

Univerzita Karlova v Praze

2. Lékařská fakulta

Ústav biologie a lékařské genetiky



Bakalářská práce

Vyšetření mikrolečných syndromů metodou FISH

Vypracovala:

Polejová Bronislava

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Eduard Kočárek, Ph.D.

Studijní obor:

Zdravotní laborant

Studijní program:

Specializace ve zdravotnictví

Poděkování :

Děkuji RNDr. Eduardovi Kočárkovi, Ph.D., z Fakultní nemocnice Motol v Praze z Ústavu biologie a lékařské genetiky, za odborné vedení bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Marcele Kosařové, Ph.D., za cenné rady při zpracování této bakalářské práce a MUDr. M. Kuklíkovi, CSc., za jeho pomoc při realizaci průzkumného šetření.

Analýzy v molekulárně-cytogenetické laboratoři ÚBLG UK 2.LF a FN Motol, jejichž výsledky tvoří převážnou část práce, byly podpořeny grantovým projektem Interní grantové agentury (IGA) Ministerstva zdravotnictví České republiky NR/9457-3.

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

V Praze dne 3.září 2008


.....

podpis

OBSAH

1. Seznam použitých zkratk a symbolů.....	6
2. Teoretický úvod.....	7
2.1 Stavba chromozomu.....	7
2.2 Karyotyp člověka.....	8
2.2.1 Chromozom X.....	10
2.2.2 Chromozom Y.....	11
2.2.3 Chromozom 15.....	12
2.2.4 Chromozom 22.....	12
2.3 Chromozomové aberace.....	13
2.3.1 Numerické aberace.....	14
2.3.2 Strukturní aberace.....	15
2.4 Mikrodeleční syndromy.....	16
2.4.1 Rozdělení mikrodelečních syndromů podle Seemanové.....	17
2.4.1.1 Terminální mikrodelece.....	17
2.4.1.2. Intersticiální mikrodelece.....	18
3. Metodické možnosti vyšetření mikrodelečních syndromů.....	21
3.1 Mikroskopické vyšetření.....	21
3.1.1 Mikroskop světelný.....	21
3.1.2 Mikroskop fluorescenční.....	22
3.1.3 Cytogenetická a molekulárně cytogenetická analýza chromozomů.....	24
3.1.4. Metoda HRT	25
3.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	25
3.3 CGH.....	26
3.4 Array CGH.....	27
3.5 MLPA.....	27
4. Cíl práce.....	30

5. Experimentální část (materiál a metodika)	31
5.1 Soubor pacientů s mikrolečnými syndromy.....	31
5.2 Používané metody.....	33
5.2.1 G- banding (GTG pruhování).....	33
5.2.2 Vyšetření karyotypu.....	34
5.2.3 FISH.....	41
5.2.4 Použité sondy pro FISH.....	51
6. Výsledky	52
6.1. Základní cytogenetické vyšetření.....	52
6.2 Výsledky molekulárně cytogenetické analýzy metodou FISH.....	57
6.3 Výsledky vyšetření mikrolece chromozomu 22q11.2 metodou FISH.....	61
6.4 Výsledky vyšetření mikrolece chromozomu 7q11.23 metodou FISH.....	66
6.5 Výsledky molekulárně cytogenetických vyšetření dalších mikrolečných Syndromů.....	66
6.6 Vyšetření familiárního výskytu mikroleceí.....	69
7. Diskuse	72
7.1 Metodické možnosti FISH.....	72
7.2 Výsledky základní cytogenetické analýzy.....	73
7.3 Molekulárně cytogenetické vyšetření mikrolečných syndromů.....	73
7.4 Záchyt delecí v procentech.....	73
7.5 Familiární výskyt mikrolece chromozomu 22q11 a 7q11.23.....	75
8. Závěr	76
9. Seznam použité literatury	78
10. Přílohy	82

1. Seznam použitých zkratk a symbolů

CCD	charged coupled device
CGH	comparative genomic hybridization
GL	genetická laboratoř
CNS	centrální nervový systém
GTG	G - pruhování
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
DGS	DiGeorgeův syndrom
DM	diabetes mellitus
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
FNM	fakultní nemocnice Motol
IQ	intelligent quocient
LOH	loss of heterozygosity
MAPH	multiplex amplifiable probe hybridization
PC	počítač
PCR	polymerase chain reaction
PHA	fytohemaglutinin
PI	propidium iodide
PK	periferní krev
RFLP	restriction fragment length polymorphism
SSR	simple sequence repeats
STRs	short tandem repeats
ÚBLG	Ústav biologie a lékařské genetiky
UV	ultrafialové záření
VNTRs	variable number of tandem repeats
VV	vrozená vada
VVV	vrozená vývojová vada
WAGR	Wilmsův tumor, aniridie, genitourinární abnormality, mentální retardace
WBS	Williamsův-Beurenův syndrom

2. Teoretický úvod

Mikrodeleční syndromy patří k nejčastějším syndromům způsobeným chromozomovými aberacemi. Většina z nich má autozomálně dominantní dědičnost. Podkladem mikrodelečních syndromů jsou většinou tzv. submikroskopické neboli kryptické delece chromozomů. Výzkumy v posledních dvou desetiletích ukázaly, že tyto aberace jsou daleko častější, než se původně předpokládalo. Výskyt každého mikrodelečního syndromu se odhaduje zhruba na 1/10000 novorozenců. Mikrodelece mohou být malého rozsahu, které nejsou zjistitelné běžným cytogenetickým vyšetřením, proto se zpravidla užívá molekulárně biologických nebo molekulárně cytogenetických metod, např. FISH. Diagnostiku mikrodelečních syndromů komplikuje skutečnost, že u většiny z nich pozorujeme výraznou variabilitu fenotypových projevů. Naopak u některých pacientů s typickým fenotypem není mikrodelece chromozomů molekulárně cytogeneticky prokazatelná.

2.1 Stavba chromozomu

Chromozom se mikroskopicky jeví jako poutlicový útvar, jehož hlavními složkami jsou molekuly DNA a histonů. Jeho základní stavební jednotkou je nukleosom tvořený osmi histony. Každý histonový oktamer je obtočen vláknem DNA o délce 146 párů bazí (1).

Chromozomy jsou viditelné pouze v dělicích se buňkách, nejlépe identifikovatelné jsou v metafázi mitózy. V tomto případě můžeme vidět pod světelným mikroskopem dvouchromatidový chromozom. Každá chromatida je složena z dvou ramen, mezi kterými je ztenčená oblast nazývána centromera. Jde o místo, kde je chromozom připojen na dělicí vřetenko a má význam zejména při separaci chromatid do dceřiných buněk. Centromera dělí chromozom na krátké raménko značené p a dlouhé raménko značené q. Teloméry nazýváme oba konce ramének chromozomu.

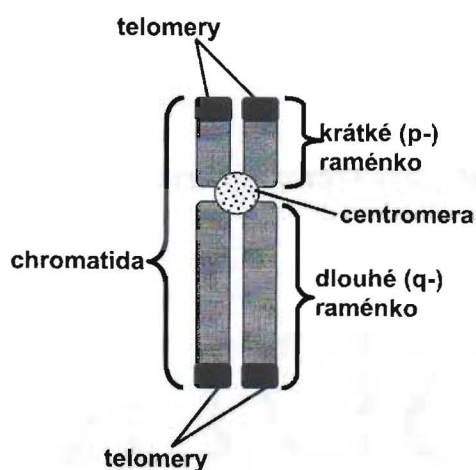
Podle vzájemného poměru délky p- a q-ramének rozlišujeme chromozomy:

- telocentrické, které mají pouze jedno raménko;
- metacentrické, které mají stejně dlouhá raménka;
- submetacentrické, u nichž je p-raménko nápadně kratší;
- akrocentrické, u nichž je p-raménko výrazně zkráceno (2).

Na některých raménkách chromozomů se vyskytují tzv. satelity. Jde o oblasti obsahující sekundární konstriktce, která odděluje od jejich krátkého ramena malý segment. V lidském karyotypu mají satelity akrocentrické chromozomy č.13, 14, 15, 21, 22.

Hlavní biologickou funkcí chromozomů je přenos dědičného materiálu během vývoje jednotlivce i mezi následujícími generacemi.

Obr. 1 – Schéma dvouchromatidového, submetacentrického chromozomu (2)



2.2 Karyotyp člověka

Karyotyp je soubor všech chromozomů v buněčném jádře. Lze jej stanovit v období metafáze mitózy za pomoci speciálního barvení. Karyotyp se nejčastěji vyšetřuje u lymfocytů periferní nebo pupečnickové krve, kožních fibroblastů, amniocytů plodu, buněk choriových klků a také nádorových buněk.

Člověk má 23 párů chromozomů. Z toho patří 22 chromozomů mezi autosomy tvořící homologní páry a zbylý 1 pár tvořený pohlavními chromozomy

neboli gonozomy. U muže je tento pár heterologní, tj. tvořený morfologicky odlišnými chromozomy X a Y.

Podle mezinárodní cytogenetické nomenklatury popisujeme karyotyp muže 46,XY a karyotyp ženy 46,XX (2).

Chromozomy se dělí do několika skupin dle velikosti a morfologie (2):

Skupina A zahrnuje velké a metacentrické chromozomy 1, 2, 3

Skupina B zahrnuje velké a submetacentrické chromozomy 4, 5

Skupina C zahrnuje střední a submetacentrické chromozomy 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, X

Skupina D zahrnuje střední a akrocentrické chromozomy 13, 14, 15

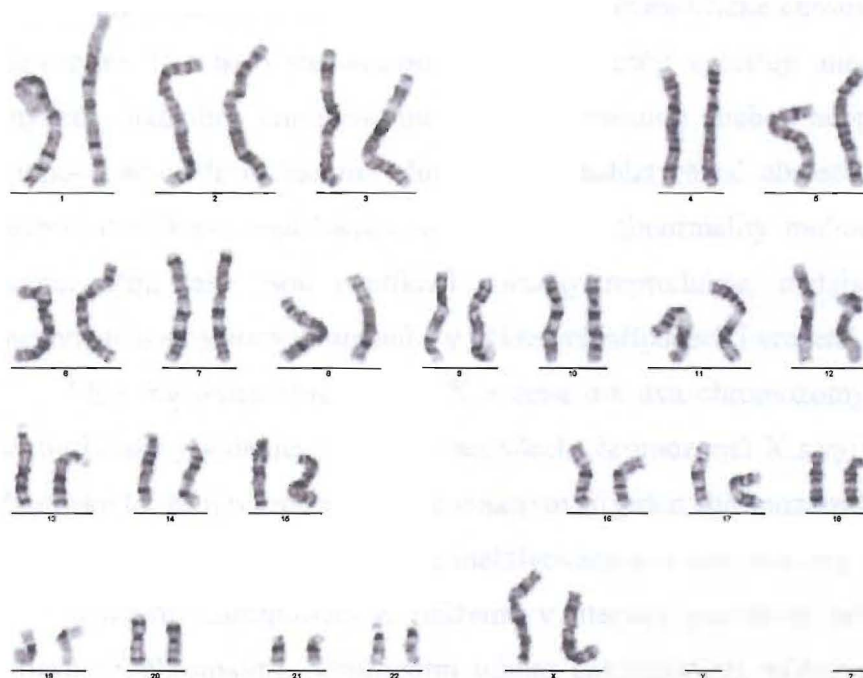
Skupina E zahrnuje malé a submetacentrické chromozomy 16, 17, 18

Skupina F zahrnuje malé a metacentrické chromozomy 19, 20

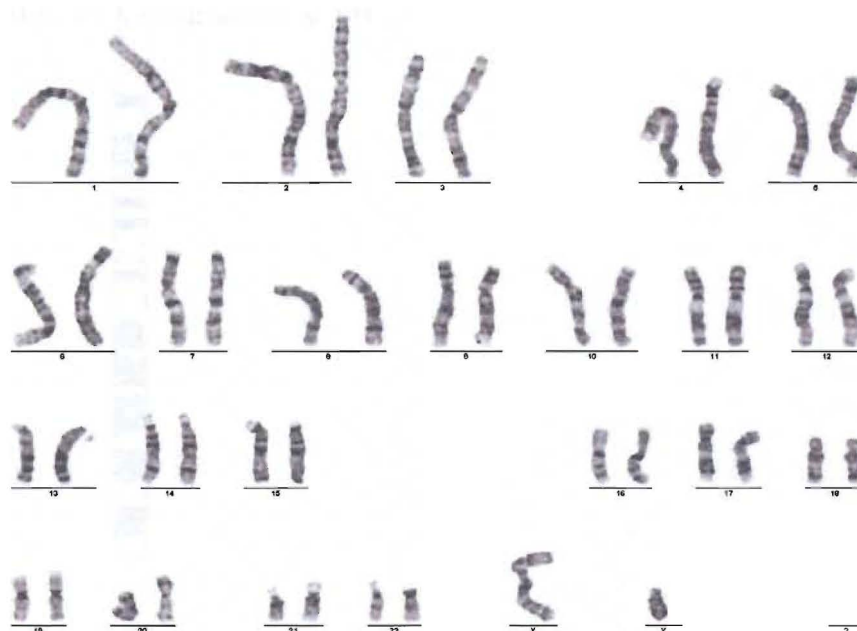
Skupina G zahrnuje malé a akrocentrické chromozomy 21, 22, Y

Následující text popisuje některé vybrané chromozomy v lidském karyotypu, jejichž aberace nacházíme při cytogenetických a molekulárněcytogenetických vyšetřeních nejčastěji.

Obr. 2 – Karyotyp zdravé ženy 46,XX (vlastní zdroj)



Obr. 3 – Karyotyp zdravého muže 46,XY (vlastní zdroj)



2.2.1. Chromozom X

Chromozom X řadíme mezi větší submetacentrické chromozomy lidského karyotypu. U tohoto chromozomu X se nejčastěji vyšetřují aneuploidie, což je chybění jednoho chromozomu (tj. monozomie) nebo naopak přítomnost nadpočetného chromozomu. Můžeme zde nalézt různé aberace jako například delece, duplikace, translokace, inverze. Tyto abnormality mohou způsobit řadu onemocnění, jako jsou například poruchy reprodukce, metabolické poruchy, onemocnění smyslových orgánů a v některých případech i vrozené malformace.

Muž má jeden chromozom X a žena má dva chromozomy X. V pozdním stádiu blastocyty dochází k inaktivaci všech chromozomů X s výjimkou jediného. Znamená to, že u normální ženy je inaktivován jeden chromozom X, zatímco např. u ženy s karyotypem 47,XXX jsou inaktivovány dva chromozomy X.

Inaktivní chromozom X můžeme v interfázi pozorovat jako tzv. Barrovo tělísko (X-chromatin). Vyšetřením tohoto chromozomu můžeme diagnostikovat pohlaví plodu či chromozomální aberace chromozomu X (1, 3).

Tento chromozom obsahuje např. geny ALAS2, AR, COL4A5, DMD, EDA, F8, F9, FMR1, G6PD, GJB1, GLA, NDP, NR0B1, OTC, SHOX.

Obr. 4 - Chromozom X (4)



2.2.2. Chromozom Y

Chromozom Y řadíme mezi malé akrocentrické chromozomy lidského karyotypu. Na rozdíl od ostatních chromozomů obsahuje poměrně málo genů, z nichž většina se uplatňuje při vývinu mužských pohlavních orgánů (např. gen SRY) a při řízení spermatogeneze. Chromozomu Y se také týkají aneuploidie. Jde o abnormální počet chromozomů způsobený přítomností jednoho, velmi vzácně více nadpočetných chromozomů – jde o tzv. syndrom supermale (viz též subkapitolu 2.3). Důvodem bývá nondisjunkční porucha při vývoji spermií. Výjimečné nejsou ani strukturní aberace chromozomu Y, zejména delece, dicentrické chromozomy, popř. vzájemné translokace mezi chromozomem X a Y (vzniklé při nreciprokém crossing-overu při spermatogenezi). Strukturní aberace chromozomu Y vyvolávají těžké poruchy reprodukce až úplnou sterilitu (zejména pokud dojde k mikrodeleci regionu SRY). Vzácností nejsou ani poruchy vývoje genitálu (zejména u dicentrických chromozomů v mozaice s karyotypem 45,X). Chromozom Y se dědí pouze z otce na syna (4).

