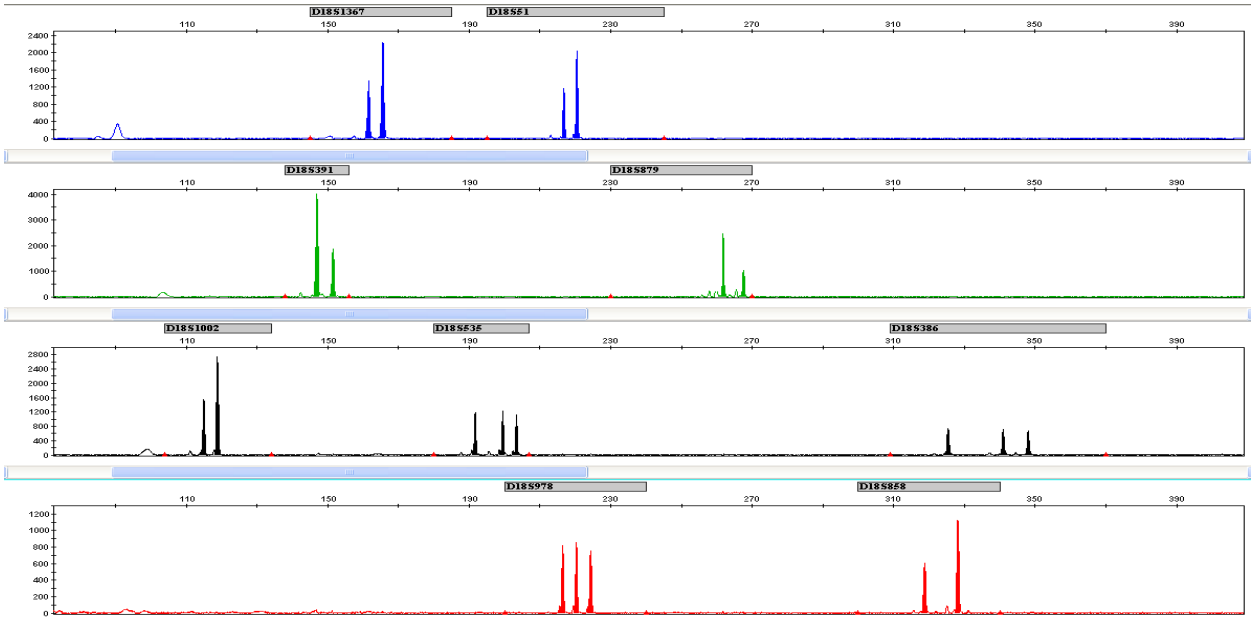

**Obrázek 9**: Příklad výsledku vyšetření QF-PCR pomocí nově sestaveného nadstavbového setu STR markerů specifických pro pohlavní chromozomy. Délky fragmentů jsou (v bp) uvedeny na horizontální ose, arbitrární fluorescenční jednotky jsou uvedeny na vertikální ose. STR markery jsou identifikovány na základě fluorescečního značení a délky fragmentu. Karyotyp vyšetřovaného plodu je 47, XXX: produkty X- specifických markerů a markerů v pseudoautozomálních oblastech vykazují poměr hrotů 2:1, nebo 3 hroty v poměru 1:1:1, zatím co Y - specifické fragmenty (AMY a SRY) nejsou detekovány.



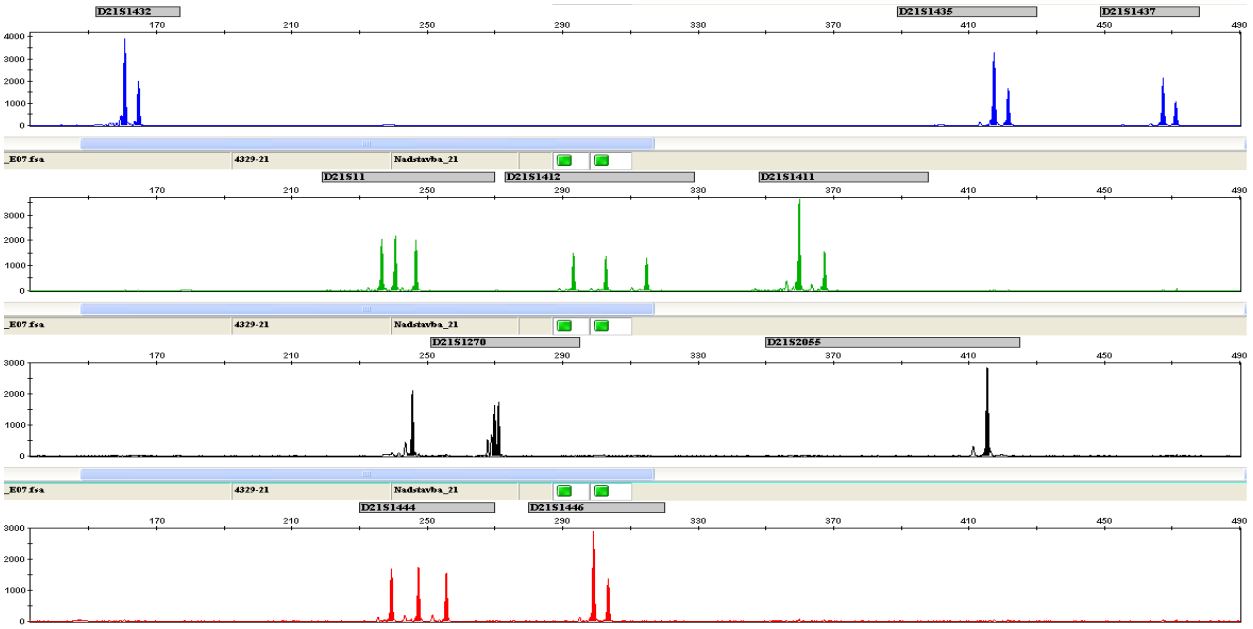

**Obrázek 10**: Příklad výsledku vyšetření plodu 45,X metodu QF-PCR pomocí stejného nadstavbového setu STR markerů specifických pro pohlavní chromozomy jako na obr. 9. Všechny produkty X- specifických markerů a markerů v pseudoautozomálních oblastech vykazují monoalelický nález, Y - specifické fragmenty (AMY a SRY) nejsou detekovány.




**Obrázek 11**: Příklad výsledku vyšetření QF-PCR pomocí nově sestaveného nadstavbového setu STR markerů specifických pro chromozom 13. Karyotyp vyšetřovaného plodu je 47,XX, + 13: produkty všech markerů vykazují poměr hrotů 2:1, nebo 3 hroty v poměru 1:1:1.




**Obrázek 12**: Příklad výsledku vyšetření QF-PCR pomocí nově sestaveného nadstavbového setu STR markerů specifických pro chromozom 18. Karyotyp vyšetřovaného plodu je 47,XX, + 18: produkty všech markerů vykazují poměr hrotů 2:1, nebo 3 hroty v poměru 1:1:1.




**Obrázek 13**: Příklad výsledku vyšetření QF-PCR pomocí nově sestaveného nadstavbového setu STR markerů specifických pro chromozom 21. Karyotyp vyšetřovaného plodu je 47,XY, + 21: produkty všech markerů (kromě neinformativního D21S2055) vykazují poměr hrotů 2:1, nebo 3 hroty v poměru 1:1:1.

# 5. Diskuze

Tato disertační práce je věnována problematice vyšetřovací metody QF-PCR, její optimalizaci, standardizaci a možnostem jejího využití v prenatální a postnatální diagnostice nejčastějších aneuploidií.

V úvodní části práce byly testovány dříve publikované multiplexní sety STR markerů na velkém množství klinických vzorků. Vzhledem k faktu, že metoda QF-PCR se v ČR neprovádí jako samostatné vyšetření, ale je ve všech indikovaných případech součástí duálního testování karyotypu plodu v riziku chromozomální aberace, testovali jsme možnost vyšetřovat v přísně indikovaných případech pouze chromozom 21 (zvýšené riziko Downova syndromu zjištěné na nákladě výsledků druhotrimestrálního biochemického screeningu s negativním UTZ nálezem). Výsledky tohoto přístupu jsme publikovali v European Journal of Medical Genetics (P1).