Tento chromozom obsahuje např. geny AMELY, ANT3Y, AZF1, AZF2, BPY2, DAZ, IL3RAY, PRKY, RMB1, RBM2, SRY, TDF, TSPY, UTY, ZFY, ASMTY

Obr. 5 – Chromozom Y (4)



2.2.3. Chromozom 15

Jde o středně velký akrocentrický chromozom, který obsahuje asi 1000 genů. K nejvýznamnějším patří např. geny IVD, UBE3A, SNRPN, PML, FAH, FBN1, HEXA, OCA2, RAD51, STRC. Strukturní změny, eventuálně bodové mutace genů na tomto chromozomu jsou spojené s různými závažnými a poměrně častými syndromy, jako je např. Prader-Willi syndrom, Angelmanův syndrom, Marfanův syndrom.

Obr. 6 – Chromozom 15 (4)



2.2.4. Chromozom 22

Jde o malý akrocentrický chromozom, který obsahuje více jak 800 genů. Patří k nim např. TBX1, COMT, NF2, EP300, NEFH, CHEK2, SOX10, SGLT1. Submikroskopické změny na tomto chromozomu jsou spojené s onemocněním,

jako je např. DiGeorgeův syndrom nebo cat-eye syndrom. Translokaci chromozomu 22 s chromozomem 9 nacházíme u chronické myeloidní leukémie.

Obr. 7 – Chromozom 22 (4)



2.3 Chromozomové aberace

Jde o změny, které většinou přímo či nepřímo ovlivňují větší počet genů. V mnoha případech mohou způsobit těžká postižení, k nimž patří mentální či psychomotorická retardace, poruchy vývoje CNS, různé skeletální anomálie, růstová retardace, vrozené srdeční vady, poruchy reprodukce či úplná sterilita. Mnohé aberace de novo mají kauzální význam při vzniku nádorů nebo jsou následkem abnormální proliferace při jejich progresi.

K postnatální diagnostice chromozomálních aberací se nejčastěji používá kultivace lymfocytů odebraných z periferní venózní krve.

Chromozomové aberace lze zjistit i prenatálně. K těmto vyšetřením patří:

- biopsie choriových klků – jde o odběr choriových klků, která se provádí mezi 10.–12. týdnem těhotenství.
- amniocentéza – jde o odběr plodové vody, který se provádí mezi 16. – 18. týdnem těhotenství.
- kordocentéza – jde o odběr fetální krve z pupečnickové žíly, který se provádí od 20. týdne těhotenství. (5)

2.3.1 Numerické aberace

Numerické aberace definujeme jako změny počtu chromozomů. Většinou jde o následek tzv. nondisjunkcí neboli chybných rozhodů chromozomů do dceřiných buněk. K těmto poruchám dochází zejména během meiotického dělení. Následkem je chybění či zmnožení chromozomů v gametách, z nichž po oplodnění vznikají zygoty, popř. embrya s abnormálním karyotypem. Tyto aberace ve většině případů bývají neslučitelné se životem již v prenatalním období. Proto nacházíme nejvíce numerických aberací u spontánně potracených plodů v prvním trimestru těhotenství.

Spontánním potratem končí také tetraploidie a triploidie, které však nevznikají zpravidla následkem nondisjunkce, ale fúzí většího počtu gamet (příkladem je dispermie vedoucí k triploidii) nebo splynutím dvou blastomer po prvním mitotickém dělení zygoty (výsledkem je tetraploidie). Obě jmenované aberace jsou poměrně vzácně. Častější jsou trizomie nebo monozomie, avšak i u nich přežívá jen malé procento plodů (2).

Mezi numerické aberace autozomů, které umožňují postnatální přežití, patří:

- Downův syndrom

Jde o trizomii 21. chromozomu. Projevuje se typickou orofaciální stigmatizací, zpomaleným fyzickým vývojem a mentální retardací. Výskyt 1: 700 novorozenců (6).

- Edwardsův syndrom

Jde o trizomii 18. chromozomu. Projevuje se malformacemi vnitřních orgánů a zaostáváním růstu plodu, častá je i intrauterinní smrt. Postnatální prognóza je špatná. Většina dětí umírá v novorozeneckém věku, asi 12 % přežívá kojenecký věk. Dožití věku vyššího než 5 let je ojedinělé (zpravidla se jedná o mozaiky). Výskyt 1: 7 500 novorozenců (7).

- Patauův syndrom

Jde o trizomii 13. chromozomu. Projevuje se VVV vnitřních orgánů. Těhotenství často končí samovolným potratem nebo předčasným porodem. Více než 90 % dětí umírá do jednoho roku. Výskyt 1: 4 – 10 000 novorozenců. (7).

- Turnerův syndrom

Jde o monozomii chromozomu X (často v mozaice s normálními buňkami). Vzniká jen u dívek a projevuje se těžkými poruchami fertility, anebo častěji úplnou sterilitou. Výskyt 1 : 4 000 dívek. (7).

- Klinefelterův syndrom

U tohoto syndromu nacházíme karyotyp 47, XXY, vzácněji 48, XXXY, 48, XXYY, 49, XXXXY. Projevuje se vysokou eunuchoidní postavou, poruchou růstu vousů, ženskou distribucí podkožního tuku, hypoplasií testes, gynekomastií, sterilitou. U většiny pacientů zjišťujeme azoospermii. Výskyt 1 : 500 – 1 000 chlapců (7).

- Superfemale

Je podmíněn karyotypem 47, XXX. Jedná se o trizomii X chromozomu. Vzniká jen u dívek, je zde možná mírná mentální retardace (poruchy učení), snížená plodnost, která se většinou projevuje častějšími spontánními potraty. Výskyt 1 : 1 000 žen (7).

- Supermale

Je podmíněn karyotypem 47, XYY. Postižení jsou vždy mužského pohlaví.

Pacienti mají normální mužský fenotyp. Někteří z nich mají poruchu reprodukce, vzácněji sterilitu. Výskyt 1: 1 000 chlapců (7).

2.3.2 Strukturní aberace

Strukturní aberace představují změny struktury chromozomů. Některé strukturní aberace souvisí s numerickými aberacemi, proto karyotyp pacienta nemusí obsahovat normální počet chromozomů. Jejich obecný populační výskyt je poměrně vysoký – udává se kolem 1/300-400 novorozenců. (2).

Strukturní chromozomové aberace vznikají např. při reparaci chromozomových zlomů nebo následkem nerovnoměrného crossing overu. Interchromozomové přestavby zahrnují dva a více chromozomů, intrachromozomové aberace naopak zasahují jediný chromozom.

Strukturní změny můžeme dále dělit podle toho, zda bylo nebo nebylo změněno množství genetického materiálu. Rozlišujeme proto:

- Balancované neboli vyvážené přestavby, kdy je zpravidla normální fenotyp. Mezi balancované aberace patří zejména inverze a reciproké translokace.
- Nebalancované neboli nevyvážené přestavby spojené s přítomností nadbytečného chromozomového materiálu. Příkladem jsou nebalancované translokace, které lze charakterizovat jako parciální trizomie (při přítomnosti nadpočetného úseku chromozomu), anebo parciální monozomie (kdy určitý úsek chybí). Většinou mají abnormální fenotyp. K nejčastějším nebalancovaným strukturním aberacím patří mikroleční syndromy. (2, 7).

2.4 Mikroleční syndromy

Mikroleční syndromy vznikají delecí malých chromozomálních úseků. Tyto delece mohou postihnout terminální, ale častěji intersticiální úseky chromozomu. Většinu těchto delecí lze vyšetřit pomocí metody FISH (8).

Mikroleční syndromy patří k nejčastějším syndromům způsobeným chromozomovými aberacemi. Jejich příčinou jsou kryptické delece chromozomů. Většina mikrolečních syndromů má autozomálně dominantní dědičnost. Výjimkou jsou mikrolece chromozomu X, u nichž můžeme pozorovat gonozomálně recesivní dědičnost.

U hůře detekovaných delecí je nutné použít jiných molekulárně genetických metod. Při diagnostice mikrolečních syndromů není možné, vyloučit mikrolece jen po negativním výsledku metodou FISH. V některých případech se doporučuje vyšetřit uniparentální disomie např. u Prader-Williho a Angelmanova syndromu (2, 8).

2.4.1 Rozdělení mikrodelečních syndromů podle Seemanové (8).

2.4.1.1. Terminální mikrodelece

Do této skupiny patří:

1. Slavotínkův syndrom, resp. syndrom monozomie 1p36 (OMIM 607872)

Jedná se o mikrodeleci 1p36. Projevuje se mikrocefalií, anomálií srdce, rozštěpem obličeje, mentální retardací. V dospělosti se může rozvinout kardiomyopatie (8).

2. Wolfův-Hirschhornův syndrom (OMIM 194190)

Jedná se o mikrodeleci 4p15-p16. Projevuje se těžkou mentální retardací. Typická je kraniofaciální dysmorfie (hypertelorismus, hruškovitý nos, kapří ústa), prenatální a postnatální růstová retardace, neprospívání a další přidružené vývojové vady, zejména srdeční a urogenitálního traktu.(2, 8).

3. Cri-du Chat (OMIM 123450)

Jedná se o delecii 5p15-p16. U kojenců a novorozenců se projevuje anomálií hrtanu, která způsobuje typický pláč podobný kočičímu mňoukání, hypertelorismus, možné srdeční vady, možný hemangiom na víčkách, hypotonie a hypertrofie novorozence. V dospělosti pozorujeme trojúhelníkovou tvář, IQ malé. Některé rozsáhlejší delece lze pozorovat již mikroskopicky, a proto neujdou pozornosti při běžné cytogenetické prenatální diagnostice (2, 8).

4. Jacobsenův syndrom (OMIM 147791)

Jedná se o mikrodeleci 11q23. Projevuje se srdeční anomálií, mírnou retardací, hypertelorismem, vkleslým kořenem nosu, brachydaktylií. U děvčat je možná další reprodukce (8).

5. Miller-Diekerův syndrom (OMIM 247200)

Jedná se o mikrodeleci 17p13.3. Projevuje se růstovou retardací, kterou lze ve 2. – 3. trimestru zachytit při ultrazvukovém vyšetření. Dále se u tohoto syndromu

vyskytuje mikrocefalie, převislý horní ret, těžká mentální retardace a anomálie mozku (lisencefalie). Závažné poruchy způsobují úmrtnost v nízkém věku (8).

2.4.1.2. Intersticiální mikrolece

Mohou být důsledkem translokace, inverze či jiné chromozomální aberace u rodičů. Nejčastěji však vznikají následkem nerovnoměrného crossing-overu. Patří k nim zejména:

1. Williams-Beurenův syndrom (OMIM 194050)

Onemocnění je způsobené delecí chromozomu 7q11.23, kde se nachází gen pro elastin (ELN) a několik dalších genů, z nichž některé (např. LIM-kináza 1) se uplatňuje při vývoji nervového systému. Rozsah této deletované oblasti se pohybuje okolo 1,5Mb. Typickým projevem bývá faciální dysmorfie – tzv. „Elfin face“ (obličej připomínající skřítku) – výrazné suprapalpebrální valy, široké tváře, makrostomie, silné rty. K ostatním symptomům patří abnormální dentice, hypertelorismus, hyperkalcémie, malá postava, hrubý hlas, kostní anomálie a srdeční anomálie (nejčastěji supraavlulární stenóza aorty). Některé srdeční vady se dají chirurgicky odstranit. U pacientů se rozvíjí růstová a mentální retardace. Děti s Williamsovým syndromem potřebují zvýšenou zdravotní péči a speciální vzdělávání často až do období adolescence. Výskyt 1 : 15 – 20 000 (8, 9).

2. Praderův-Williho syndrom (OMIM 176270)

Jde o paternální mikrolececi 15q12 (resp. 15q11 – q13) nebo bodovou mutaci genů v této oblasti. Projevuje se zde imprintingový fenomén, jehož podstatou je rozdílná modifikace genů v závislosti na rodičovském původu. Nejčastějším projevem tohoto syndromu bývá faciální dysmorfie, hypogonadismus, růstová retardace v malém věku a hypotonie. Od jednoho roku výše se rozvíjí poruchy příjmu potravy, zejména hyperfagie vedoucí k monstrózní obezitě. Časté jsou poruchy chování, ve vyšším věku se objevuje DM a kardiomyopatie. Výskyt 1 : 10 000 (8).

3. Angelmanův syndrom (OMIM 105830)

Tento syndrom je způsoben maternální mikrodelecí 15q12, resp. 15q11 – q13. Stejně jako u výše zmíněného Praderova-Williho syndromu zde pozorujeme imprintingový fenomén. Mezi projevy Angelmanova syndromu patří ataxie při chůzi, epileptické záchvaty, na magnetické rezonanci bývá nález nespecifické demyelinizace. Psychomotorický vývoj je opožděn, pacient nemluví, jen vydává zvuky. K dalším projevům patří těžká mentální retardace, hypotonie, třesy, faciální dysmorfismus, neadekvátní smích. Prognóza je nepříznivá, neboť výchova a vzdělání pacientů jsou prakticky nemožné. Výskyt 1 : 20 000 (8, 10).

4. Smithův-Magenisův syndrom (OMIM 182290)

Tento syndrom je způsoben mikrodelecí 17p11.2. Projevem bývá nejčastěji špatná porodní adaptace, růstová a mentální retardace, porucha spánku a chování, ponocování, autoagresivita, lehká zraková vada, která se s postupem věku zhoršuje, dále brachycefalie, oploštělá tvář a deprese kořene nosu. Prognóza je nepříznivá (8, 11).

5. DiGeorgeův syndrom (OMIM 188400)

Jedná se o mikrodeleci 22q11.2. Nejčastějším projevem jsou vrozené srdeční vady (např. Fallotova tetralogie, truncus arteriosus communis, defekt síňového septa a další). K dalším symptomům patří snížená hladina ionizovaného vápníku v krvi (hypokalcémie), aplasie thymu, hypoplasie až úplná aplasie příštítných tělísek, funkční abnormality T- lymfocytů. U mnoha pacientů pozorujeme rozštěp patra a abnormální obličejové rysy, zejména antimongoloidní směr očních štěrbin, níže nasedající dysplastický ušní boltec, hypertelorismus a mikromandibula. Prognóza závisí na stupni srdeční vady a retardace. Výskyt 1 : 4000 novorozenců.

Tento syndrom řadíme do asociace CATCH 22, nověji označované jako syndrom mikrodelece chromozomu 22. Akronym „CATCH” shrnuje názvy fenotypových projevů, jimž jsou srdeční defekty (cardiac defects), abnormální obličejové rysy (abnormal face), aplasie thymu (thymic aplasia), rozštěp patra (cleft palate) a hypokalcémie (hypocalcemia). Rozsah a klinická závažnost jednotlivých fenotypových projevů je však velmi variabilní (8, 12, 21).

Od DiGeorgeova syndromu se po klinické stránce odlišuje několik dalších syndromů, které jsou asociovány s mikrodeleci chromozomu 22q11, avšak mají do

jisté míry odlišný fenotyp. Příkladem je syndrom Sedláčkové, jenž má (ve srovnání s DiGeorgeovým syndromem) lepší prognózu. U pacientů se mohou vyskytnout srdeční vady, palatoschisis, dlouhý a široký nos. Řeč u tohoto syndromu bývá huhňavá, dále se projevuje mírnou růstovou a mentální retardací. V pubertě a v dospělosti se velmi často rozvíjejí psychotické poruchy (8).

Daleko vzácnější je duplikace 22q11.2, která způsobuje vznik tzv. syndromu cat-eye neboli syndromu kočičího oka (8, 12, 21).

6. Rubinsteinův-Taybiho syndrom (OMIM 180849)

Jedná se o delecii 16p13.3, kterou však molekulárně cytogeneticky zjišťujeme jen asi u 10 – 20% pacientů. Projevem bývají již od narození široké distální falangi, antimongoloidní rysy, horší poporodní adaptace. Povaha a rozsah mentální retardace u těchto pacientů jsou podobné jako u pacientů s Downovým syndromem (8).

7. Alagilleův syndrom (OMIM 118450)

Jde o mikrolecii chromozomu 20p11-p12. Mezi projevy tohoto syndromu patří aplazie, hypoplazie nebo stenóza intrahepatálních žlučových cest, stenóza plicní aorty, široký nos a hypercholesterolémie (8).

8. Bloch-Sulzbergerova incontinentia pigmenti (OMIM 308300)

Jedná se o mikrolecii Xq28. Mezi projevy patří kožní defekty po porodu. Některé z nichž se hojí, jiné na určitých místech zůstávají v podobě ložisek a pigmentace kůže, která připomíná sežehnutí plamenem (8).

9. Syndrom WAGR (OMIM 194072)

Jedná se o delecii chromozomu 11p13. Projevem je soubor postižení, jejichž pojmenování shrnuje akronym WAGR: Wilmsův tumor (nefroblastom), Aniridie, Genitourinární abnormality a Retardace (1, 13).

3. Metodické možnosti vyšetření mikrolečných syndromů

3.1. Mikroskopické vyšetření

K vyšetření chromozomů se nejčastěji používají mikroskopy světelné a fluorescenční. Klasický světelný mikroskop je na rozdíl od fluorescenčního jednodušší a nevyužívá UV výbojku ani řadu excitačních filtrů. Protože při používání fluorescenčního mikroskopu dochází k emisi UV záření, je nutno chránit náš zrak přídatnými ochrannými filtry, které světelné mikroskopy nemají (1, 2).

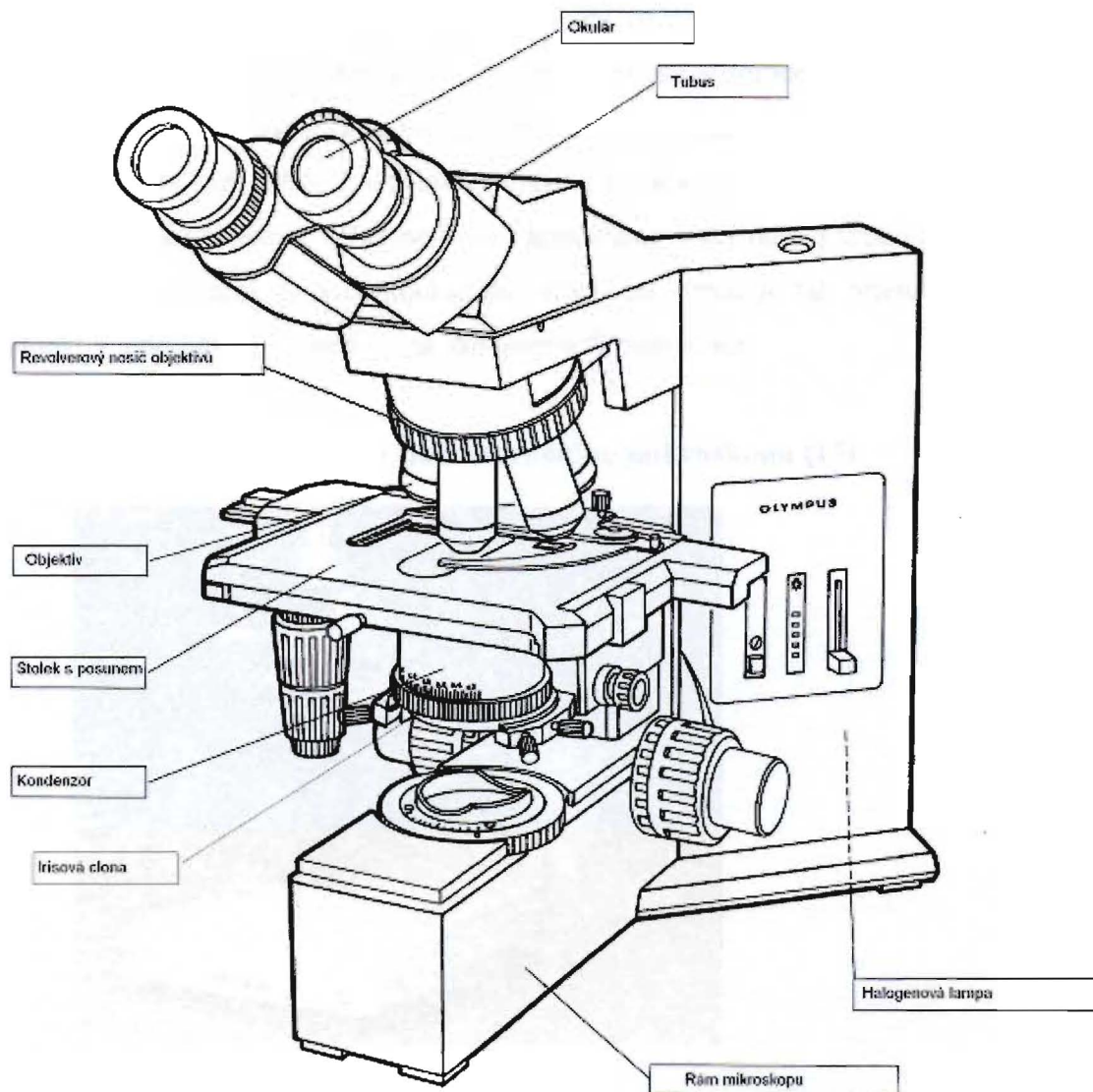
3.1.1. Mikroskop světelný

Světelný mikroskop využívá světelných paprsků, které umožňují pozorování obrazu určitého předmětu v okuláru. Další součástí optické soustavy světelného mikroskopu je objektiv, který vytváří zvětšený, skutečný a převrácený obraz zkoumaného předmětu.

Do optické soustavy patří také kondenzor, který zajišťuje maximální osvětlení zkoumaného předmětu. Zdrojem světla je zpravidla nízkovoltová žárovka umístěná ve stativu. Stativ je mechanickým zařízením mikroskopu a slouží k udržení jeho stability. Mezi mechanické zařízení patří také tubus, jímž je nastavena poloha objektivu a okuláru. Pomocí zaostřovacích šroubů (viz dále) lze polohu tubusu měnit. Tubus může být jednoduchý s jedním okulárem (u tzv. monokulárního mikroskopu) anebo opatřený binokulární hlavicí pro dva okuláry (u tzv. binokulárního mikroskopu).

Další mechanickou součástí světelného mikroskopu je stolek se svorkami nutný k přichycení zkoumaného objektu (nejčastěji podložního sklíčka se zkoumaným objektem) a dále šroub hrubého zaostření a šroub jemného zaostření. Oba šrouby slouží k posunu stolku s preparátem. Mikroskop je dále vybaven tzv. revolverovým nosičem objektivů umožňující jejich výměnu (2).

Obr. 8 – Schéma optického mikroskopu (14)



3.1.2. Mikroskop fluorescenční

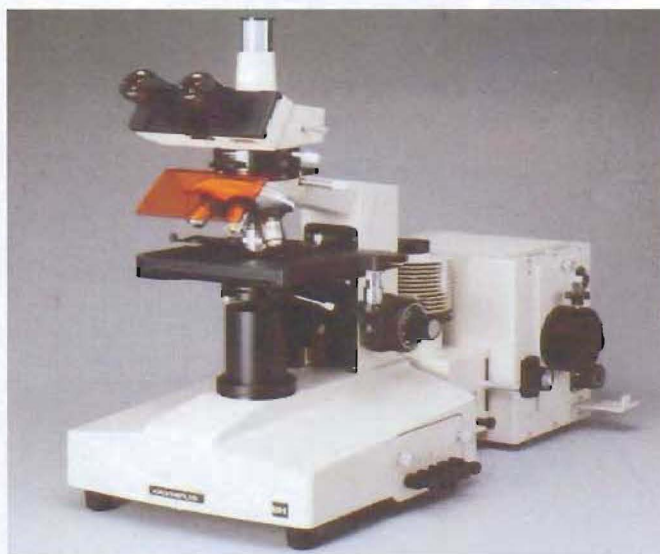
U fluorescenčního mikroskopu se využívá ultrafialových paprsků nejčastěji z rtuťových výbojek či elektrických obloukových lamp.

Fluorescence může být primární, kdy světlo vycházející ze zkoumaného objektu vzniká fluorescencí z přítomných přírodních látek a za sekundární fluorescenci lze považovat světlo vycházející z objektu obarveného fluorescenčním barvivem. V genetické laboratoři se nejčastěji používají tyto fluorochromy: DAPI, PI, ethidium bromid, chinakrin (2).

Nevýhodou fluorescenčního mikroskopu je tzv. photobleaching, což znamená, že fluorescenční barvivo je pod mikroskopem ozářeno ultrafialovým zářením, při kterém dochází k jeho rozkladu a ke ztrátě schopnosti absorpce a emise.

Mezi fluorescenční mikroskopy patří tzv. transmisní fluorescenční mikroskop, u kterého prochází světlo excitačním filtrem a na zkoumaný objekt přichází zespoda. U tohoto mikroskopu se užívá zástinový kondenzor, který odráží světlo tak, že světlo dopadá na preparát z boku. Procházející excitační světlo je tak orientováno mimo objektiv a do objektivu se dostane emitovaná fluorescence.

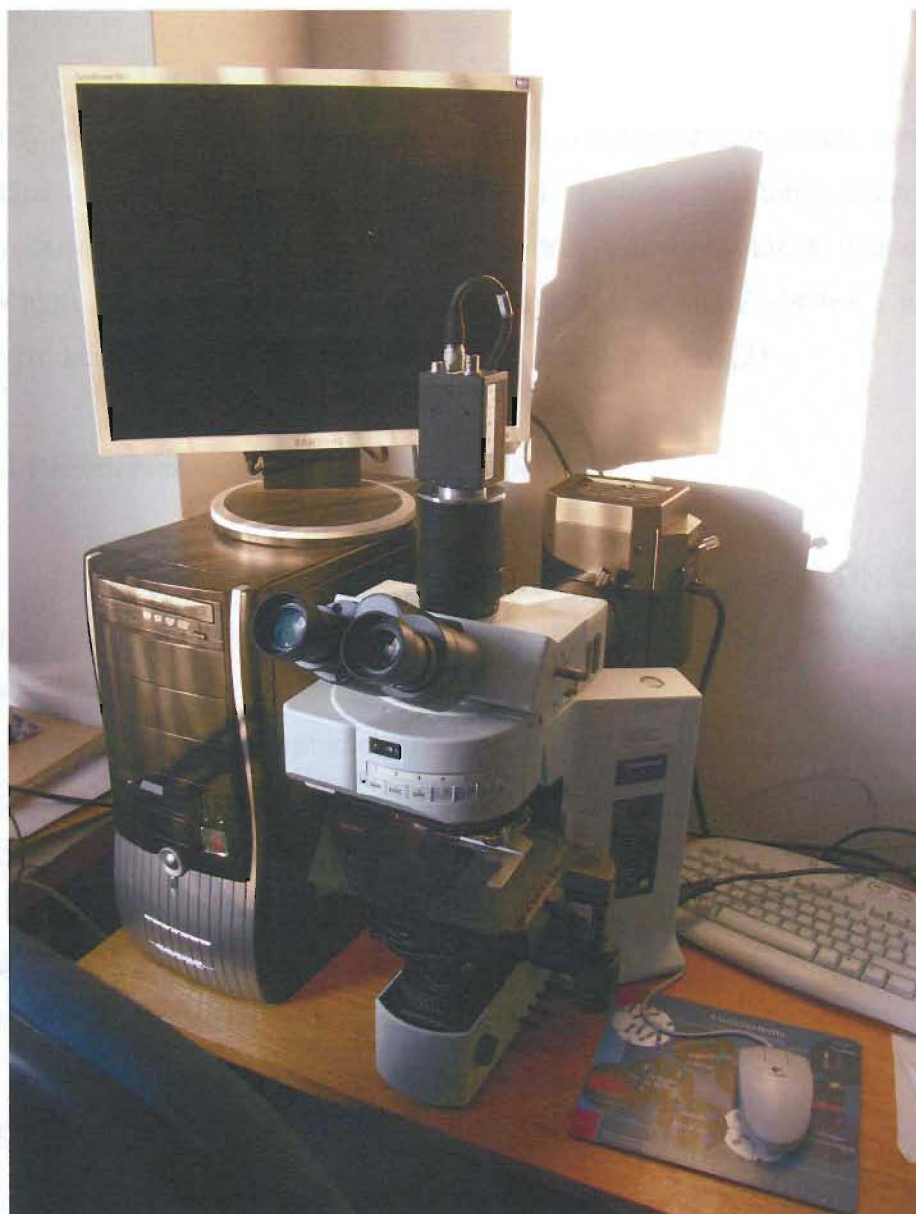
Obr. 9 – Foto transmisního fluorescenčního mikroskopu (15)



Dalším typem fluorescenčním mikroskopem je tzv. epifluorescenční mikroskop.

U tohoto mikroskopu prochází excitační světlo objektivem, dopadá na preparát svrchu a emisní světlo se vrací zpět do objektivu. Tento mikroskop využívá tzv. *dichroické zrcadlo*, které odráží excitační světlo do objektivu a propouští emisní světlo do okuláru. To propouští a odráží světlo podle toho, jakou má vlnovou délku. Vhodná kombinace dichroického zrcadla, excitačního a emisního filtru pro použitý druh fluorochromu se do epifluorescenčního mikroskopu se vkládá pohromadě jako tzv. *kostka*, kterou je možné vyměňovat podle potřeby. Epifluorescenční typ mikroskopu je v současnosti více oblíbený než transmisní typ.

Obr. 10 – Foto epifluorescenčního mikroskopu Olympus BX51, který jsem používala při své práci (foto poskytl Dr. Kočárek)



3.1.3. Cytogenetická a molekulárně cytogenetická analýza chromozomů

Základní cytogenetickým vyšetřovacím postupem je kultivace buněk a následná vizualizace chromozomů metodou G-pruhování (tj. působením trypsinu a následným barvením Giemsou). Molekulárně cytogenetické metody jsou založené na použití specifických fluorescenčně značených DNA sond, pomocí kterých můžeme detekovat početní i strukturní odchylky chromozomů (1). Bližší popis těchto metod je uveden v experimentální části mé práce.

3.1.4. Metoda HRT

Jde o kultivační metodu, která slouží k analýze chromozomů v prometafázi (tedy v přechodu mezi profází a metafází). Závěrečné zpracování chromozomů je stejné jako při G-pruhování (viz 3.1.3). Metoda umožňuje analyzovat méně kondenzované chromozomy s větším počtem pruhů, na nichž máme větší šanci zachytit dalece malého rozsahu. Hodnocení je však velmi obtížné a u diagnostiky mikrolečných syndromů má jen velmi malou výtěžnost. (2)

3.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Jde o metodu, kde dochází ke zmnožení specifických úseků DNA. Namnožené úseky pak přímo zpracováváme (např. kapilární elektroforézou) nebo využíváme pro další analýzy, např. RFLP.