V druhé části disertační práce byla řešena možnost optimalizace a rozšíření spektra vyšetřovacích markerů tak, aby byla zvýšena informativita a tím i efektivita vyšetření. Vycházeli jsme z faktu, že informativita (heterozygozita) jednotlivých STR markerů se v jednotlivých populacích může více či méně lišit (Sacchetti 1999), při sestavování nového diagnostického setu jsme tedy vycházeli z heterozygozit skutečně zjištěných v české populaci na celkem 2 906 prenatálně testovaných vzorcích. Námi zjištěné informativity jednotlivých testovaných STR markerů a postup při výběru markerů do nového multiplexního setu byl popsán a bude zanedlouho publikován v Pranatal Diagnosis (P2). Nad rámec tohoto publikovaného setu byl vytvořen komplex nadstavbových STR markerů, které jsou používány k ověření patologického výsledku zjištěného základním setem STR markerů a ve výjmečných případech (cca 0,3% všech testovaných vzorků) k doplnění vyšetření v případě, že byl na některém z vyšetřovaných chromozomů získán informativní výsledek pouze na jediném STR markeru.

Výhodou těchto nadstavbových setů je, že jsou konstruovány tak, že se v nich opakují všechny STR markery specifické pro konkrétní analyzovaný chromozom v základním setu a navíc obsahují nejméně 4 další vysoce informativní STR markery. Tento přístup výrazně zvyšuje možnost spolehlivého stanovení diagnózy i v případě nedostatečné informativity STR markerů v základním setu markerů.

Kvalitní pokrytí vyšetřovaných chromozomů co největším počtem dostupných vyšetřovacích STR markerů umožňuje detekci nejen kompletních aneuploidií, ale také submikroskopických duplikací či delecí (Verma et al. 1998), které není možné diagnostikovat jinými molekulárně cytogenetickými metodami jako jsou například FISH, PRINS či CGH. QF-PCR má v porovnání s těmito metodami vyšší rozlišovací schopnost, která se pohybuje na úrovni 200 - 500 párů bazí. Tato citlivost může být považována za výhodnou, velmi často se však jedná o varianty bez fenotypového významu, protože používané STR polymorfní markery se nacházejí převážně v nekódujících oblastech. V případě zjištěné vysoké frekvence submikroskopických duplikací je výhodnější takový marker z analýzy vypustit. V případě patologického nálezu je nutné vždy vyšetřit periferní krve obou rodičů. Srovnávací analýza umožní zjistit, zda stejnou variantu nese některý z rodičů (pak je považována za variantu bez fenotypového významu). V případě, že stejná varianta u rodičů zjištěná není, je velmi těžké její důsledky v případě prenatálního vyšetření interpretovat.

Výsledky studie potvrzují, že pro amplifikaci metodou QF-PCR by měly být použity výhradně tetranukleotidové či pentanukleotidové markery. Jsou stabilnější a při jejich amplifikaci nedochází ke sklouzávání DNA polymerázy tak jako je tomu u dinukleotidových markerů (Utah Marker Development Group, 1995).

Zároveň byly zavedeny markery sloužící k spolehlivé detekci všech aneuploidií pohlavních chromozomů. Dříve doporučená kombinace markerů AMX/Y, X22, P39 a XHPRT (Cigriliano et al. 1999, Sherlock et al. 1998) se ukázala jako zcela nedostatečná (viz. Putzová et al. 2008 (P1)), kdy řada normálních ženských plodů (až 0,5%) vykazovala monoalelický nález na všech třech markerech. Okamžitě po tomto zjištění byl zaveden set publikovaný Donaghue et al. 2003. Námi nově sestavený set diagnostických markerů obsahuje dostatečný počet STR markerů specifických k chromozomům X a Y a umožňuje detekci všech variant aneuploidií pohlavních chromozomů, včetně 47,XYY, 47,XXX, 47,XXY a izochromozomu X, které pomocí setů užívaných před rokem 2002 nebylo možné detekovat. Velmi se osvědčilo zavedení amelogeninového markeru používaného v kriminalistice (Sullivan et al. 1993), který mapuje deleci o velikosti 6 párů bazí, která se nachází v amelogeninovém genu na chromozomu X. Při použití tohoto markeru mají amplifikované fragmenty délky 106 párů bazí při amplifikaci z chromozomu X a 112 párů bazí při amplifikaci z chromozomu Y.

Ve všech řešených případech byl výsledek vyšetření každého vyšetřovaného

chromozomu uzavřen nejméně na základě výsledku dvou plně informativních STR markerů, protože jeden marker nezaručuje stanovení dostatečně spolehlivé diagnózy (Pertl, ústní sdělení). Každý patologický výsledek byl ověřen dvěma nezávislými vyšetřeními.

Dříve používaný AMXY marker byl ponechán pouze v setu pro analýzu chromozomu 21. Tento marker s alelami (AMY - 250bp, AMX - 432 bp) neumožňuje detekci aneuploidií pohlavních chromozomů a umožňuje pouze stanovení pohlaví plodu.

Dosažené výsledky potvrdily, že vyšetření metodou QF-PCR vykazuje 100% senzitivitu a při analýze 5 vyšetřovaných chromozomů je schopné identifikovat až 90% klinicky signifikantních chromozomálních aberací (Putzová et al. 2008 (P1)). Při analýze pouze chromozomu 21 je možné v případě striktního dodržení indikačních kritérií (pozitivní biochemický screening a UTZ provedený certifikovaným specialistou bez patologického nálezu) detekovat až 87,5% signifikantních chromozomálních aberací s kompletní specifitou a je tedy akceptovatelnou levnější variantou běžně prováděné QF-PCR, v případě, že je tato analýza prováděna v rámci duálního testování PV (Putzová et al. 2008 (P1)).

Pokud je to nutné, při vyšetření celé nukleární rodiny, QF-PCR může poskytnout doplňující informace o vzniku nondisjunkce a rodičovském původu nadbytečného chromozomu. Tato metoda je vhodná rovněž pro ověření uniparentální dizomie (včetně rozlišení uniparentální heterodizomie vzniklé v prvním meiotickém dělení od uniparentální izodizomie vzniklé v druhém meiotickém dělení) a lze ji použít i pro zjišťování zygozity dvojčat.

Při analýze vzorku CVS a při analýze PV s makroskopicky patrnou kontaminací čerstvou krví doporučujeme analyzovat společně se vzorkem zároveň DNA z periferní krve matky. Na základě srovnání profilů je možné vyloučit či potvrdit kontaminaci biologickým materiálem matky v důsledku invazivního odběru PV či CVS. V ostatních případech není zpravidla srovnávací analýza s DNA matky či otce nutná. Výjimkou je zjištění mikroskopické duplikace v prenatálním vzorku v některém z analzyovaných STR, jak bylo zmíněno dříve. Jedná se zpravidla o polymorfismus bez fenotypového projevu, v takovém případě je však nanejvýš vhodné provést analýzu příslušným STR

markerem u obou rodičů.

V současné době je metoda QF-PCR využívána především pro prenatální diagnostiku u těhotenství, která mají vysoké riziko chromozomálních aberací, nebo v případě, kdy je nutné zjistit pohlaví plodu v časném stádiu těhotenství při ohrožení recesivní X - vázanou chorobou. V neposlední řadě je indikováno v případech, kdy je nutné velice rychle rozhodnout o dalším osudu gravidity při ohrožení zdraví těhotné či plodu. Doplnění výsledků QF-PCR kompletním cytogenetickým vyšetřením karyotypu je nezbytně nutné v případech, kdy jsou závěry vyšetření QF-PCR v rozporu s nálezem těžkých vrozených vývojových vad zjištěných ultrazvukovým vyšetřením.

V porovnání s metodou FISH, která dříve byla velmi často využívanou metodou molekulární cytogenetiky, je QF-PCR spolehlivější při diagnostice volných aneuploidií vyšetřovaných chromozomů. Bylo zjištěno, že FISH nedosahuje svou spolehlivostí při vyšetření klidových jader efektivity chromozomálního vyšetření (Gersen 1995). V čerstvě odebraných vzorcích plodové vody nelze metodou FISH, na rozdíl od QF-PCR, vyloučit riziko vyšetření mateřských buněk, s nímž je nutno počítat až ve 20 % čerstvých vzorků a v 0,2 % buněčných kultur amniocytů (Winsor et al. 1996). Při hodnocení výsledků vyšetření metodou FISH je nutné počítat s možností nepřesného hodnocení fluorescenčních signálů. Mohou se překrývat, jsou ovlivněny velikostí jádra, prostorovou lokalizací signálu v jádře a stupněm dekondenzace chromatinu (Robson a Smith 1995). Bryndorf et al. (1997) potvrdili, že spolehlivost metody FISH při detekci aneuploidií v interfázických jádrech nedosahuje 90 %. Je však nutné zmínit, že metoda FISH na rozdíl od metody QF-PCR umožňuje detekovat mozaikové formy trizomie.