PCR spočívá v replikaci DNA *in vitro*. Je založena na extenzi primerů a geometrické amplifikaci molekul DNA za cyklického opakování tří kroků lišících se pouze teplotními podmínkami. (2)

Základní cyklus PCR se skládá se ze 3 kroků s rozdílnými teplotami. Tento cyklus se zpravidla 20x – 30x opakuje.

Průběh jednoho cyklu :

1. Denaturace DNA (více jak 90 °C): oddělení vláken dvojšroubovice DNA teplotní denaturací na jednovláknové řetězce.
2. Hybridizace neboli annealing (50 °C): oligonukleotidové primery (dlouhé asi 20-30 nukleotidů) se váží na komplementární sekvence na jednořetězovou matici DNA
3. Polymerace (72 °C): start polymerázové reakce a následná elongace primerů DNA-polymerasou

3.3 CGH

Jedná se o metodu komparativní genomové hybridizace, která má vysokou rozlišovací schopnost a citlivost. Umožňuje identifikovat delece či amplifikace sekvencí DNA ve vyšetřovaném vzorku v jediné analýze. Využívá se především k vyšetření nebalancovaných aberací v nádorových buňkách. Tak může např. odhalit amplifikaci onkogenů zodpovědnou za vznik nádorů. Tuto metodu však lze využít i při diagnostice mikrolečnicích syndromů. (1, 2)

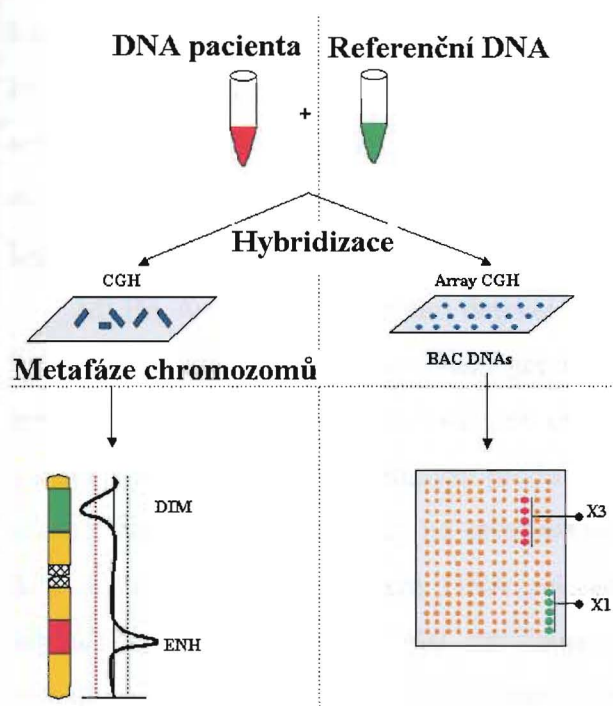
Výhodou CGH je vysoká citlivost a nenáročnost na kvalitu materiálu, protože buňky není nutné kultivovat. Jejím principem je kvantitativní dvoubarevná fluorescenční in situ hybridizace. Jako referenčního materiálu používá chromozomů od zdravé osoby.

Při CGH porovnáváme dva vzorky DNA. První DNA je tzv. vyšetřovaná a druhá srovnávací. Obě DNA jsou označeny různými fluorochromy (normální DNA červeně, vyšetřovaná DNA zeleně) a hybridizovány s normálními metafázními chromozomy.

Výsledkem je grafické znázornění barevných profilů normální a vyšetřované DNA na jednotlivých chromozomech v podobě křivek. Díky těmto křivkám zjistíme, zda jsou přítomné delece nebo amplifikace. Pokud v analyzovaném vzorku nenalezneme žádnou delecii či amplifikaci, vidíme v místě hybridizace chromozomálního úseku žluté zbarvení. Delece ve vyšetřované DNA se projeví jako posun k červené barvě, amplifikace jako převaha zelené barvy na dané části chromozomu. (1, 2)

Mezi nevýhody patří nutnost použití drahého speciálního softwaru k analýze mikroskopického obrazu a časová náročnost.

Obr. 11 Schéma metody CGH a Array CGH (16)



3.4 Array CGH

K vyšetření array CGH lze využít interfázni jádra, z nichž izolujeme DNA. Tato metoda, jejímž základním principem je hybridizace se sondami navázanými na sklíčku, má vysokou rozlišovací schopnost. Je schopna provést detailní analýzu chromozomových oblastí, kde dochází k delecím nebo amplifikacím sekvencí DNA. Tato metoda se liší od běžné metody CGH tím, že umožňuje komplexně identifikovat chromozomové změny s výrazně vyšším rozlišením. (17, 18).

3.5 MLPA

Tato metoda proniká do klinických laboratoří teprve v posledních letech. Díky ní můžeme zachytit nejen ztrátu genetického materiálu, ale i jiné odchylky. Jde o jednoduchou a vysoce výkonnou metodu na bázi kvantitativní PCR, která detekuje několik sekvencí genomové DNA v jediné reakci. Rozsah vyšetřovaných sekvencí se pohybuje okolo 50-70 nukleotidů.

Tato metoda využívá k vyšetření každého úseku genomové DNA dvou sond. První sonda obsahuje sekvenci komplementární k cílovému úseku DNA a sekvenci komplementární k univerzálnímu primeru Y. Druhá sonda obsahuje sekvenci komplementární k sousednímu cílovému úseku DNA, dále tzv. stuffer fragment a sekvenci komplementární k univerzálnímu primeru X. Stuffer fragment má u každé dvojice sond jinou délku, což umožňuje identifikaci ampliconů na výsledku kapilární elektroforézy.

MLPA umožňuje především detekci delecí a duplikací různých částí genomu. Pokud se v dané vyšetřované oblasti genu nevyskytuje delece, specifická sonda se hybridizuje na obou sousedících úsecích cílové sekvence. Následně dochází k ligaci a amplifikaci. Kvantitativní analýza produktů PCR se provádí zpravidla po separaci pomocí kapilární elektroforézy na sekvenátoru. Vyhodnocení je prováděno např. na ALF express II automatickém DNA sekvenátoru od firmy Pharmacia nebo na kapilárním sekvenátoru ABI310 od firmy Applied Biosystems. Výsledky jsou zapsány v podobě píků (vrcholů) jednotlivých prób, přičemž srovnáváme jejich výšku, plochu a délku. Naměřené rozdíly srovnáváme vždy s kontrolními vzorky.

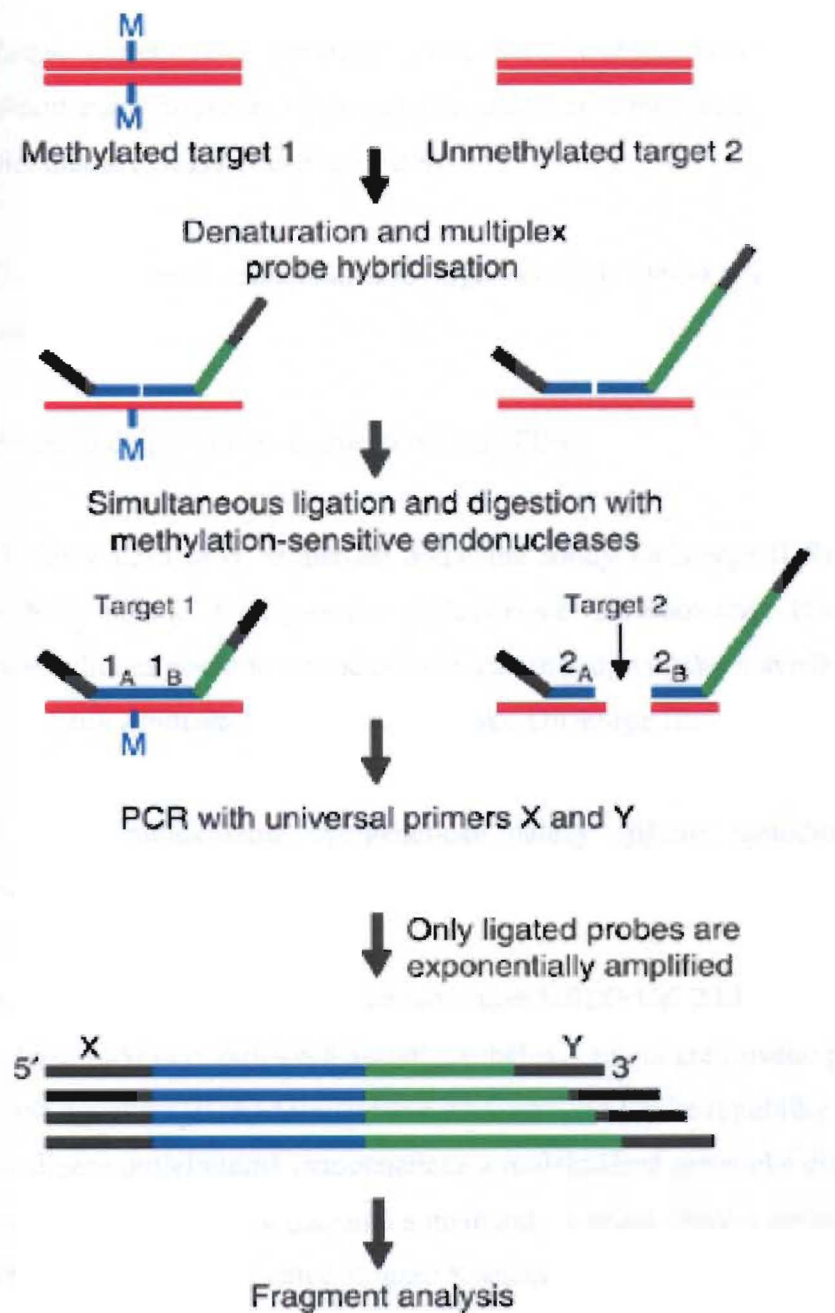
Pokud se zde delece vyskytuje nedojde k ligaci, a tudíž neproběhne ani amplifikace. Speciální modifikace MLPA jsou schopny odhalit míru metylace regulačních oblastí genů – viz též obr. 12. (18, 19, 20)

Při vyšetření se používá následující postup:

- Denaturace 20 - 500 ng vyšetřované DNA při teplotě 98 ° C
- Hybridizace při teplotě 98 ° C
- Ligace při 54° C po dobu 15 minut (ligáza-65)
- Amplifikace (nejdříve inaktivovat ligázu při teplotě 98 ° C)
- Elektroforéza vzniklých produktů (export výsledků do Excelu)

Ačkoli technika je účinná, levná, a jednoduchá, k dispozici zatím není dostatek integrovaného softwaru, který by shromažďoval výsledky analyzovaných vzorků pacientů (18, 19, 22). *

Obr.12 Schéma principu modifikované metody MLPA používané při studiu metylace genů (23)



4. Cíle práce

- Získat teoretické a praktické dovednosti v oblasti klasických cytogenetických a molekulárně-cytogenetických metod a naučit se samostatně pracovat v cytogenetické a molekulárně cytogenetické laboratoři.
- Ověřit správnost molekulárně cytogenetických metod při vyšetření mikrolečních syndromů.
- Posoudit diagnostické možnosti metody FISH.
- Ověřit využití nové komerčně dodávané sondy DiGeorge II Region probe od firmy Kreatech určené k diagnostice mikrolece chromozomu 10p14. Tato delece je zodpovědná za podobnou asociaci klinických projevů jako u syndromu DiGeorge (proto je výsledný syndrom často označován jako DiGeorge II).
- Porovnat molekulárně cytogenetické nálezy zjištěné metodou FISH s fenotypem vyšetřených pacientů a vysvětlit případné rozdíly.

Práce v molekulárně-cytogenetické laboratoři ÚBLG UK 2.LF a FN Motol, které tvořily převážnou většinu praktických aktivit, proběhly v rámci grantového projektu Interní grantové agentury (IGA) Ministerstva zdravotnictví České republiky NR/9457-3: Optimalizace molekulárně cytogenetické a molekulárně genetické diagnostiky chromozomálních změn u pacientů s mentální retardací (hlavní řešitelé: Petr Goetz, Zdeněk Sedláček, spoluřešitel: Eduard Kočárek).

5. Experimentální část (materiál a metodika)

5.1 Soubor pacientů s mikrolečnými syndromy

Soubor 91 pacientů uvádí tabulka 1. Je tvořen 49 ženami a 42 muži. Z nich bylo vyšetřeno 88 pacientů z plné krve, dále jsme vyšetřili dva potracené plody a jeden plod byl vyšetřen prenatalně.

Pacienti s číslem 1 – 15 byli indikováni k vyšetření soukromou genetickou ambulancí Dr. Kuklíka. Pacienti s číslem 16-91 byli indikováni genetickou poradnou Ústavu biologie a lékařské genetiky Fakultní nemocnice Motol.

V souboru vyšetřovaných pacientů jsou největší měrou zastoupeni pacienti s podezřením na mikrolečci 22q11.2 (DiGeorge syndromu), v daleko menší míře byli vyšetřováni i pacienti s jinými suspektními mikrolečnými syndromy (Prader-Willi/Angelman, Williams-Beuren, Smith-Magenis a cri-du-chat).

Tab.1 Soubor pacientů vyšetřovaných metodou FISH pro podezření na výskyt mikrolečných syndromů

Číslo pacienta	Pohlaví	věk v době vyšetření	Pracovní diagnóza pacienta (podle fenotypu)
1	žena	36	Angelmann
2	žena	12	Prader - Willi
3	muž	1	Williams
4	žena	10	Cri-du-Chat
5	žena	20	DiGeorge
6	žena	3	Prader - Willi
7	žena	15	Cri-du-Chat
8	muž	13	Angelmann
9	muž	33	DiGeorge
10	žena	14	Cri-du-Chat
11	žena	38	Cri-du-Chat
12	muž	1den	DiGeorge
13	muž	28	DiGeorge
14	muž	1	DiGeorge
15	muž	23	DiGeorge
16	žena	1	DiGeorge
17	muž	3	DiGeorge
18	žena	9	DiGeorge
19	žena	6	DiGeorge
20	muž	30	Williams
21	žena	34	Williams
22	žena	1 měsíc	DiGeorge

Číslo pacienta	Pohlaví	věk v době vyšetření	Pracovní diagnóza pacienta (podle fenotypu)
23	žena		2 DiGeorge
24	žena		3 Angelmann
25	žena		17 DiGeorge
26	žena		2 Angelmann
27	žena		1 DiGeorge
28	žena		7 DiGeorge
29	muž		14 Wolf-Hirschhorn
30	žena		4 Williams
31	žena		6 Smith-Magenis
32	žena		28 DiGeorge
33	žena		31 DiGeorge
34	muž		37 DiGeorge
35	muž	7 dní	Williams
36	muž	12 dnů	DiGeorge
37	muž	1	DiGeorge
38	žena	30	DiGeorge
39	muž	14	DiGeorge
40	žena	23	DiGeorge
41	muž	27	DiGeorge
42	žena	26	DiGeorge
43	muž	45	DiGeorge
44	muž	6 dnů	DiGeorge
45	muž	4 dny	DiGeorge
46	žena	1	DiGeorge
47	muž	16	DiGeorge
48	muž	51	DiGeorge
49	žena	51	DiGeorge
50	muž	25	DiGeorge
51	žena	3	Williams
52	žena	Potrácený plod	DiGeorge
53	muž	12	Williams
54	muž	6 dnů (v 10 dnech zemřel)	DiGeorge
55	žena	33	DiGeorge
56	žena	4 dny	DiGeorge
57	žena	4	DiGeorge
58	žena	11	DiGeorge
59	muž	24	Smith-Magenis
60	žena	31	DiGeorge
61	žena	2 dny	Williams
62	muž	6 dnů	DiGeorge
63	žena	24	DiGeorge
64	žena	2 měsíce	DiGeorge
65	muž	1	DiGeorge
66	muž	22 dnů	Williams
67	žena	23	DiGeorge II
68	žena	5 měsíců	Williams
69	žena	5 dnů	DiGeorge
70	žena	Prenatální vyš.plodu (28 leté matky)	DiGeorge
71	žena	Potrácený plod	DiGeorge
72	muž	4	DiGeorge