Metoda QF-PCR umožňuje zjistit rodičovský původ nadbytečného chromozomu a časově lokalizovat vznik nondisjunkce, což umožňuje nejen výrazně zlepšit genetické poradenství u rizikových rodin, ale také lépe porozumět patogenezi nejčastějších aneuploidií. V neposlední řadě je metoda vhodná k detekci uniparentální dizomie.

Vyšetření metodou QF-PCR vyžaduje použití dostatečného počtu STR markerů na všech vyšetřovaných chromozomech. Ke stanovení správné diagnózy je nutná i správná interpretace obrazu, který poskytují.

V literatuře se již dlouho diskutuje o možnosti, že by QF-PCR pomohlo redukovat potřebu konvenční cytogenetické analýzy pouze na přísně indikované případy. Retrospektivní analýzy (Chitty et al. 2006, Kagan et al. 2007) naznačují, že indikací, která by měla mít největší váhu při rozhodování o tom, zda by QF-PCR mělo být

doplněno o cytogenetické vyšetření celého karyotypu je UTZ vyšetření plodu. V případě patologického UTZ nálezu by měla být karyotypyzace provedena. UK je zatím jediná země, kde je QF-PCR aplikováno na všechny invazivně testované vzorky jako samostatně indikované vyšetření a pouze u pacientek s patologickým ultrazvukovým nálezem je doplněno vyšetření karyotypu. Hlavním důvodem je úspora finančních prostředků U.K. National Health Service. Karyotypizace je prováděna jen u cca 15% všech invazivně odebraných vzorků a riziko falešně negativního výsledku je u těhotenství bez UTZ nálezu pouze 1 na přibližně 1 500 provedených QF-PCR vyšetření (Grimshaw et al. 2003, Ogilvie et al. 2005).

Objevují se však i práce, které varují před zvýšeným výskytem postižených novorozenců, jejichž narození by bylo možné předejít v případě provedení karyotypizace u všech pacientek (Caine et al. 2005, Wolstenholme 1998, Adinolfi et al. 2001a, Mann et al. 2001, Ogilvie et al. 2003, 2005, Leung et al. 2003, Wenstrom 2003, Grimshaw et al. 2003, Nicolini et al. 2004, Cirigliano et al. 2005).

Na základě retrospektivní analýzy našich dat z let 2002-2007 jsme došli k podobným výsledkům. Riziko falešně negativního výsledku v našem souboru by při testování chromozomů 13, 18, 21, X a Y pouze metodou QF-PCR u těhotenství s negativním UTZ nálezem bylo 1 : 1 513 provedených vyšetření (Putzova et al. 2008 (P1)). To by však přinášelo riziko přibližně třech falešně negativních výsledků při průměrném ročním počtu 4 000 prenatálních vyšetření v našem centru. Z tohoto důvodu QF-PCR zůstává doplňkovou metodou u vysoce rizikových těhotenství, po jejímž provedení s negativním výsledkem zůstává reziduální riziko falešně negativního výsledku nízké a tato skutečnost pomáhá snížit psychickou zátěž u anxiozních pacientek, naopak pozitivní nález při korespondujícím UTZ nálezu umožňuje okamžitý management patologických těhotenství.

Z dosažených výsledků vyplývá, že QF-PCR představuje vhodnou a spolehlivou molekulárně cytogenetickou metodu k rychlé diagnostice aneuploidií. Výsledky diagnostiky metodou QF-PCR je možné získat již do několika hodin po odběru biologického materiálu, a proto je výhodná pro řešení akutních geneticky rizikových případů. Vyšetření metodou QF-PCR je v ČR aplikováno jako součást duálního testování karyotypu, kdy je používáno především u pacientek s vysokým rizikem chromozomální aberace (≥1:100), hlavně v případech, kdy je vhodný rychlý management rizikové gravidity (pozitivní UTZ nález, pozdní záchyt patologické

gravidity).

Vyšetření je možné spolehlivě provést z malého množství i neživotaschopných buněk v případech, kdy není možné provést kultivaci s následným klasickým vyšetřením karyotypu, nebo v případě, kdy nelze cytogenetické vyšetření provést z časových důvodů.

# 6. Souhrn

Dosažené výsledky potvrdily, že vyšetření metodou QF-PCR vykazuje 100% senzitivitu a při analýze 5 vyšetřovaných chromozomů je schopné identifikovat až 90% klinicky signifikantních chromozomálních aberací. Negativní výsledek QF-PCR analýzy snižuje reziduální riziko záchytu signifikantní chromozomální aberace nediagnostikovatelné QF-PCR u pacientek s negativním UTZ nálezem pod 1/1500. Tento fakt je velmi důležitý pro zmírnění obavy u pacientek s rizikem postižení plodu chromozomální aberací.

QF-PCR test zaměřený pouze na analýzu chromozomu 21 se ukázal jako ekonomická a klinicky akceptovatelná součást screeningu Downova syndromu v 2. trimestru. V případě striktního dodržení indikačních kritérií (pozitivní biochemický screening a UTZ provedený certifikovaným specialistou bez patologického nálezu) je schopen detekovat až 87,5% signifikantních chromozomálních aberací s kompletní specifitou.

Na základě zjištěné informativity použitých STR markerů v naší populaci se podařilo sestavit diagnostický set markerů s vysokou informativitou, včetně nadstavbových setů markerů na jednotlivé testované chromozomy, který minimalizuje riziko neinformativního výsledku vyšetření a umožňuje spolehlivou diagnostiku chromozomálních aberací testovaných chromozomů, včetně monozomie X, která byla při použití nedostatečného počtu markerů problematická.

Z dosažených výsledků vyplývá, že QF-PCR představuje vhodnou a spolehlivou molekulárně cytogenetickou metodu k rychlé diagnostice aneuploidií.

# 7. Definice a terminologie

| | |
|---|---|
| **Aneuploidie** | početní odchylka chromozomů, která není násobkem haploidního počtu |
| **Marker** | specifikovaná oblast na chromozomu |
| **PCR produkt** | specifický úsek DNA namnožený pomocí PCR |
| **PCR master mix** | směs chemikálií na PCR reakci před rozplněním do jednotlivých PCR zkumavek, tj. před přidáním vzorku DNA |
| **Primer** | krátký úsek jednovláknové DNA, sloužící k iniciaci syntézy komplementárního úseku DNA pomocí DNA-polymerázy |
| **Primermix** | směs primerů F (forward) a R (reverse) pro všechny vyšetřované STR markery |
| **QF-PCR** | kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce; umožňuje kvantifikaci získaných PCR produktů; PCR produkty jsou detekovány na základě fluorescenčního značení |
| **Multiplexní QF-PCR** | několikanásobná QF-PCR – tj. namnožení více PCR produktů v jedné PCR reakci, za přítomnosti více párů primerů |
| **STR** | „short tandem repeat“ – krátká tandemová repetice – opakovaní několika (nejčastěji 2-5) nukleotidů několikrát za sebou |

# Seznam použitých zkratek

| | |
|---|---|
| **bp** | páry bazí (base pairs) |
| **CVS** | vzorek choriové biopsie |
| **PV** | vzorek plodové vody |
| **CHA** | chromozomální aberace |
| **CHAs** | chromozomální aberace (množné číslo) |
| **DNA** | deoxyribonukleová kyselina |
| **SAB** | spontánní abortus (potrat) |
| **TT** | týden těhotenství |
| **UTZ** | ultrazvukové vyšetření plodu |
| **RAD** | rychlá diagnostika aneuploidií (z angl. „rapid aneuploidy detection“) |
| **N/A** | údaje, které jsou v našem souboru zatím nedostatečně charakterizované (z angl. „not available“) |

# 8. Přílohy

***P1. Putzova M, Soldatova I, Pecnova L, Dvorakova L, Goetz P, Stejskal D. 2008. QF-PCR - based prenatal detection of common aneuploidies in the Czech population: five years of experience. European Journal of Medical Genetics 51: 209-218.***