Číslo pacienta	Pohlaví	věk v době vyšetření	Pracovní diagnóza pacienta (podle fenotypu)
73	žena	7	Williams
74	muž	4 měsíce	DiGeorge
75	muž	18	DiGeorge
76	žena	28	DiGeorge
77	muž	15	Williams
78	muž	9	DiGeorge
79	muž	16	DiGeorge
80	žena	27	DiGeorge
81	muž	27	DiGeorge
82	žena	10 dní	DiGeorge
83	muž	3	DiGeorge
84	muž	8	DiGeorgell
85	muž	14	DiGeorge
86	muž	14	DiGeorge
87	žena	15 dní	DiGeorge
88	muž	13 dní	DiGeorge
89	žena	31	DiGeorge
90	muž	48	DiGeorge
91	muž	12	DiGeorge

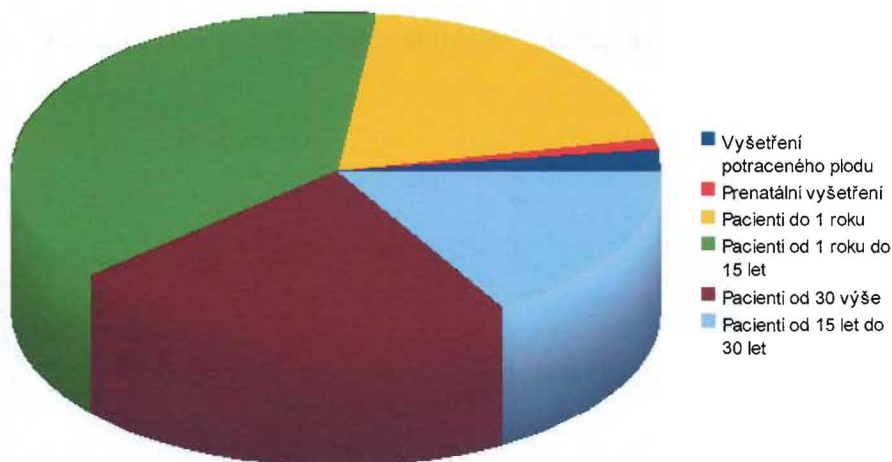
V grafu 1 je uvedeno pohlaví vyšetřovaných pacientů. Můžeme z něj vyčíst, že počet vyšetřovaných žen indikovaných k analýze mikroleceí je zhruba stejný jako počet mužů. V této práci bylo k indikaci mikroleceí doporučeno 49 pacientů ženského pohlaví a 42 pacientů mužského pohlaví.

Graf 1: Zastoupení vyšetřovaných podle pohlaví



Pacienti byli indikováni k vyšetření mikrolečnicích syndromů v různém věku. Graf 2 ukazuje, že nejčastěji se v laboratoři objevily vzorky od pacientů ve věku od 1 roku do 15 let. V této práci byly vyšetřeny také dva potrácené plody, dále bylo provedeno jedno prenatální vyšetření plodu.

Graf 2: Věkové složení souboru pacientů



5.2 Používané metody

5.2.1 G- banding (GTG pruhování)

Jde o tzv. proužkovací metodu, kdy se metafazické chromozomy vystaví účinku trypsinu, jehož působením dojde k částečné degradaci proteinů v chromozomech. Tyto chromozomy se následně obarví 5% Giemsovým barvivem. Na chromozomech vzniknou tmavé a světlé proužky, podle jejichž šířky a uspořádání lze určit jednotlivé chromozomy, popřípadě i jejich anomálie. Z fotografií chromozomů lze sestavit karyotyp člověka (1). Nevýhodou této metody je malá citlivost.

5.2.2 Vyšetření karyotypu

Karyotyp člověka se nejčastěji zpracovává z periferní krve, a to z T-lymfocytů po kultivaci. Odběr periferní krve se provádí do předepsaných odběrových zkumavek např. 5 ml zkumavka Vacuette (zelený uzávěr) s protisrážlivým prostředkem heparinem. Ihned po odběru periferní krev ve zkumavce lehce promícháme, aby se krev nesrazila. Vzorky krve uchováváme v lednici při teplotě $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Krev pak převedeme do média s obsahem PHA, který stimuluje lymfocyty k proliferaci. Pod mikroskopem sledujeme počet a strukturu jednotlivých chromozomů.

Vlastní postup

1. Příprava roztoků pro GTG-pruhování

Příprava Sørensenova pufru

Připravíme roztok Sørensenova pufru podle tabulky 2. Objem roztoku volíme podle aktuální potřeby. Půl hodiny před vlastním procesem barvení je třeba vytemperovat Sørensenův pufr pH 6,8 na laboratorní teplotu 18-25 °C.

Tab.2 Poměr chemikálií a destilované vody pro přípravu Sørensenova pufru

Příprava roztoku	na 500 ml destilované vody	na 1000 ml destilované vody
KH_2PO_4	2,63 g	5,26 g
Na_2HPO_4	4,325 g	8,65 g

Příprava 2% roztoku bovinního séra v Sørensenově pufru

V 98 ml Sørensenova pufru rozpustíme 2 ml bovinního séra, promícháme. Takto připravený roztok používáme pro oplachování skel po působení trypsinového roztoku. Roztok připravíme vždy čerstvý, bezprostředně před použitím.

Tři hodiny promícháváme na nejvyšší otáčky na magnetickém míchadle a pak uložíme přes noc do chladničky. Ráno po vytemperování roztoku na laboratorní teplotu 18 – 25°C promícháme 15 minut při stejných otáčkách na magnetickém míchadle a na pH metru změříme při laboratorní teplotě pH. Pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové (36%) a 5M NaOH upravíme pH na 6,8.

Příprava trypsinového roztoku

Ve 100 ml Sørensenova pufru rozpustíme 35 mg trypsinu.

Příprava Giemsova barviva

Do skleněné kyvety odměříme pomocí odměrného válce 5 ml koncentrovaného Giemsova barviva a jiným válcem odměříme 95 ml Sørensenova pufru.

2. Kultivace

Ke stimulaci lymfocytů PK jsme použili komerčně dodávané kompletní kultivační médium (Chromosome kit „P“, od firmy Euroclone). Manipulaci s médiem provádíme ve sterilních podmínkách ve flow boxu.

Kultivace probíhá samovolně při 37°C po dobu minimálně 68, maximálně 72 hodin.

- Minimálně 12, maximálně 24 hodin před manipulací je nutné médium vyjmout z mrazničky a uložit po dobu temperace do chladničky č. 2 při 4 – 8 °C.
- Zapnout flow box a rozsvítit UV lampu uvnitř flow boxu.
- Kývavým pohybem ruky promíchat 4x médium.
- Automatickou pipetou napipetovat do každé sterilní kultivační zkumavky 5 ml média.
- Před uzavřením kultivační zkumavky je nutné desinfikovat hrdlo zkumavky a pomocí pinzety i uzávěr plamenem lihového kahanu.
- Před započítáním procesu kultivace periferní krve pacienta je třeba vytemperovat rozplněné médium v kultivačních zkumavkách na laboratorní teplotu 18 – 25°C minimálně půl hodiny předem a maximálně 1 hodinu předem
- Kývavým pohybem ruky promíchat 4x médium.

- Vzorky v odběrových zkumavkách je nutné vytemperovat na laboratorní teplotu 18 –25°C minimálně půl hodiny a maximálně 1 hodinu předem
- Následuje práce ve flow boxu ve sterilních podmínkách.
- Kývavým pohybem ruky promíchat 4x obsah náběrové zkumavky a pipetou se sterilní špičkou odpipetovat do shodně označené kultivační zkumavky odměřené množství krve. Pokud je krev čirá a odpovídajícího objemu, pipetujeme 500 µl krve. V případě, že objem či kvalita krve vykazují nesrovnalosti, nebo v případě opakované kultivace jednoho vzorku krve, pipetujeme 1000 µl krve.
- Před uzavřením hrdlo a i uzávěr každé kultivační zkumavky desinfikovat plamenem lihového kahanu.
- Kývavým pohybem ruky promíchat 4x obsah kultivační zkumavky rukou, aby se krev promísila s médiem.
- Uložit do stojanu se sklonem 45° (pro zvětšení kultivační plochy) zkumavky a vložit do kultivačního boxu.
- Automatickou pipetou přidat do každé kultivační zkumavky 100 – 200 µl rozpuštěného phytohemaglutininu.
- Během kultivace každý den odpoledne promíchat všechny kultury, aby se předešlo kontaktní inhibici mezi rostoucími a dělícími se buňkami.
- Po uplynutí předepsané doby kultivace periferní krve (72 hodin) vyjmout stojan se zkumavkami z kultivačního boxu a ve flow boxu odpipetovat automatickou pipetou se sterilní špičkou do každé kultivační zkumavky 50 µl colcemidu.
- Zkumavku uzavřít a obsah kultivační zkumavky rukou důkladně protřepat a uložit do stojanu se sklonem zkumavek 45°.
- Buněčnou kulturu určenou k hodnocení karyotypu kultivovat s colcemidem při 37°C po dobu 25 minut, v případě opakované kultivace po dobu 30 minut.

3. Hypotonizace

- Stojan s kultivačními zkumavkami vyjmout z biologického termostatu a ve flow boxu
- Přeložit zkumavky se zpracovávanými vzorky do nerezového stojanu.

- Zkumavky rovnoměrně rozmístit do centrifugy a stočit na 10 minut při 1200 ot./min.
- Následnou manipulaci se vzorky provádět v digestoři. Po centrifugaci odšroubovat uzávěr a opatrně odsát příslušně označenou umělohmotnou Pasteurovou pipetou se shodným číslem GL na kultivační zkumavce supernatant 0,2 - 0,3 cm nad hladinu sedimentu tak, aby se nezvířil.
- Sediment resuspendovat Pasteurovou pipetou přiložením a následným držením kultivační zkumavky v nástavci minitřepačky nastavené na 1200 ot/min.
- Čistou umělohmotnou Pasteurovou pipetou přidat z výšky 3 cm od hrdla kultivační zkumavky po kapkách hypotonický roztok vytemperovaný na 37°C až po horní hranici kultivační zkumavky, tj. celkem 14 ml. Stále promíchávat obsah zkumavky na minitřepačce.
- Zkumavku uzavřít uzávěrem se shodným číslem GL a obrácením zkumavky dnem vzhůru znovu promíchat.
- Stojan s kultivačními zkumavkami uložit minimálně na 20 minut a maximálně na 40 minut do teplotní skříně s 37°C a nechat působit hypotonický roztok.

4. Fixace

- Sediment resuspendovat pomocí Pasteurovy pipety a minitřepačky
- Za stálého promíchávání na minitřepačce přidat umělohmotnou pipetou vymražený fixační roztok, do zkumavky pomalu z výšky 3 cm od hrdla kultivační zkumavky po kapkách až po horní hranici kultivační zkumavky, tj. celkem 14 ml a uzavřít ji.
- Zkumavky vložit minimálně na 10 minut do mrazničky.
- Zkumavky rozmístit do centrifugy a stočit při 1200 ot./min 10 minut.
- V digestoři odšroubovat uzávěr zkumavky, odsát příslušnou pipetou supernatant opět 0,2 – 0,3 cm nad hladinu sedimentu.
- Resuspendovat sediment pomocí Pasteurovy pipety a minitřepačky
- Za stálého promíchávání na minitřepačce pipetou označenou pouze pro fixační směs přidat pomalu vymražený fixační roztok až po hranici 7 ml na kultivační zkumavce. Zkumavku uzavřít.
- Pro dokonalé pročištění suspenze, fixaci ještě 1x opakovat
- Zkumavky rozmístit do centrifugy a stočit při 1200 ot/min 10 minut.

- V digestoři příslušnou pipetou odsát supernatant 0,2 – 0,3 nad hladinu sedimentu tak, aby se nezvířil.
- Umělohmotnou pipetou přidat maximálně 1 ml a minimálně 0,5 ml fixačního roztoku v závislosti na množství sedimentu. Obsah zkumavky jemně resuspendovat.
- Zkumavku uzavřít a uložit do chladničky

5. Kapání sedimentu na podložní sklo

- Otevřít kultivační zkumavku se zafixovanou buněčnou suspenzí daného pacienta a Pasteurovou pipetou jemně resuspendovat suspenzi. Resuspendovaná suspenze má mít jemně mléčnou barvu s opaleskujícím zakalením. Pokud se suspenze při vizuálním hodnocení jeví jako hustá, doředit ji přidáním několika kapek fixačního roztoku a opatrně jemně resuspendovat Pasteurovou pipetou.
- Z mrazáku vyjmout jedno podložní sklo a lehkým ofouknutím vytvořit na skle tenkou vrstvu vody.
- Z výšky 30 cm kápnout pomocí příslušné Pasteurovy pipety 1-5 kapek suspenze po celé ploše skla.
- Lehce rozfoukat suspenzi po celém skle.
- Grafitovou tužkou napsat na zábrus pořadové číslo preparátu a příjmení pacienta.
- Takto označené sklo ihned vložit do teplotní skříně maximálně na 10 minut při teplotě 60°C.
- Vysušené nativní preparáty mikroskopicky prohlédnout (pod fázovým kontrastem) a posoudit jejich kvalitu. Pokud je kvalita prvního preparátu vyhovující, připravit další 4 preparáty pro karyotypizaci.
 - a) Při nadměrné hustotě materiálu na prvním preparátu naředit buněčnou suspenzi v kultivační zkumavce přidáním fixačního roztoku a opatrně resuspendovat Pasteurovou pipetou.
 - b) Při nevhodném rozložení chromozomů v metafázích na prvním preparátu přidat do buněčné suspenze 1-3 kapky ledové kyseliny octové v závislosti na kvalitě a rozložení chromozomů konkrétního pacienta.

- Kultivační zkumavku se zbylou suspenzí doplnit do objemu 5 ml a uložit do chladničky

6. Barvení metodou GTG pruhování

- Pořadově první skla od dvou prvních pacientů s nativními preparáty přiložit rubovou stranou k sobě a vložit do trypsinového roztoku ve skleněné kyvetě. Pak nechat 10 vteřin působit.
- Skla vyjmout z kyvety a opláchnout 3 vteřiny v jedné kádince s 2% roztokem bovinního séra v Sörensonově puftru, dále pak ve dvou kádinkách se Sörensenovým pufrem.
- Nadbytek puftru nechat po každém oplachu stéct přes roh skla.
- Z kyvety s barvou filtračním papírem stáhnout povrchovou blanku a roztok promíchat.
- Skla obarvit v 5% roztoku Giemsova barviva po dobu 3 minut.
- Preparáty vyjmout, opláchnout v první kádince se Sörensenovým pufrem, pak proudem vody a nakonec v kádince s destilovanou vodou.
- Preparáty vyjmout a vysušit vysoušečem vlasů.
- Na zábrus skla napsat grafitovou tužkou dobu působení trypsinu.
- Mikroskopicky posoudit kvalitu G-pruhů. Pokud není vhodná, upravit pro další barvená skla dobu působení trypsinu i Giemsova barviva.