***P2. <u>Putzova M</u>, Pecnova L, Dvorakova L, Soldatova I, Goetz P, Stejskal D. OmniPlex – a new QF-PCR assay for prenatal diagnosis of common aneuploidies based on evaluation of the heterozygosity of short tandem repeat loci in the Czech population. Prenatal Diagnosis, In press.***

***P3. Machatkova M, <u>Brouckova M</u>, Matejckova M, Krebsova A, Sperling K, Vorsanova S, Kutsev S, Zerova T, Arbuzova S, Krejci R, Petersen M, Macek M Sr. 2005.QF-PCR examination of parental and meiotic origin of trisomy 21 in Central and Eastern Europe. J Histochem Cytochem. Mar;53(3):371-3***

## *P4. Seznam Publikací abstrakt a přednášek*

### *Seznam publikačních aktivit vztahujících* se *k tématu disertační práce*

**Zahraniční publikace s IF**

Putzova M, Pecnova L, Dvorakova L, Soldatova I, Goetz P, Stejskal D. OmniPlex – a new QF-PCR assay for prenatal diagnosis of common aneuploidies based on evaluation of the heterozygosity of short tandem repeat loci in the Czech population. **Prenatal Diagnosis**, In press.

Putzova M, Soldatova I, Pecnova L, Dvorakova L, Goetz P, Stejskal D. 2008. QF-PCR - based prenatal detection of common aneuploidies in the Czech population: five years of experience. **European Journal of Medical Genetics** 51: 209-218.

Machatkova M, Brouckova M, Matejckova M, Krebsova A, Sperling K, Vorsanova S, Kutsev S, Zerova T, Arbuzova S, Krejci R, Petersen M, Macek M Sr. 2005.QF-PCR examination of parental and meiotic origin of trisomy 21 in Central and Eastern Europe. **J Histochem Cytochem.** Mar;53(3):371-3

**Zahraniční publikace bez IF**

Macek M Sr, Krebsova A, Brouckova M, Matejckova M, Machatkova M, Diblik J, Sperling K, et al. (2003) Quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QFPCR) in the prenatal and postnatal diagnosis of the most frequent aneuploidies. Balkan J Med Gen 6:87–94

Macek M Sr, Krebsova A, Horka I, Diblik J, Matejckova M, Brouckova M, Chudoba D, et al. (2002) Quantitative fluorescent PCR (QFPCR) in the examination of microquantity of fetal cell. In Macek M Sr, Bianchi DW, Cuckle H, eds. Early Prenatal Diagnosis, Fetal Cells and DNA in the Mother, Present State and Perspectives. Prague, The Karolinum Press, 304–328

Krebsová A., Broučková M., Horká I., Matějčková M., Diblík J., Chudoba D., Novotná

D., Kulovaný E., Macek Jr. M., Macek M.: Quantitative fluorescent PCR in rapid prenatal and postnatal detection of the most frequent aneuploidies and their parental and meiotic origin. Annales de Génétique, International Journal of Human and Medical Genetics, vol. 44, suppl. 1, July 2001, ISSN 0003-3995, p.150, 3-352

M. Macek, O.A.Haas, M. Broučková, M. Matějčková, A. Krebsová, I. Horká, J. Diblík, D. Chudoba, R. Kodet, M. Tichý, Z. Matějovský, K. Pýcha, M. Candrová, Š. Vilímová, V. Krutílková, M. Macek Jr. : Quantitative fluorescent PCR analysis of aneuploidy in cultivated and uncultivated solid tumors, ALL and disorders of trophoblast. Annales de Génétique, International Journal of Human and Medical Genetics, vol. 44, suppl. 1, July 2001, ISSN 0003-3995, p.87, 2-282

M. Macek, A. Krebsová, I. Horká, M. Matějčková, M. Broučková, J .Diblík, I. Hromadníková, D. Chudoba, D. Novotná, M. Havlovicová, E. Kulovaný: Quantitative fluorescent PCR (QFPCR) in the examination of microquantity of fetal cells. Monography, Charles University Press, Karger, 2002

**Přednášky**

Putzová M., Stejskal D.: Antenatal QF-PCR Prague experience. PMSDS (Kampa) 10/2007

Putzová M, Stejskal D.: QF-PCR v prenatální diagnostice častých aneuploidií – naše pětileté zkušenosti . Celostátní sjezd společnosti lékařské genetiky 9/2007

Broučková M., Stejskal D.: Princip rychlé diagnostiky Downova syndromu metodou amnio PCR. Konference SPPDP. Lékařský dům 5/2005

Broučková M., Stejskal D.: Princip rychlé diagnostiky Downova syndromu metodou amnio PCR. ČS konference lékařské genetiky, Trenčianské Teplice 10/2003

Broučková M., Matějčková M.: Využití QF-PCR v diagnostice nejčastějších chromozomálních aneuploidií. Seminář UHKT 10/2002

Macek M., Vilímová Š, Potužníková P., Diblík J., Vincenciová R., Machatková M., Koudová M., Hladíková E., Krebsová A., Brandejská M., Uhrová E., Matějčková M., Broučková M., Macek Jr. M.: Využití lékařské genetiky v reprodukční medicíně. Seklův večer (Lékařský dům), Praha, 12/3/2001

Macek M., Krebsová A., Broučková M., Matějčková M., Diblík J.: Zhodnocení přínosu kvantitativní fluorescenční PCR pro cytogenetiku. 34. Výroční cytogenetická konference s mezinárodní účastí, 20. a 21. září 2001, III. interní klinika VFN a I. LF UK, U nemocnice 1, 128 08, Praha 2

Broučková M., Matějčková M.: Využití kapilární elektroforézy a) k prenatální diagnostice nejčastějších aneuploidií b) k diagnostice cystické fibrosy. Seminář PCR v medicíně III pořádaný firmou Sigma - Aldrich s.r.o., IKEM Praha, 21.11.2001

M. Macek, A. Krebsová, I. Horká, M. Matějčková, M. Broučková, J. Diblík, I. Hromadníková, D. Chudoba, D. Novotná, M. Havlovicová, E. Kulovaný: Quantitative fluorescent PCR (QFPCR) in the examination of microquantity of fetal cells. 12$^{th}$ Fetal Cell Workshop, 12 - 13 květen, 2001, Praha.

**Domácí publikace**

Macek, M., Vilímová, S., Potužníková, P., Yurov, Y., Vorsanova, S., Diblík, J., Krebsová, A., Machatková, M., Koudová, M., Alánová, R., Matějčková, M., Hladíková, E., Broučková. M., Hüttelová, R., Vincenciová, R., Paulasová, P., Brandejská, M., Uhrová, E., Kratěnová, A., Smetanová, D., Novotná, D., Chudoba, D., Kulovaný, E., Krutílková, V., Hromadníková, I., Mardešič, T., Macek Jr. M. (2002) Využití lékařské genetiky v reprodukční medicíně. Časopis Lékařů českých, 141(1):28-34.

**Publikace nevztahující se k tématu disertační práce**

Putzová M., Pecnová L., Hulvert J., Vykysalá L., Landfeld M., Míka J., Potužníková P., Brandejská M., Stejskal D. Preimplantační genetická diagnostika monogenně podmíněných chorob – její možnosti, úskalí a první úspěchy v České republice. Česko-slovenská Pediatrie, 63 (11):626-633.

Brdicka R, Beránek M, Cimburová M, Dvorácková J, Dvoráková D, Hájková J, Haskovec C, Kebrdlová V, Karas M, Kratochvílová A, Losan F, Macek M Jr, Musil F, Putzová M, Rozmanová S, Riedlová P, Safrová M, Scheinost O, Stolba P, Trka J, Vanecek T, Vrtel R. Frequency view on genome changes testing, Cas Lek Cesk. 2006;145(2):98-103. Review. Czech.

Daum O, Sima R, Mukensnabl P, Vanecek T, Brouckova M, Benes Z, Michal M. 2005. Pigmented solid-pseudopapillary neoplasm of the pancreas. Pathol Int.May;55(5):280-4.