7. Mikroskopická analýza

- Vytáhnout preparát a vložit ho pod mikroskop.
- Otevřít si karyotypovací program, v něm příslušnou databázi a najít v abecedním seznamu složku konkrétního pacienta a otevřít.
- Porovnat identifikační údaje pacienta v databázi s preparátem.
- Při zvětšení objektivu 10x, resp. 20x zběžně prohlédnout preparát a posoudit jeho kvality a vhodnost pro karyotypování.
- Na místo nalezené metafáze s dobře rozloženými chromozomy kápnout kapku imerzního oleje a nastavit objektiv se zvětšením 100x.
- Stanovit počet chromozomů dané metafáze. Pokud metafáze obsahuje minimálně 45 chromozomů, můžeme provést strukturní analýzu karyotypu, v opačném případě najít jinou metafázi.

8. Práce s mikroskopem a se softwarem

- K práci jsem použila systém LUCIA Karyo od firmy Laboratory Imaging s.r.o.
- Pokud snímáme analyzovanou mitózu, kliknout na ikonu mitóza a následně na ikonu snímání.
- Na mikroskopu otevřít clonu pro poloviční průchod světla do kamery.
- Ovládáním mikroskopického stolku posunout metafázi do středu obrazovky monitoru PC a chromozomy zaostřit.
- Páku pro ovládání clony pro průchod světla na mikroskopu otevřít do polohy pro plný průchod světla do kamery.
- Nasnímaný obraz metafáze upravit pomocí manuálu pro ovládání karyotypovacího modulu obrazové analýzy do podoby vhodné pro karyotypování.
- Každou metafázi karyotypovat, tj. chromozomy seřadit a hodnotit podle ISCN 2005.
- Nasnímaný karyotyp pacienta uložit do jeho složky v databázi PC.
- V legendě pro uložení karyotypu aktualizovat následující údaje: druh biologického materiálu, datum jeho odběru, karyotyp, číslo preparátu, komentář ke karyotypu a jméno karyotypující osoby.
- Vyšetřit takto celkem 10 G-pruhovaných metafází.

9. Závěr analýzy

- Z řady nasnímaných karyotypů pacienta vybrat jeden reprezentativní obrázek, otevřít na celou plochu monitoru.
- Kliknutím na funkci „nastavení“ vybrat protokol pro cytogenetickou zprávu.
- Kliknutím na funkci „databáze“ a následně na funkci „zpráva z databáze“ označit vybraný obrázek karyotypu.
- Potvrzením funkce tlačítkem „OK“ program automaticky vygeneruje cytogenetickou zprávu obsahující identifikační údaje pacienta, jméno odesílajícího lékaře, číslo diagnózy pacienta podle mezinárodní nomenklatury, číslo pojišťovny, obrázek karyotypu, zápis karyotypu podle ISCN 2005.

- Závěr cytogenetické analýzy zapsat slovně podle karyotypu a překontrolovat správnost všech ostatních údajů.

Zpráva o výsledku cytogenetického vyšetření se vytiskne ve dvou kopiích. Obě pak musí podepsat pověřený pracovník cytogenetické laboratoře.

5.2.3 FISH

Z molekulárně biologického hlediska je metoda hybridizace *in situ* založena na stejném principu jako analýza dle Southerna a další hybridizační metody, tj. na schopnosti jednořetězcové DNA (jakožto sondy) se vázat s komplementárními úseky cílové DNA (1). Oproti těmto metodám, k nimž je nezbytná izolace DNA ze vzorku, však hybridizace *in situ* využívá pouze biologického materiálu (např. metafázních chromozomů, interfázních buněčných jader, buněk z histologických řezů atd.), z něhož DNA neizolujeme, avšak přímo na něj aplikujeme sondu. K nejběžnějším modifikacím hybridizace *in situ* patří FISH.

Metoda FISH má velký význam v molekulární genetice. Jejím principem je navázání DNA sondy ke komplementárním sekvencím cílové chromozomální DNA. Metoda FISH se může použít na chromozomy v metafázi i interfázi. Sondy mohou být značené nepřímo digoxigeninem nebo biotinem a následně detekované pomocí fluorescenčně značených protilátek.

Druhou, snadnější a mnou používanou variantou je přímé fluorescenční značení sondy (2). Ke značení používáme např. Texas Red, FITC, Cy3, Cy5, Spectrum Green, Spectrum Orange. Tato sonda označená fluorescenčním barvivem se váže na specifické místo chromozomu.

Při analýze FISH provádíme nejprve denaturaci sondy a cílové DNA za zvýšené teploty (okolo 75 °C) a pak hybridizaci sondy a cílové DNA, kdy se denaturovaná sonda připojí ke komplementárním sekvencím (viz též tab. 3). Po skončení hybridizace odstraníme nespecifické signály.

Výhodou analýzy FISH, je použití několika typů sond, které volíme dle typu vyšetření. V současnosti je FISH je jednou z nejběžnějších metod používaných k rutinní vyšetření, v klinické genetice. Její klasické modifikace však umožňují vyšetření změn pouze těch částí genomu, k níž jsou použité sondy komplementární.

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

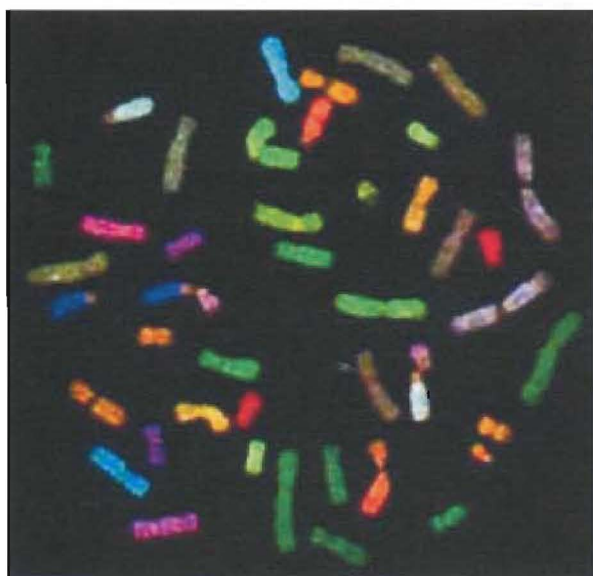
Lokus-specifické sondy (tzv. genové) se váží na jedinečné sekvence na chromozomech (např. geny nebo skupiny genových lokusů). Využívají se ke stanovení některých strukturálních změn, jako jsou mikrodelece nebo mikroamplifikace.

Celochromozomové sondy (tzv. malovací) se připravují jako směs fragmentů DNA hybridizující s různými lokusy jednoho konkrétního chromozomu. Díky jejich současné aplikaci dojde k označení téměř celého chromozomu. Využívají se pro určení některých chromozomálních přestaveb. Signály těchto sond lze hodnotit jen na chromozomech v metafázi a pro analýzu interfázních jader je nelze v běžné praxi použít. Zvláštním případem aplikace malovacích sond je metoda M-FISH (vícebarevná FISH – viz obr. 13 a 14).

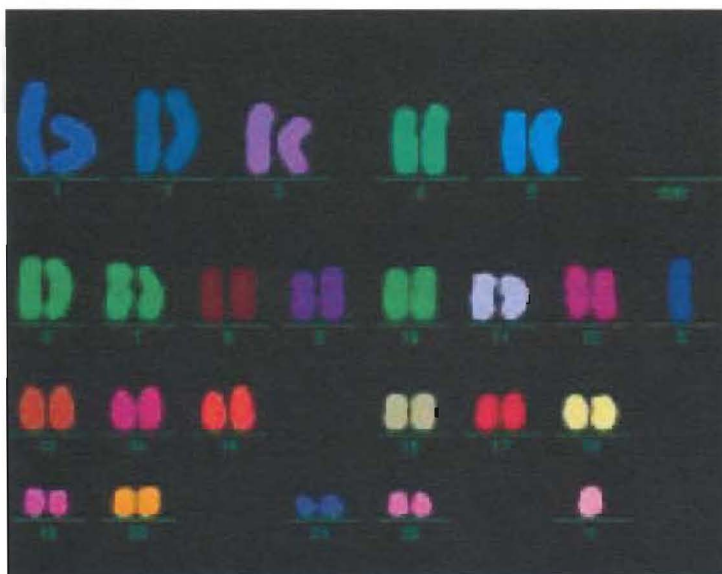
Tab.3 Minimální doba hybridizace u nečastěji používaných typů sond

Typ sondy	Minimální doba hybridizace
Centromerická	30 minut
Celochromozomová	4 hodiny
Genově specifická	6 hodin

Obr.13 Foto chromozomů analyzovaných metodou M-FISH (23)



Obr.14 Karyotyp zdravého člověka stanovený metodou M-FISH (24)



Obr.15 Foto přístroje ThermoBrite (25)



K denuraci a hybridizaci jsou ideální přístroje ThermoBrite (obr. 15) a Hybride, z nichž druhý uvedený byl použit v této práci. Jde o automatický přístroj s řadou programů, umožňujících nastavit optimální teplotní podmínky pro denuraci a hybridizaci. Tímto přístrojem můžeme vyšetřit až dvanáct preparátů najednou. Má velmi snadné ovládání a není příliš finančně nákladný.

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

Vlastní postup

1. Příprava roztoků

Odmývací roztoky temperujeme 30 min před zahájením procesu na požadovanou teplotu dle návodu výrobce sond : 40ml roztoku 0,4x SSC/0,3%-Igepal zahříváme na teplotu $73 \pm 1^\circ\text{C}$ ve skleněné kyvetě s víčkem. 40 ml roztoku 2x SSC/0,1%-Igepal vytemperujeme na laboratorní teplotu $18-25^\circ\text{C}$ v Coplinově kyvetě.

• 20x SSC (saline sodium citrate)

Navážíme:

175,3 g NaCl

88,2 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

900 ml destilované vody

Přes noc uskladníme v chladničce, druhý den změříme pH a upravíme na $\text{pH} = 7$. Celkový objem doplníme na 1 litr. Na roztok napíšeme název roztoku, datum výroby a přesný čas, složení roztoku, jméno laboranta, který roztok připravoval a za jakých podmínek. Skladujeme při laboratorní teplotě maximálně 6 měsíců. (dle manuálu firmy Vysis).

• 2x SSC

Připravíme roztok z:

100 ml 20xSSC ($\text{pH} = 7$)

850 ml destilované vody

Přes noc uskladníme v chladničce, druhý den změříme pH a upravíme na $\text{pH} = 7$. Celkový objem doplníme na 1 l. Roztok označíme dle výše uvedených podmínek. Skladujeme při laboratorní teplotě maximálně 6 měsíců (dle manuálu firmy Vysis).

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

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

Připravíme roztok z:

2 ml 20xSSC (pH=7)

95 ml Aqua pro injectione

300 µl Igepal CA-630

Tři hodiny promícháváme na nejvyšší otáčky na magnetickém míchadle a pak uložíme přes noc do chladničky. Ráno po vytemperování roztoku na laboratorní teplotu 18 – 25°C promícháme 15 minut při stejných otáčkách na magnetickém míchadle a na pH metru změříme při laboratorní teplotě pH. Pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové (36%) a 5M NaOH upravíme pH na 7.0 – 7.5. Aqua pro injectione doplníme celkový objem na 100 ml. Takto připravený roztok tepelně ošetříme v teplotní skříni při 110 - 130°C 20 minut. Po vychladnutí uskladníme roztok v chladničce při 2-8°C. Roztok označíme dle výše uvedených podmínek. Roztok je možné skladovat 6 měsíců (dle manuálu firmy Vysis).

- 2x SSC s 0,1% detergentem

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

Připravíme roztok z:

10 ml 20xSSC (pH=7)

85 ml Aqua pro injectione

100 µl Igepal CA-630

Tři hodiny promícháváme na nejvyšší otáčky na magnetickém míchadle a pak uložíme přes noc do chladničky. Ráno po vytemperování roztoku na laboratorní

teplotu 18 – 25°C promícháme roztok 15 minut při stejných otáčkách na magnetickém míchadle a na pH metru změříme při laboratorní teplotě pH. Pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové (36%) a 5M NaOH upravíme pH na 7.0 ± 0.2 . Aqua pro injectione doplníme celkový objem na 100 ml. Takto připravený roztok tepelně ošetříme v teplotní skříni při 110 - 130°C 20 minut. Po vychladnutí uskladníme roztok v chladničce při 2-8°C. Roztok označíme dle výše uvedených podmínek. Roztok je možné skladovat 6 měsíců (dle manuálu firmy Vysis).

- Fixační roztok

Tento roztok si připravíme z methanolu a 100% kyseliny octové v poměru 3:1 v množství podle počtu vzorků dle tabulky. Roztok je třeba připravovat vždy čerstvý.

Tab. 4 Objemový poměr kys. octové a methanolu

Počet vzorků	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kys.octová	9	18	27	36	45	54	63	72	81	90
Methanol	27	54	81	108	135	162	189	216	243	270
Celkové množství	36	72	108	144	180	216	252	288	324	360

- Hypotonický roztok

Připravíme roztok z:

1,3978 g KCl (Suprapur)

250 ml destilované vody

Roztok je třeba připravovat vždy čerstvý.

Tab. 5 Poměr KCl (g) a Destilované vody (ml)

Počet vzorků	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
KCl (g)	0,084	0,168	0,252	0,336	0,42	0,504	0,588	0,672	0,756	0,84
Destilovaná voda (ml)	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150

- Alkoholové roztoky
70% ethanol – 70ml 96% ethanolu
30 ml destilované vody
85% ethanol – 85 ml 96% ethanolu
15 ml destilované vody
96% ethanol – 100 ml 96% ethanolu

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

2. Příprava hybridizačních směsí

Před kodenaturací chromozomální DNA a DNA sondy připravíme hybridizační směs podle návodu (viz tab. 6).

Hybridizační směs připravujeme bezprostředně před FISH. Mikroskopickou sondou, hybridizačním pufrům a rozplněnou Aqua pro injectione krátce centrifugujeme do homogenizace obsahu mikroskopických vavek na mikrocentrifuze. Do sterilní mikroskopické vavky automatickou mikropipetou napipetujeme:

Tab. 6 Příprava hybridizační směsi

Počet sond k hybridizaci	1 sonda	2 sondy	3 sondy
Hybridizační pufr	7 μ l	7 μ l	7 μ l
Sonda 1	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Sonda 2	-	1 μ l	1 μ l
Sonda 3	-	-	1 μ l
Aqua pro injectione	2 μ l	1 μ l	-

Lihovým popisovačem napíšeme na mikroskopickou vavku složení hybridizační směsi. Mikroskopickou vavku s hybridizační směsí krátce centrifugujeme na mikrocentrifuze do homogenizace obsahu. Krátce promícháme na minitřepačce a opět krátce centrifugujeme. Hybridizační směs uložíme až do doby hybridizace na tmavé místo nebo do mrazáku.

3. Postup

- Připravit vzorky periferní krve k inkubaci s následnou kultivací (72 hod). Po skončení provést hypotonizaci kultivovaných buněk v roztoku 0,075 molárního

KCl a dále fixaci materiálu směsí metanolu a kyseliny octové v poměru 3:1 (blíže viz 5.2.2 Vyšetření karyotypu).

- Nahlédnout pod mikroskopem na preparát, zda je preparát kvalitní. Neměl by obsahovat cytoplazmu kolem jader a chromozomů.
- Dehydratovat preparát vzestupnou alkoholovou řadou 70%, 85%, 96%, 100% při laboratorní teplotě 18-25°C po dobu 2 minut v každém roztoku
- Usušit preparáty na vzduchu při laboratorní teplotě 18-25°C a přemístit na plotýnku nastavenou na 37°C.
- Mikrozkmavku s hybridizační směsí před použitím promíchat na minitřepačce a centrifugovat na mikrocentrifuze po dobu 20 sekund.
- Na vyhřívací plotýnku vytemperovanou na 37°C položit vyčištěné krycí sklíčko.
- Na připravené krycí sklíčko aplikovat automatickou mikropipetou potřebné množství hybridizační směsi. Množství volit podle plochy krycího skla. (12x12mm, resp. 15x15mm)
- Krycí sklíčko opatrně spojit s podložním sklem v místě určeném k hybridizaci tak, aby nemohlo dojít ke vzniku vzduchových bublin. Případné vzduchové bubliny opatrně vytlačit.
- Orámovat okraje krycího sklíčka vulkanizačním roztokem a ponechat 5 minut
- Připravit přístroj HYBrite – vložit podložní skla a do bočních žlábků vlhký filtrační papír
- Kontrola teploty přístroje – denaturace při 75±1°C / 1 min a následná hybridizace při 37±1°C / 6 hodin
- Po ukončené hybridizaci sundat folii z preparátu a vložit do připravených roztoků.
- Ponořit do roztoku 2x SSC po dobu 1 minuty při pokojové teplotě.
- Opatrně odstranit krycí sklíčka.
- Ponořit na 1 minutu do roztoku 0,4x SSC s 0,3 % detergentem NP. 40 vyhřátého na 73±1°C umístěného v termolázni. Dojde k odstranění nescifických signálů.
- Ponořit do roztoku 2x SSC s detergentem po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě.
- Skla z roztoku vyjmout a otřít jejich zadní plochy – nechat volně oschnout.

- Mezi tím vyjmout krycí sklíčko, které velikostně odpovídá rozloze hybridizované plochy na preparátu a nanést na něj automatickou mikropipetou potřebné množství barviva DAPI II s koncentrací 125ng/ml. (10 μ l na sklíčko velikosti 18x18mm)
- Opatrně spojit podložní sklo s krycím sklíčkem v nahybridizovaném místě tak, aby nemohlo dojít ke vzniku vzduchových bublin. Případné vzduchové bubliny opatrně vytlačit.
- Rohy krycího sklíčka překrýt malým množstvím bezbarvého laku na nehty
- Preparáty prohlédnout pod epifluorescenčním mikroskopem s objektivem zvětšujícím 100x za použitím imerze

4. Mikroskopická analýza

- Spustit software LUCIA (FISH), popř. ISIS (od firmy Metasystems).
- Otevřít FISH modul obrazové analýzy, příslušnou databázi a najít v abecedním seznamu složku konkrétního pacienta a otevřít ji.
- Preparát skladovaný ve tmavé komůrce vložit do svorek mikroskopu.
- Porovnat identifikační údaje pacienta v databázi s preparátem.
- V epifluorescenčním mikroskopu nastavit filtr pro barvivo, jímž jsou obarveny chromozomy (tzv. counterstain).
- S objektivem zvětšujícím 20x nebo 40x najít a orientačně prohlédnout vhodnou metafázi nebo interfázní jádro.
- Prohlédnout metafázi, resp. interfázní jádro i pod dalšími filtry pro ostatní použité fluorochromy. Tím posoudíme kvalitu hybridizace a vhodnost preparátu pro analýzu. Poté preparát prohlédnout i s objektivem zvětšujícím 100x za použití imerze.

5. Práce s mikroskopem a se softwarem určeným k analýze obrazu

Všechny preparáty po hybridizaci musíme chránit před světlem. Asi 30 min před vyhodnocením preparátu pod epifluorescenčním mikroskopem, musí být preparát ponechán ve tmě při pokojové teplotě.

Kliknout na ikonu snímání (resp. „Capture image“) a na mikroskopu otevřít clonu pro poloviční průchod světla do kamery. Ovládáním mikroskopického stolku posunout analyzovaný objekt do středu obrazovky monitoru PC a zaostřit ho. Páku pro ovládání clony pro průchod světla na mikroskopu otevřít do polohy pro plný průchod světla do kamery. Při snímání podbarvení analyzovaného objektu a doostřit. Potvrzením tlačítka další systém automaticky přepne na snímání další barvy a zároveň automaticky vymění filtr pro snímání fluorochrom. Opět upravit a doostřit a potvrdit tlačítkem další. Při snímání poslední barvy uzavřít celý proces snímání tlačítkem OK. Nasnímaný obrázek upravit pomocí nabídky v menu úpravy do konečné podoby určené pro dokumentaci.

Při vyšetření mikrolečnicích syndromů hodnotíme minimálně pět, zpravidla však 10 – 15 metafází. Pokud metafáze zcela chybí, vyšetřujeme 200 interfázních jader. Při patologickém nebo hraničně patologickém nálezu se doporučuje hodnotit až 500 buněk (metafází i jader).

Pokud je cílová sekvence přítomna, je místo vazby sondy vidět v epifluorescenčním mikroskopu jako hybridizační signál.

Při své práci jsem srovnávala hodnocení obrázků v mikroskopu dvěma různými počítačovými systémy: Lucia FISH (dodávaný firmou Laboratory Imaging s.r.o.) a ISIS (dodávaný firmou Metasystems). O vhodnosti těchto systémů blíže pojednávám v diskusi.

6. Závěr analýzy

Pro vyslovení konečného závěru a vyplnění FISH zprávy, je potřebné shodnotit větší počet metafázích jader. Z řady nasnímaných obrázků pacienta vybereme jeden reprezentativní obrázek. Kliknutím na funkci nastavení vybereme protokol pro FISH zprávu. Kliknutím na funkci databáze a následně na funkci zpráva z databáze označíme vybraný obrázek karyotypu.

Potvrzením funkce tlačítkem OK program automaticky vygeneruje FISH zprávu obsahující identifikační údaje pacienta, jméno odesílajícího lékaře, číslo diagnózy pacienta podle mezinárodní nomenklatury, číslo pojišťovny, obrázek karyotypu, datum vyhotovení zprávy, jména hodnotících osob a jméno vedoucího genetické laboratoře.

Po ukončení práce s epifluorescenčním preparátem se uchovávají dlouhodobě do mrazícího boxu o teplotě $-20 \pm 1^\circ\text{C}$. Po vydání výsledků se preparáty skladují za výše uvedených podmínek ještě po dobu 1 měsíce. Preparáty s patologickým nálezem jsou archivovány pod dobu jednoho roku.

5.2.4 Použité sondy pro FISH

Výčet použitých sond pro FISH uvádí následující tabulka č. 7. Ve všech případech se jednalo o přímo značené, lokus specifické sondy od komerčních dodavatelů. Jedním z úkolů mé práce bylo posoudit vhodnost využití sond pro region D10S585 na chromozomu 10p14 (k detekci vzácnější mikrodelece 10p, která způsobuje tzv. DiGeorge syndrom II), které jsou zatím v běžné diagnostické praxi používány jen velmi omezeně.

Tab. 7: Seznam použitých sond

Název sondy	Chromozomová specifikace	Lokus	Délka sondy	Výrobce
Aquarius DiGeorge/VCFS TUPLE1 Region Probe	22q11.2	HIRA (dříve označován TUPLE1)	120 kb	Cytocell
DiGeorge II Region Probe	10p14	D10S585	350 kb	Kreatech *)
Aquarius Williams-Beuren Region Probe	7q11.23	FZD9/WBSCR9/TBL2/LIMK1/RFC2/CYLN2	450 kb	Cytocell
Aquarius Angelman Region Probe	15q11-13	UBE3A/D15S10	120 kb	Cytocell
Aquarius Prader-Willi/Angelman Region Probe	15q11-13	SNRPN/IC	150 kb	Cytocell
Aquarius Wolf-Hirschhorn Region Probe	4p16.3	D4S166/D4S3327	165 kb	Cytocell
Cri-Du-Chat	5p15.2 *	CTND2/SH6C-153474	580 kb	Kreatech *)
Aquarius Smith-Magenis/ Miller-Dieker Probe Combination	17p11.2	FL1	80 kb	Cytocell
	17p13.3	LIS1	170 kb	

*) dříve Q-BIOgene

6. Výsledky

6.1. Základní cytogenetické vyšetření

Celkem bylo vyšetřeno 91 pacientů. Část údajů o výsledcích jejich cytogenetického vyšetření jsem získala od pracovníků cytogenetické laboratoře ÚBLG FNM. K nim jsem (pod vedením dr. Kosařové) vyšetřila jako srovnávací materiál základní cytogenetickou metodou chromozomy od 8 zdravých osob.

Základní cytogenetický nález (stanovený metodou G-pruhování a vyhodnocený systémem LUCIA, resp. Ikaros) byl u všech 91 pacientů se suspektními mikrodelečními syndromy normální (tj. 46,XX, popř. 46,XY). Na příslušných chromozomech nebyly pozorovány žádné odchylky. Níže uvedené fotografie (foto 1 – foto 8) dokumentují několik ukázkových karyotypů a různě kondenzovaných metafázních, resp. prometafázních chromozomů. Tabulka 7 (viz níže) uvádí výsledky základní cytogenetické analýzy všech vyšetřených pacientů se suspektními mikrodelečními syndromy a srovnává je s molekulárně cytogenetickým nálezem (bližší komentář viz 6.2).

Foto 1. Karyotyp zdravého muže (46,XY) sestavený pomocí programu LUCIA

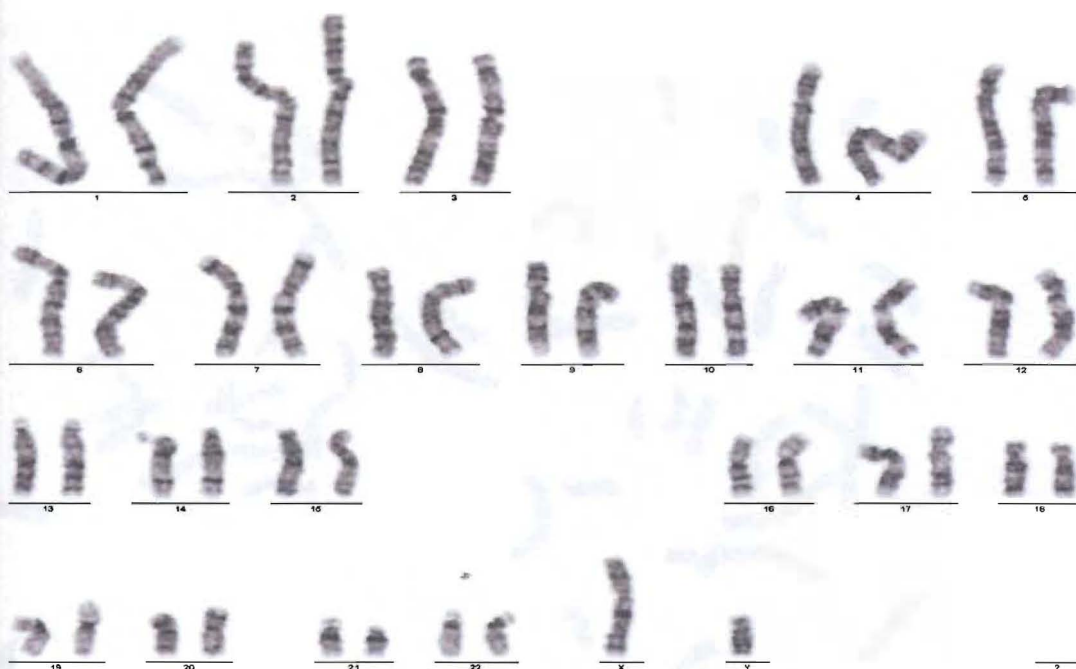


Foto 2. Karyotyp zdravé ženy (46,XX) sestavený pomocí programu LUCIA

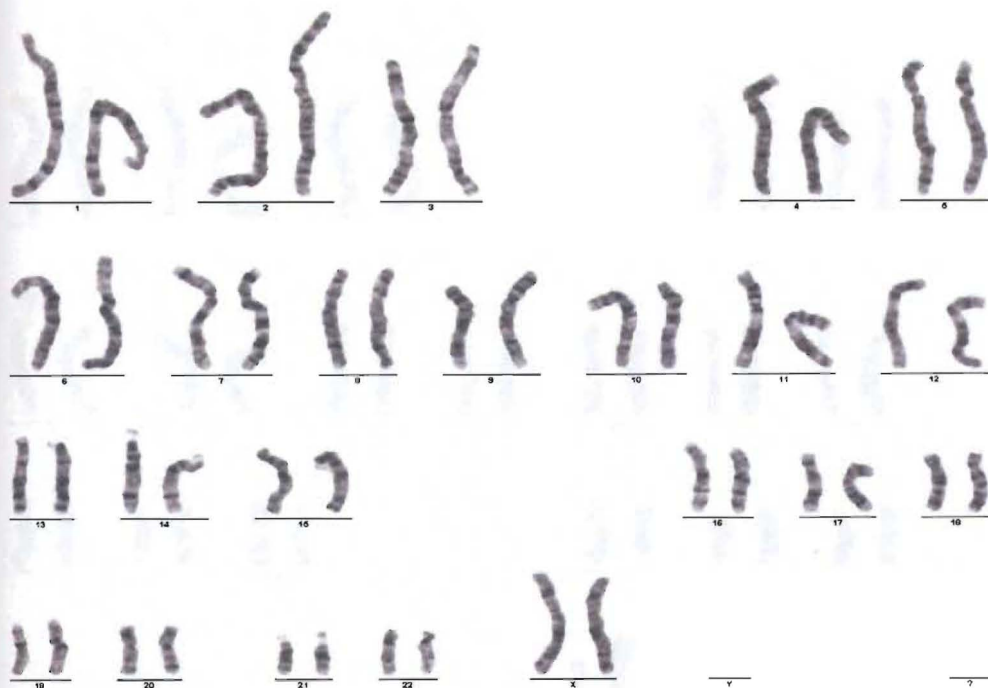


Foto 3. Mikroskopický obrázek metafázních chromozomů ženy upravený programem LUCIA

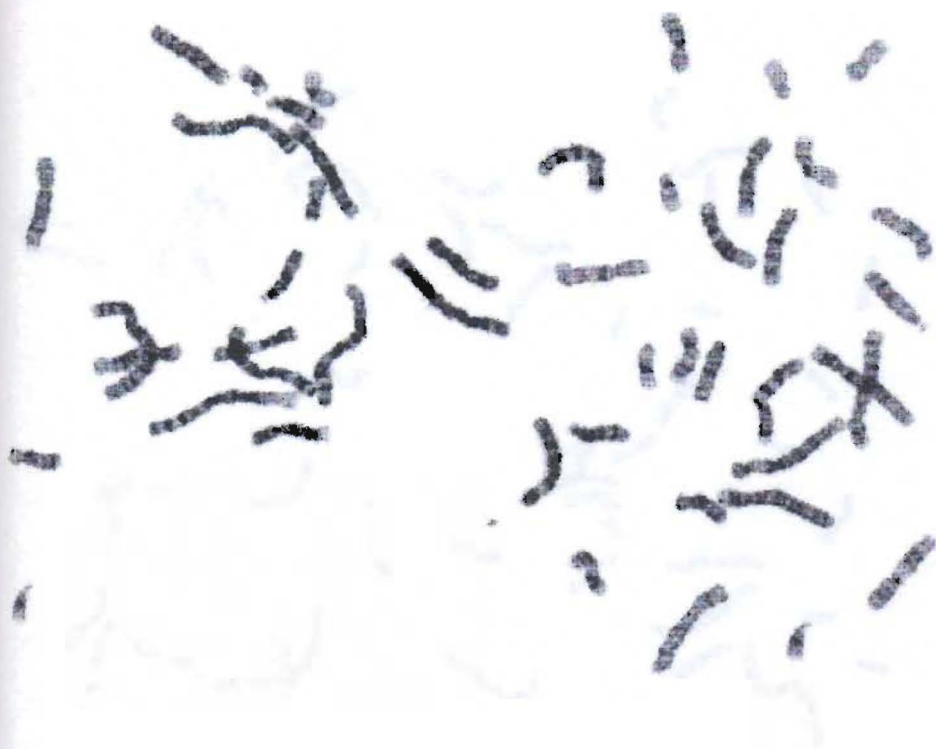


Foto 4. Normální karyotyp ženy sestavený z výše uvedeného foto 3 pomocí programu LUCIA