Kazakov DV, Mikyskova I, Mukensnabl P, Brouckova M, Treska V, Hes O, Michal M. 2005. Reactive syringofibroadenomatous hyperplasia in peristomal skin with formation of hybrid epidermal-colonic mucosa glandular structures, intraepidermal areas of sebaceous differentiation, induction of hair follicles, and features of human papillomavirus infection: a diagnostic pitfall. Am J Dermatopathol. Apr;27(2):135-41.

Bauer P, Kraus J, Matoska V, Brouckova M, Zumrova A, Goetz P. 2004. Large de novo expansion of CAG repeats in patient with sporadic spinocerebellar ataxia type 7. J Neurol. Aug;251(8):1023-4. No abstract available.

Michal M, Vanecek T, Sima R, Mukensnabl P, Boudova L, Brouckova M, Koudepa K. 2004. Primary capillary hemangioblastoma of peripheral soft tissues. Am J Surg Pathol. Jul;28(7):962-6.

Macek M, Vilímová S, Potuzníková P, Yurov Y, Vorsanova S, Diblík J, Krebsová A, Machatková M, Koudová M, Alánová R, Matějcková M, Hladíková E, Broucková M, Hüttelová R, Vincenciová R, Paulasová P, Brandjeská M, Uhrová E, Kratěnová A, Smetanová I, Novotná D, Chudoba D, Kulovaný E, Krutílková V, Hromadníková I, Mardesic T, Macek M Jr. 2002. [Medical genetics in reproductive medicine]
Cas Lek Cesk. 2002;141(1):28-34. Czech.

Kodedová I, Dolezel D, Broucková M, Jirků M, Hypsa V, Lukes J, Scholz T. 2000. On the phylogenetic positions of the Caryophyllidea, Pseudophyllidea and Proteocephalidea (Eucestoda) inferred from 18S rRNA. Int J Parasitol.

Sep;30(10):1109-13.

***Přednášky nevztahující se k tématu disertační práce***

Putzová M a kol.: Preimplantační genetická diagnostika monogenních chorob – IX. Konference prenatální diagnostiky. Brno 11/2007

Putzová M a kol.: Preimplantační genetická diagnostika monogenních chorob – IPVZ, kurz: Molekulární genetika – možnosti molekulárně genetické diagnostiky a její použití 11/2007

Putzová M a kol.: Preimplantační diagnostika monogenních chorob – 11. konference DNA diagnostiky 12/2007

# 9. Použitá literatura


1. A collection of ordered tetranucleotide-repeat markers from the human genome. The Utah Marker Development Group 1995. *Am J Hum Genet* 57:619-628.

2. Adinolfi M., Cirigliano V. 2000. Detection of fetal cells in transcervical samples using X22 marker. *J Med Genet* 37:El.

3. Adinolfi M., Pertl B., Sherlock J. 1997. Rapid detection of aneuploidies by microsatellites and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenat Diagn* 17: 1299-1311.

4. Adinolfi M., Sherlock J. 2001. Fetal cells in transcervical samples at an early stage of gestation. *J Hum Genet.* 46:99-104.

5. Adinolfi M., Sherlock J., Pertl B. 1995. Rapid detection of selected aneuploidies by quantitative fluorescent PCR. *Bioessays* 17: 661-664.

6. Antonarakis S.E. 1991. The Down Syndrome Collaborative Group: Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. *N Engl J Med* 324: 872-876.

7. Antonarakis S.E., Avramoupoulos D., Blouin J.L., Conover Talbot C.Jr., Schinzel A.A. 1993. Mitotic errors in somatic cells cause trisomy 21 in about 4,5% of cases and are not associated with advanced maternal age. *Nat Genet* 3: 146-150.

8. Antonarakis S.E., Petersen M.B., Mclnnis M.G., Adelsberger P.A., Schinzel A.A., Binker F., Pangalos C., Raoul O., Slaugenhaupt S.A., Hafez M., Cohen M.M., Roulson D., Schwartz S., Mikkelsen M., Tranebjaerg L., Greenberg F., Hoar D.I., Rudd N.L., Warren A.C., Metaxotou C., Bartsocas C., Chakravati A. 1992. The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet* 50: 544-550.

9. Avramopoulos D., Mikkelsen M., Vassilopoulos D., Grigoriadou M. and Petersen M.B. 1996. Apolipoprotein E allele distribution in parents of Down's syndrome children. *Lancet* 347:862-865.

10. Bruyere H., Rupps R., Kuchinka B.D., Friedman J.M., Robinson W.P. 2000. Recurrent trisomy 21 in a couple with a child presenting trisomy 21 mosaicism and matemal uniparental disomy for chromosome 21 in the euploid cell line. *Am J Med Genet* 94: 35-41.

11. Bryndorf T., Christensen B., Vad M., Pamer J., Brocks J., Philip J. 1997. Prenatal detection of chromosome aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: Experience with 2000 uncultured amniotic fluid samples in a prospective preclinical tria1. *Prenat Diagn* 17(4): 333-341.

12. Burkart W., Grosche B., Schoetzau A. 1997. Down syndrome clusters in Germany after the Chernobyl accident. *Radiat Res* 147(3): 321-328.

13. Caine A, Maltby AE, Parkin CA, Waters JJ, Crolla JA, UK Association of clinical Cytogeneticists (ACC). 2005. Prenatal detection of Down's syndrome by rapid aneuploidy testing for chromosomes 13, 18, and 21 by FISH or PCR without a full karyotype: a cytogenetic risk assessment, The Lancet, 366 (9480): 123-128.

14. Cirigliano V., Lewin P., Szpiro-Tapies S., Fuster C. & Adinolfi M. 2001a. Assessment of new markers for the rapid prenatal detection of aneuploidies by quantitative fluorescent PCR (QF-PCR). *Ann. Hum. Genet.* 65: 421-7

15. Cirigliano V., Ejarque M., Canadas M.P., Lloveras E., Plaja A., Perez M.M., Fuster C.& Egozcue J. 2001b. Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies. *Mol. Hum. Repr.* 7:1001-6

16. Cirigliano V., Sherlock J., Conway G., Quilter C., Rodeck Ch., Adinolfi M. 1999. Rapid detection of Chromosomes X and Y Aneuploidies by Quantitative Fluorescent PCR. *Prenat Diagn* 19: 1099-1103.

17. Cirigliano V., Voglino G. & Adinolfi M. 2005. Non invasive screening and rapid QFPCR assay can greatly reduce the need of cytogenetic analysis in prenatal diagnosis. *Reprod. Biomed. Online* 11:671-673.

18. Cirigliano V, Voglino G, Cañadas P, Marongiu A, Ejarque M, Ordoñez E, Plaja A, Massorbrio M, Todros T, Fuster C, Campogrande M, Egozcue J, Adinolfi M. 2004. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18.000 consecutive clinical samples, Mol. Hum. Reprod. 10: 839–846.

19. Cirigliano V, Voglino G, Marongiu A, Cañadas P, Ordoñez E, Lloveras P, Plaja A,

Fuster C, Adinolfi M. 2006. Rapid prenatal diagnosis by QF-PCR: evaluation of 30,000 consecutive clinical samples and future aplications, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1075: 288–298.

20. Cozzi J., Conn C.M., Harper J., Winston R.M., Rindl M., Farndon P.A., Delhanty J.D. 1999. A trisomic germ cell line and precocious chromatid segregation leads to recurrent trisomy 21 conception. *Hum Genet* 104:23-28.
21. Crandall BF, Lebherz TB, Rubinstein L, Robertson RD, Sample WF, Sarti D, Howard J. 1980. Chromosome findings in 2,500 second trimester amniocenteses. *Am J Med Genet* 5: 345-56
22. Cuckle H.S., Wald N.J. 1990. Screening for Down's Syndrome. Liford R. Prenat Diagnosis and *Prognosis* (11), 67-92. *London,* Butterworths.
23. Daniel A., Stewart L., Saville T., Brookwell R., Paull H., Purvis-Smith S., Lam-Po-Tong P.R. 1982. Prenatal diagnosis in 3,000 women for chromosome, X-linked, and metabolic disorders. *Am J Med Genet* 11:61-75.
24. DeVoto M., Prosperi L., Bricarelli F.D., Coviello D.A., Groci G., Zelante L., Ferranti G., Tenconi R., Stomeo C., Romeo G. 1985. Frequency of consanguineous marriages among parents and grandparents of Down patients. *Hum Genet* 70:256-258.
25. Dolk H., Nichols R. 1999. Evaluation of the impact of Chemobyl on the prevalence of congenital anomalies in 16 regions of Europe. *Int J Epidemiol 28(5):* 941-948.
26. Donaghue C, Roberts A, Mann K, Ogilvie CM. 2003. Development and targeted application of a rapid QF-PCR test for sex chromosome imbalance, Prenat. Diagn. 23(3): 201–210.
27. Edwards J.H., Harnden D.G., Cameron A.H. 1960. A new trisomic syndrome. *Lancet* 1: 787-790.
28. Eiben B., Trawicki W., Hammans W., Goebel R. & Epplen J.T. 1998. A prospective comparative study on fluorescence in situ hybridization (FISH) of uncultured amniocytes and standard karyotype analysis. *Prenat. Diagn.* 18: 901-6.
29. Evans M.I., Henry G.P., Miller W.A., Bui T.H., Snidjers R.J., Wapner R.J., Miny P., Johnson M.P., Peakman D., Johnson A., Nicolaides K., Holzgreve W., Ebrahim S.A., Babu R. & Jackson L. 1999. International, collaborative assessment of

146,000 prenatal karyotypes: expected limitations if only chromosome-specific probes and fluorescent in-situ hybridization are used. *Hum. Reprod.* 14: 1213-6.

30. Ferguson-Smith M.A. 1997. Diagnosis for management and Treatement. *Prenat Diagn* 17:1201-1206.
31. Ferguson-Smith MA, Yates JR. 1984. Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: report of a collaborative european study on 52 965 amniocenteses. *Prenat Diagn* 4: 5-44
32. Fiegler H, Geigl JB, Langer S, Rigler D, Porter K, Unger K, Carter NP, Speicher MR. 2007. High resolution array-CGH analysis of single cells. Nucleic Acids Res. 35(3): e15
33. Fialkow P.J., Hecht F., Uchida I.A., Motulsky A.G. 1965. Increased frequency of thyroid autoantibodies in mothers of patients with Down's syndrome. *Lancet* 2(7418): 868-870.
34. Findlay L, Matthews P., Quirke P. 1998. Multiple genetic diagnoses from single cells using multiplex PCR: reliability and allele dropout. *Prenat Diagn* 18: 1413-1421.
35. Gerdes T, Kirchhoff M, Lind AM, Larsen GV, Schwartz M, Lundsteen C. 2005. Computer-assisted prenatal aneuploidy screening for chromosome 13, 18, 21, X and Y based on multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Eur J Hum Genet* 13: 171-5
36. Gersen S.L., Carelli M.P., Klinger K. W., Ward B.E. 1995. Rapid prenatal diagnosis of 14 cases of triploidy using FISH with multiple probes. *Prenat Diagn* 15: 1-5.
37. Gill P., Jeffreys A.J., Werrett D.J. 1985. Forensic application of DNA "fingerprints". *Nature* 3l8: 577- 579.
38. Giraud F., Mattei J.F. (1975): Epidemiological aspects of trisomy 21. *J Genet Hum* 23 SUPPL:1-30.
39. Gosden J., Hanratty D., Starling J., Fantes J., Mitchell A., Porteous D. 1991. Oligonucleotide primed in situ DNA synthesis (PRINS): A method for chromosome mapping, banding and investigation of sequence organization. *Cytogenet Cell Genet* 57:100-104.

40. Grimshaw GM, Szczepura A, Hulten M, MacDonald F, Nevin NC, Sutton F, Dhanjal S. 2003. Evaluation of molecular tests for prenatal diagnosis of chromosome abnormalities. Health Technol Assess 7:1– 146

41. Griffin D.K, Abruzzo M.A., Millie E.A., Feingold E., Hassold T.J. 1996. Sex ratio in normal and disomic sperm: evidence that the extra chromosome 21 preferentially segregates with the Y chromosome. *Am J Hum Genet 59:* 1108-1113.

42. Harjulehto T., Rahola T., Suomela M., Arvela H., Saxen L. 1991. Pregnancy outcome in Finland after the Chernobyl accident. *Biomed Pharmacother* 45(6): 263-266.

*43.* Harris D.J., Begleiter M.L., Chamberlin J., Hankins L., Magenis R.E. 1982. Parental trisomy 21 *mosaicism. Am J Hum Genet 34:125-133.*

44. Hassold T.J., Chui D. 1985. Maternal age-specific rates of numerical chromosomal abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet* 70: 11-17.

45. Hassold T.J., Jacobs P.A. 1984. Trisomy in man. *Annu.Rev.Genet.* 18:69-97.

46. Hassold T.J., Matsuyama A. 1979. Origin of trisomies in human spontaneous abortions. *Hum Genet* 46: 285-294.

47. Hassold T.J., Sherman S.L., Pettay D., Page D.C., Jacobs P.A. 1991. XY chromosome nondisjunction in man is associated with diminished recombination in the pseudoautosomal region. *Am J Hum Genet* 49: 253-260.

48. Huether C.A., Haroldson K., Ellis P.M., Ramsay C.N. 1996. Impact of prenatal diagnosis on revised livebirth prevalence estimates of Down Syndrome in the Lothian region of Scotland, 1978-1992. *Genet Epidemiol 13(4):* 367-375.

49. Chang HC, Jones OW, Masui H. 1982. Human amniotic fluid cells grown in a hormone-supplemented medium: suitability for prenatal diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79:4795-9

50. Chang HC, Jones OW. 1985. Reduction of sera requirements in amniotic fluid cell culture. *Prenat Diagn* 5: 305-12

51. Chitty LS, Kagan KO, Molina FS, Waters JJ, Nicolaides KH. 2006. Fetal nuchal

translucency scan and early prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities by rapid aneuploidy screening: observational study, BMJ 332 (7539)452-455.

52. Choueiri MB, Makhoul NJ, Zreik TG, Mattar F, Adra AM, Eid R, Mroueh A.M., Zalloua PA. 2006. The consanguinity effect on QF-PCR diagnosis of autosomal anomalies, Prenat. Diagn. 26(5): 409-14.

53. Irl C., Schoetzau A., van Santen F., Grosche B. 1995. Birth prevalence of congenital malformations in Bavaria, Germany, after the Chernobyl accident. *Eur J Epidemiol* 11(6): 621-625.

54. James R.S., Ellis K., Pettay D., Jacobs P.A. 1998. Cytogenetic and molecular study of four couples with multiple trisomy 21 pregnancies. *Eur J Hum Genet* 6:207-212.

55. James S.J., Pogribna M., Pogribny I.P., Melnyk S., Hyne R.J., Gibson J.B., Yi P., Tafoya D.L., Swenson D.H., Wilson V.L., Gaylor D.W. 1999. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene maybe maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr.* 70:495-501.

56. Jeffreys A.J., Wilson S.L., Thein S.L. 1985. Individual - specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* 316:76-79.

57. Kagan KO, Chitty LS, Cicero S, Eleftheriades M, Nicolaides KH. 2007. Ultrasound findings before amniocentesis in selecting the method of analysing the sample, Prenatal Diagn 27 (1): 34-39.

58. Klinger K., Landes G., Shook D., Harvey R., Lopez L., Locke P., Lerner T., Osathanondh R., Leverone B. & Houseal T. (1992). Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Am. J. Hum. Genet.* 51: 55-65.

59. Koehler K., Hawley S., Sherman S., Hassold T. (1996): Recombination and nondisjunction in humans and flies. *Hum Mol Genet* 5: 1495-1504.

60. Lamb N.E., Feingold E., Sevage-Austin A., Freeman S.B., Gu Y., Hallberg A., Hersey J., Karadima G., Pettay D., Saker D., Shen J., Taft L., Mikkelsen M., Petersen M.B., Hassold T.J., Sherman S.L. (1997): Characterization of susceptible

chiasmate configurations that increase the risk for maternal non- disjunction of chromosome 21. *Hum Mol Genet* 6: 1391-1399.

61. Lamb N.E., Freeman S.B., Savage-Austin A., Pettay D., Taft L., Hersey J., Gu Y., Shen J., Saker D., May K.M., Avramopoulos D., Petersen M.B., Hallberg A., Mikkelsen M., Hassold T.J., Sherman S.L. 1996. Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nat Genet* 14: 400-405.

62. Lejeune J., Gautier M., Turpin R. 1959. Étude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. C *R Acad Sci Paris* 248: 1721-1722.

63. Leung WC, Lau ET, Lao TT, Tang MH. 2003. Can amnio-polymerase chain reaction alone replace conventional cytogenetic study for women with positive biochemical screening for fetal Down syndrome? *Obstet Gynecol* 101: 856– 861

64. Lie R.T., Irgens L.M., Skjaevern R., Reitan J. B., Strand P., Strand T. 1992. Birth defects in Norway by levels of externa1 and food-based exposure to radiation from Chernobyl. *Am J Epidemiology* 136(4):377- 388.

65. Ligutic L, Beer Z., Modrusan - Mozetic Z., Svel I. 1989. Incidence of congenital anomalies in 2 communities in Croatia before and after the Chernobyl nuclear accident. *Lijec Vjesn* 111(9-10): 317-325.

66. Little J. (1993): The Chernobyl accident, congenital anomalies and other reproductive outcomes. *Paediatr Perinat Epidemiiol* 7(2): 121-151.

67. Machatkova M, Brouckova M, Matejckova M, Krebsova A, Sperling K, Vorsanova S, Kutsev S, Zerova T, Arbuzova S, Krejci R, Petersen M, Macek M Sr. 2005.QF-PCR examination of parental and meiotic origin of trisomy 21 in Central and Eastern Europe. J Histochem Cytochem. Mar;53(3):371-3

68. Mann K, Donaghue C, Fox SP, Docherty Z, Ogilvie CM. 2004. Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy, European Journal of Human Genetics 12: 907-915.

69. Mann K, Fox S.P., Abbs S.J., Yau S.Ch., Scriven P.N., Docherty Z., Ogilve C.M. 2001. Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnostic service within the UK National Health Service and the implications for the future

ofprenatal diagnosis. *Lancet* 358(9287): 1057-1061.

70. Mansfield E.S. 1993. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative fluorescent polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Hum Mol Genet* 2: 43-50.

71. Marteau T.M. 1992. Screening, ethics and the law. BMJ. 1992 Dec 5; 305(6866):1433-4.

72. Mikkelsen M., Poulsen H., Grinsted J., Lange A. 1980. Non-disjunction in trisomy 21: study of chromosomal heteromorphisms in 110 families. *Ann Hum Genet,* 44(Pt 1): 17-28.

73. Mikkelsen M., Poulsen H., Nielsen K.G. 1990. Incidence, survival, and mortality in Down syndrome in Denmnark. *Am J Med Genet,* suppl 7: 75-78.

74. Moberg L., Reizenstein P. 1993. Health effects in Sweden of the Chernobyl accident. *Nord Med* 108(4): 117-120.

75. Muller F., Rebiffé M., Taillandier A., Oury J.F., Mornet E. 1999. Parental origin of the extra chromosome in prenatally diagnosed fetal trisomy 21. *Hum Genet* 106: 340-344.

76. Müller-Navia J., Nebel A., Schleirmacher E. 1995. Complete and precise characterization of marker chromosomes by application of microdissection. *Hum Genet* 96:661-667.

77. Nicolini U, Lalatta F, Natacci F, Curcio C, Bui TH. 2004. The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: time for reconsideration. *Hum Reprod Update* 10: 541-8.

78. Ogilvie CM, Donaghue C, Fox SP, Docherty Z, Mann K. 2005a. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy using quantitative fluorescence-PCR (QF-PCR). J. Histochem. Cytochem. 53(3):285-8.

79. Ogilvie CM, Lashwood A, Chitty L, Waters JJ, Scriven PN, Flinter F. 2005b. The future of prenatal diagnosis: rapid testing or full karyotype? An audit of chromosome abnormalities and pregnancy outcomes for women referred for Down's Syndrome testing. BJOG 112 (10):1369-1375.

80. Orkin S.H. 1986. Reverse genetics and human disease. *Cell* 47:845-850.

81. Pangalos C.G., Talbot C.C.J., Lewis J.G., Adelsberger P.A., Petersen M.B., Serre J.L., Rethore M.O., deBlois M.C., Parent P., Schinzel A.A. 1992. DNA polymorphism analysis in families with recurrence offree trisomy 21. *Am J Hum Genet* 51:1015-1027.

82. Patau K, Smith D.W., Therman E. 1960. Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. *Lancet* 1:790-793.

83. Pellestor F., Quenesson 1, Coignet L., Girardet A., Andreo B., Lefort G., Charlieu J.P. 1996. FISH and PRlNS: A strategy for rapid chromosome screening: Application to the assessment of aneuploidy in human sperm. *Cytogenet Cell Genet* 72:34-36.

84. Penrose S.L. 1933. The relative effects of parental and maternal age in mongolism. *J Genet* 44: 17-28.

85. Pergament E., Chen P.X., Thangavelu M. & Fiddler M. 2000. The clinical application of interphase FISH in prenatal diagnosis. *Prenat. Diagn.* 20: 215-220.

86. Pertl B., Adinolfi M. 1998. Diagnosis of chromosomal aneuploidies using quantitative fluorescent PCR. Lo, Y. M. D. Methods in molecular medicine: clinical applications of PCR (16), 287-299. Totowa, New Jersey, Humana Press.

87. Pertl B., Kopp S., Kroisel P.M., Hausler M., Sherlock J., Winter R., Adinolfi M. 1997. Quantitative fluorescent PCR for the rapid prenatal detection of common aneuploidies and fetal sex. *Am J Obs Gyn* 177: 899-906.

88. Pertl B., Kopp S., Kroisel P.M., Tului L., Brambati B., Adinolfi M. 1999a. Rapid detection of chromosome aneuploidies by quantitative fluorescent PCR: First aplication on 247 chorionic villus samples. *J Med Genet* 36: 300-303.

89. Pertl B., Pieber D., Lercher-Hart1ieb A., Orescovic I., Haeusler M., Winter R., Kroisel P., Adinolfi M. 1999b. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy by quantitative fluorescent PCR on fetal samples from mothers at high risk for chromosome disorders. *Mol Hum Reprod* 5: 1176-1179.

90. Pertl B., Sekizawa A., Samura O., Orescovic I., Rahaim P.T., Bianchi B.W. 2000. Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. *Hum Genet* 106: 45-49.

91. Pertl B., Yau S.C., Sherlock J., Davies A.F., Mathew C.G., Adinolfi M. 1994. Rapid molecular method for prenatal detection of Down syndrome. *Lancet* 343: 1197-1198.

92. Pertl B., Weitgasser U., Kopp S., Kroisel P.M., Sherlock. J., Adinolfi M. 1996. Rapid detection of trisomy 21, 18 and sexing with quantitative fluorescent multiplex PCR. *Hum Genet* 98: 55-59.

93. Petersen M.B., Antonarakis S.E., Hassold T.J., Freeman S.B., Sherman S.L., Avramopoulos D., Mikkelsen M. 1993. Paternal non-disjunction in trisomy 21: an axcess of male patients. *Hum Mol Genet* 2: 1691-1695.

94. Petersen M.B., Frantzen M., Antonarakis S.E., Warren A.C., Van Broeckhoven C., Chakravarti A., Cox T.K., Lund C., Olsen B., Poulsen H., Sand A., Tommerup N., Mikkelsen M. 1992. Comparative study of microsatellite and cytogenetic markers for detecting the origin of nondisjoined chromosome 21 in Down syndrome. *Am J Hum Genet* 51(3): 516-525.

95. Petersen M.B., Karadima G., Samaritaki M., Avramopoulos D., Vassilopoulos D., Mikkelsen M. 2000. Association between presenilin-1 polymorphism and maternal meiosis II errors in Down syndrome. *Am J Med Genet* 93: 366-372.

*96.* Petersen M.B., Schinzel A.A., Binkert F., Hinkel G.K., Antonarakis S.E. 1991. Use of short sequence repeat DNA polymorphisms after PCR amplification to detect the parental origin of the additional chromosome 21 in Down syndrome. *Am J Hum Genet* 48:65-71.

97. Phillips O.P., Velagelati G.V.N., Emerson D.E., Tharapel A.T., Shulman L.P. 1997. Confirmation of fetal aneuploidy with primed *in situ* hybridization on amniotic fluid during selective fetal reduction. *Prenat Diagn* 17:586-587 .

98. Putzova M, Soldatova I, Pecnova L, Dvorakova L, Goetz P, Stejskal D. 2008. QF-PCR - based prenatal detection of common aneuploidies in the Czech population: five years of experience, European Journal of Human Genetics 51: 209-218.

99. Putzova M, Pecnova L, Dvorakova L, Soldatova I, Goetz P, Stejskal D. OmniPlex – a new QF-PCR assay for prenatal diagnosis of common aneuploidies based on evaluation of the heterozygosity of short tandem repeat loci in the Czech population. Prenatal Diagnosis, In press.

100. Ramsay C.N., Ellis P.M., Zealley H. 1991. Down's syndrome in the Lothian region

of Scotland - 1978 to 1989. *Biomed Pharmacother* 45(6): 267-272.

101. Reeder D. 2000. Established Technology/Emerging Techniques.

102. (http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/tech.htm)

103. Reeves R.H., Baxter L.L., Richtsmeier J.T. 2001. Too much of a good thing: mechanisms of gene action in Down syndrome. *Trends in Genetics* 17(2): 83-88.

104. Robson L., Smith A. 1995. Inter-observer discrepancy in scoring signals on interphase FISH with an X library probe illustrated an a case of 47,XXX. *Prenat Diagn* 15:1193-1196.

105. Rosch C., Steinbicker V., Kropf S. 2000. Down's syndrome: the effects of prenatal diagnosis and demographic factors in a region of the eastern part of Germany. *Eur J Epidemiol 16*(7): 627-632.

106. Sacchetti L, Calcagno G, Coto I, Tinto N, Vuttariello E, Salvatore F. 1999. Efficiency of two different nine-loci short tandem repeat systems for DNA typing purposes, Clin Chem. 45(2): 178-183.

107. Samura O., Pertl B., Sohda S., Johnson K.L., Sekizawa A., Falco V.M., Elmes R.S., Bianchi B. W. 2000. Female fetal cells in maternal blood: use of DNA polymorphisms to prove origin. *Hum Genet* 107:28-32.

108. Savage A.R., Petersen M.B., Pettay D., Taft L., Allran K., Freeman S.B., Karadima G., Avramopoulos D., Torfs C., Mikkelsen M., Hassold T.J., Shennan S.L. 1998. Elucidating the mechanisms of paternal non-disjunction of chromosome 21 in humans. *Hum Mol Genet* 7: 1221-1227 .

109. Sherlock J., Cirigliano V., Petrou M., Tutschek B., Adinolfi M. 1998. Assessment of Quantitative Fluoresent Multiplex PCR performed on single cells. *Annals Hum Gen* 62(1): 9-23.

110. Sherman S.L, Petersen M.B., Freeman S.B., Hersey J., Pettay D., Taft L., Frantzen M., Mikkelsen M., Hassold T.J. 1994. Non-disjunction of chromosome 21 in maternal meiosis I: evidence for a maternal age-dependent mechanism involving reduced recombination. *Hum Mol Genet* 3(9): 1529-1535.

111. Shinawi M, Cheung SW. 2008. The array CGH and its clinical applications. Drug Discov Today. Sep: 13(17-18):760-70

112. Schmidt W., Jenderny J., Hecher K., Hackelöer B.-J., Kerber S., Kochhan L., Held K.R. 2000. Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk. *Mol Hum Reprod* 6(9):855-860.

113. Schröck E., DuManoir S., Veldman T., Schoell B., Wienberg J., Ferguson-Smith M.A., Ning Y., Ledbetter D.H., Bar-Am 1., Soenksen D., Garini Y., Ried T. 1996. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273:494-497.

114. Sjogren B, Uddenberg N. 1990. Prenatal diagnosis for psychological reasons: comparison with other indications, advanced maternal age and known genetic risk. *Prenat Diagn* 10: 111-20

115. Sperling K., Pelz J., Wegner R.D., Dorries *A.,* Gruters A., Mikkelsen M. 1994. Significant increase in trisomy 21 in Berlin nine months after the Chernobyl reactor accident: temporal correlation or causal relation? *BMJ* 309(6948): 158-162.

116. Sperling K., Pelz J., Wegner R.D., Schulzke I., Struck E. 1991. Frequency of trisomy 21 in Germany before and after the Chernobyl accident. *Biomed Pharmacother* 45(6): 255-262.

117. Sršeň Š., Sršňová K. 1995. Základy klinickej genetiky (2. preprac. a rozšir. vyd.), Vydavatelstvo Osveta.

118. Stene J., Stene E., Mikkelsen M.1984. Risk for chromosome abnormality at amniocentesis following a child with a non-inherited chromosome aberration. A European Collaborative Study on Prenatal Diagnoses 1981. *Prenat.Diagn.* 4 Spec No:81-95.

119. Stoll C., Alembik Y., Dott B., Roth M.P. 1990. Epidemiology od Down syndrome in 118 265 consecutive births. *Am J Med Genet* 7: 79-83.

120. Strachan T. and Read A.P.1999. Human Molecular Genetics (2). BIOS Scientific Publishers Ltd.

121. Sullivan K.M., Mannucci A., Kimpton C.P., Gill P. 1993. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *BioTechniques* 15(4): 636-638, 640-641.

122. Tepperberg J., Pettenati M.J., Rao P.N., Lese C.M., Rita D., Wyandt H., Gersen S., White B. & Schoonmaker M.M. 2001. Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2-year multi-center retrospective study and review of the literature. *Prenat. Diagn.* 21: 293-301.

123. Thompson J.S., Thompsonová M.W. 1988. Klinická genetika (4.vyd.), Vydavatelstvo Osveta.

124. Thompson M. W., McInnes R.R., Willard H.F. 1991. Genetics in medicine. Thompson and Thompson. 5th edition (Chapter 9), 2. New York, WB Saunders Company.

125. Toth T., Findlay I., Papp C., Tóth-Pál E., Marton T., Nagy B., Quirke P., Papp Z. 1998. Prenatal detection of trisomy 21 and 18 from amniotic fluid by quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *J Med Genet* 35: 126-129.

126. Tutschek B., Sherlock J., Halder A., Delhanty J., Rodeck C., Adinolfi M. 1995. Isolation of fetal cells : from transcervical samples by micromanipulation: molecular confirmation of their fetal origin and diagnosis of fetal aneuploidy. *Prenat Diagn* 15:951-960. i

127. Uchida I.A. 1977. Matemal radiation and trisomy 21. in: Hook E.B., Porter I.A., eds. Population genetics: studies in humans. New York: Academics Press.

128. Uchida I.A., Freeman V.C. 1985. Trisomy 21 Down syndrome. Parental mosaicism. *Hum Genet* 70:246-248.

129. Valero R, Marfany G, Gil-Benso R, Ibáñez MA, López-Pajares I, Prieto F, Rullan G, Sarret E, Gonzàlez-Duarte R. 1999. Molecular characterisation of partial chromosome 21 aneuploidies by fluorescent PCR. J Med Genet. Sep: 36(9):694-9

130. Verma L., Macdonald F., Leedham P., McConachie M., Dhanjal S., Multén M. 1998. Rapid and simple prenatal DNA diagnosis od Down's syndrome. *Lancet* 352(4): 9-12.

131. Waardenburg P.J. 1932. Das menschliche Auge und seine Erbanlagen. The Hague: Nijhoff.

132. Walker G.T., Linn C.P., Nadeau J.G.1996. DNA detection by strand displacement amplification and fluorescence polarization with signal enhancement using a DNA binding protein. *Nucleic Acids Res,* 24: 348-353.

133. Wenstrom KD. 2003. Aneuploidy screening: the changing scene. *Obstet Gynecol* 101:840– 842

134. Winsor E.J.T., Silver M.P., Theve R., Wright M., Ward B.E. 1996. Maternal cell contamination in uncultured amniotic fluid. *Prenat Diagn* 16(1):49-54.

135. Wittwer C.T., Ririe K.M., Andrew R.V., David D.A., Gundry R.A., Balis U.J. 1997. The LightCycler™: A microvolume Multisample Fluorimetr with Rapid Temperature Control. *BioTechniques* 22: 176-181.

136. Yoon P.W., Freeman S.B., Sherman S.L., Taft L.F., Gu Y., Pettay D., Flanders W.D., Khoury M.J., Hassold T.J. 1996. Advanced matemal age and the risk of Down syndrome characterized by the meiotic stage of the chromosomal error: a population-based study. *Hum Genet* 58: 628-633.