Foto 5. Mikroskopický obrázek poměrně málo kondenzovaných (prometafázních až metafázních) chromozomů muže upravený programem LUCIA

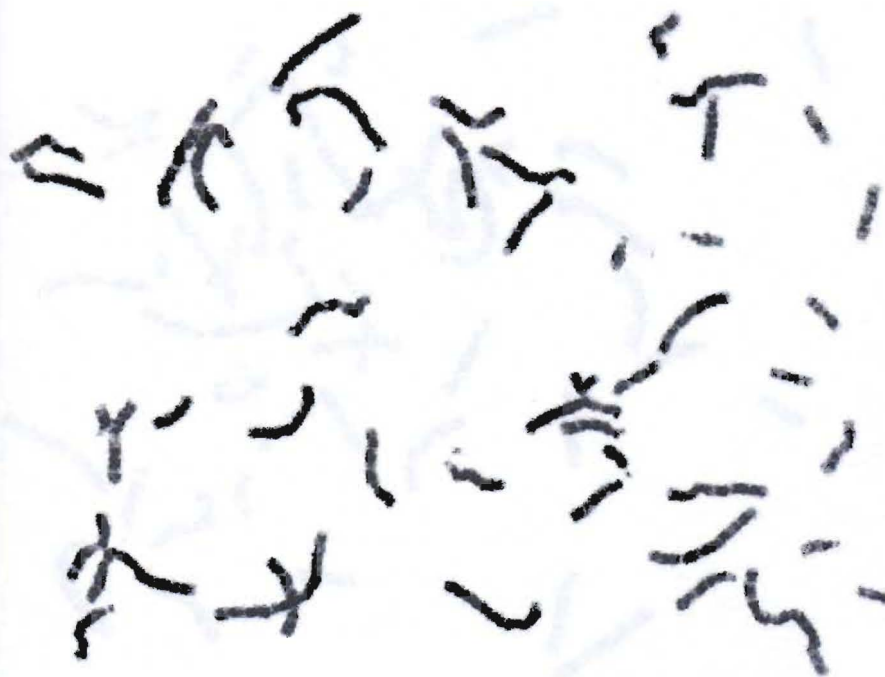


Foto 6. Normální karyotyp muže sestavený z výše uvedeného fota 5 pomocí programu LUCIA

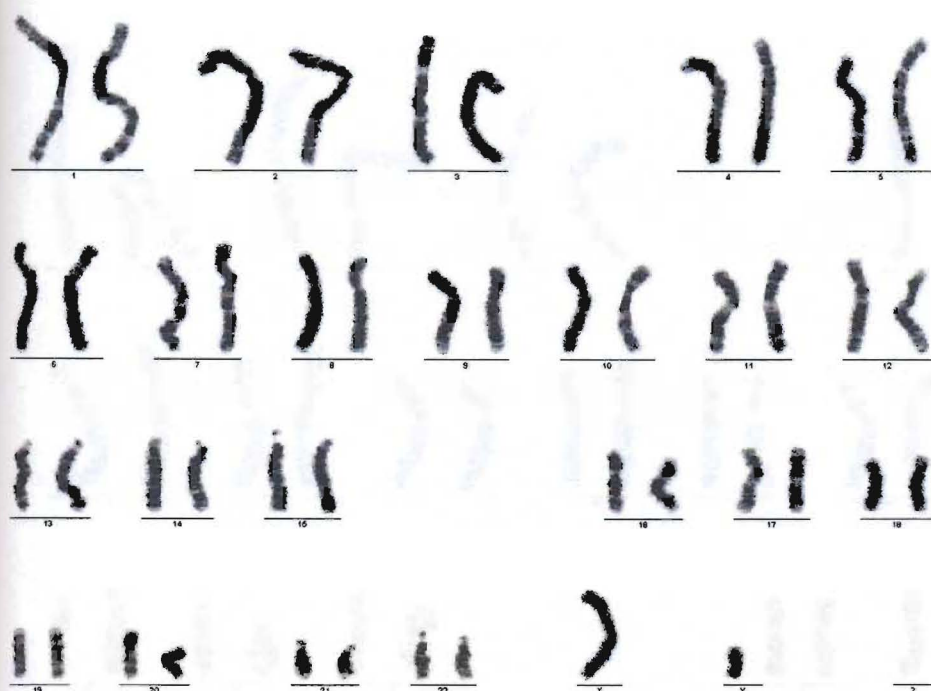


Foto 7. Mikroskopický obrázek metafázních chromozomů upravený programem LUCIA

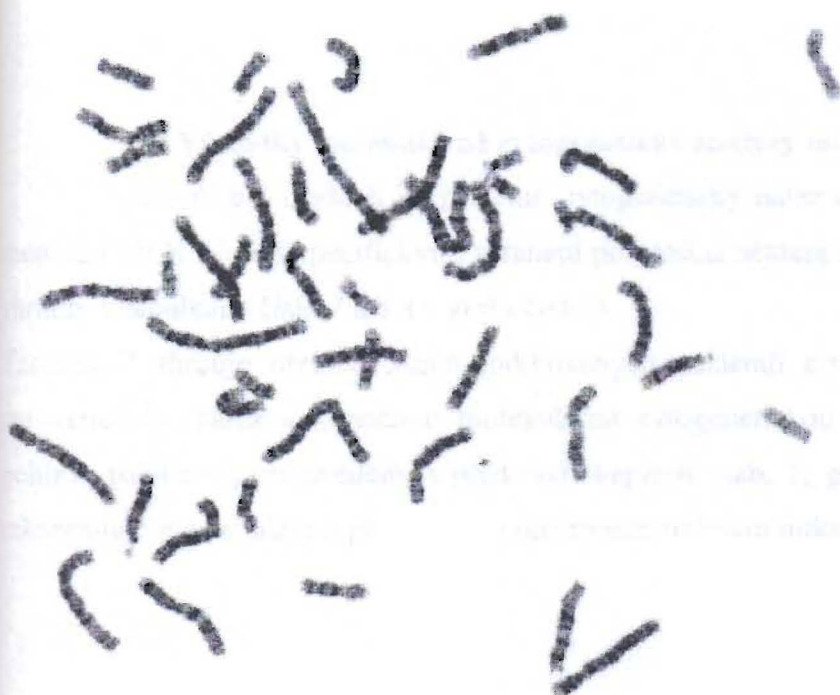
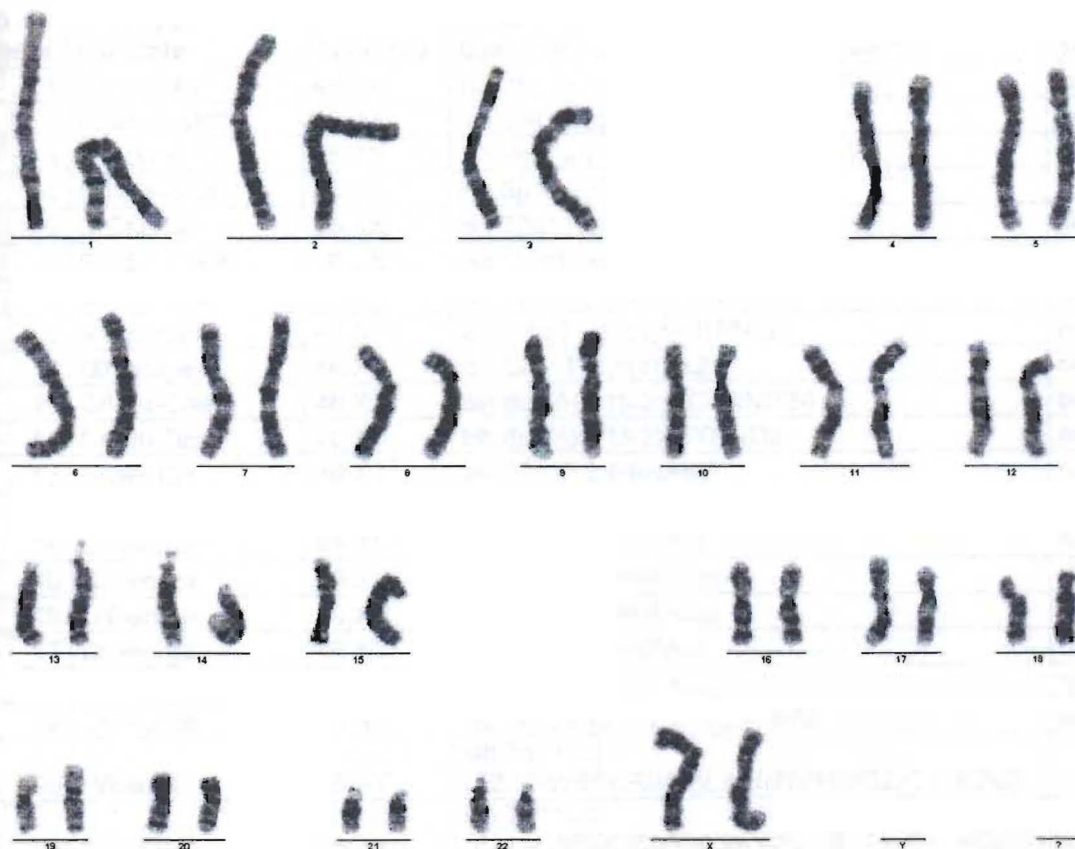


Foto 8. Karyotyp zdravé ženy sestavený z foto 7 pomocí programu LUCIA



6.2 Výsledky molekulárně cytogenetické analýzy metodou FISH

Ačkoli byl u všech 91 pacientů cytogenetický nález normální, u 12 pacientů byla metodou FISH s lokus specifickými sondami prokázána některá z mikroleleci. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách číslo 7 a 8 a v grafu číslo 3.

Tabulka 7 shrnuje přehled všech indikovaných pacientů k vyšetření mikroleleci, jejich cytogenetický nález a konečnou molekulárně cytogenetickou diagnózu. Údaje o věku a pohlaví pacientů jsou uvedeny v předchozí kapitole (tab. 1, grafy 1 a 2). Tabulka 8 pak rekapituluje pouze údaje o pacientech s pozitivním nálezem mikrolelece.

Tab. 8: Karyotypy a molekulárně cytogenetické nálezy u pacientů vyšetřovaných pomocí metody FISH.

Číslo pacienta	Pracovní dg (fenotyp) pacienta	Karyotyp	Nález FISH (zjednodušený zápis dle ISCN 2005)	delece prokázána
1	Angelman	46,XX	ish del(15)(q11.2q11.2)(IC/SNRPN-)	ano
2	Prader - Willi	46,XX	ish del(15)(q11.2q11.2)(UBE3A-)	ano
3	Williams	46,XY	ish del(7)(q11.23q11.23)(LIMK1-)	ano
4	Cri-du-Chat	46,XX	ish 5p15.2(CTNND2x2)	ne
5	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
6	Prader - Willi	46,XX	ish (15q11-q13)(SNRPNx2)	ne
7	Cri-du-Chat	46,XX	ish 5p15.2(CTNND2x2)	ne
8	Angelman	46,XY	ish (15q11-q13)(SNRPNx2)	ne
9	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
10	Cri-du-Chat	46,XX	ish del (5)(p15.31)(CTNND2-)	ano
11	Cri-du-Chat	46,XX	ish del (5)(p15.2)(CTNND2-)	ano
12	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
13	DiGeorge	46,XY	ish del(22)(q11.2 q11.2)(HIRA-)	ano
14	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
15	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
16	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
17	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
18	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
19	DiGeorge	46,XX	ish del(22)(q11.2 q11.2)(HIRA-)	ano
20	Williams	46,XY	ish 7q11.23 (FZD9/WBSCR9/TBL2/LIMK1/RFC2/CYLN2x2)	ne
21	Williams	46,XX	ish 7q11.23 (FZD9/WBSCR9/TBL2/LIMK1/RFC2/CYLN2x2)	ne
22	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
23	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
24	Angelman	46,XX	ish (15q11-q13)(UBE3A/D15S10x2)	ne
25	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
26	Angelman	46,XX	ish (15q11-q13)(UBE3A/D15S10x2)	ne
27	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
28	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
29	Wolf-Hirschhorn	46,XY	ish 4p16.3 (D4S166/D4S3327x2)	ne
30	Williams	46,XX	nuc ish 7q11.23 (FZD9/WBSCR9/TBL2/LIMK1/RFC2/CYLN2x2)	ne
31	Smith-Magenis	46,XX	ish 17p11.2 (FL1-)	ano
32	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
33	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
34	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
35	Williams	46,XY	nuc ish 7q11.23 (FZD9/WBSCR9/TBL2/LIMK1/RFC2/CYLN2x2)	ne
36	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
37	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
38	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
39	DiGeorge	46,XY	ish del(22)(q11.2 q11.2)(HIRA-)	ano
40	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
41	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
42	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne

Číslo pacienta	Pracovní dg (fenotyp) pacienta	Karyotyp	Nález FISH (zjednodušený zápis dle ISCN 2005)	delece prokázána
43	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
44	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
45	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
46	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
47	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
48	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
49	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
50	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
51	Williams	46,XX	ish 7q11.23 (FZD9/WBSCR9/TBL2/LIMK1/RFC2/CYLN2x2)	ne
52	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
53	Williams	46,XY	ish 7q11.23 (FZD9/WBSCR9/TBL2/LIMK1/RFC2/CYLN2x2)	ne
54	DiGeorge	46,XY	ish del(22)(q11.2 q11.2)(HIRA-)	ano
55	DiGeorge	46,XX	ish del(22)(q11.2 q11.2)(HIRA-)	ano
56	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
57	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
58	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
59	Smith-Magenis	46,XY	ish 17p11.2 (FL1x2)	ne
60	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
61	Williams	46,XX	ish 7q11.23 (FZD9/WBSCR9/TBL2/LIMK1/RFC2/CYLN2x2)	ne
62	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
63	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
64	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
65	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
66	Williams	46,XY	ish 7q11.23 (FZD9/WBSCR9/TBL2/LIMK1/RFC2/CYLN2x2)	ne
67	DiGeorge II	46,XX	ish 10p14 (D10S585x2)	ne
68	Williams	46,XX	ish 7q11.23 (FZD9/WBSCR9/TBL2/LIMK1/RFC2/CYLN2x2)	ne
69	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
70	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
71	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
72	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
73	Williams	46,XX	ish 7q11.23 (FZD9/WBSCR9/TBL2/LIMK1/RFC2/CYLN2x2)	ne
74	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
75	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
76	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
77	Williams	46,XY	ish 7q11.23 (FZD9/WBSCR9/TBL2/LIMK1/RFC2/CYLN2x2)	ne
78	DiGeorge	46,XY	ish del(22)(q11.2 q11.2)(HIRA-)	ano
79	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
80	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
81	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
82	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
83	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
84	DiGeorgell	46,XY	Ish 10p14 (D10S585x2), 22q11.2(TUPLEx2),22qter(N85A3x2)	ne
85	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne

Číslo pacienta	Pracovní dg (fenotyp) pacienta	Karyotyp	Nález FISH (zjednodušený zápis dle ISCN 2005)	delece prokázána
86	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
87	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
88	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
89	DiGeorge	46,XX	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
90	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne
91	DiGeorge	46,XY	ish 22q11.2 (HIRAx2)	ne

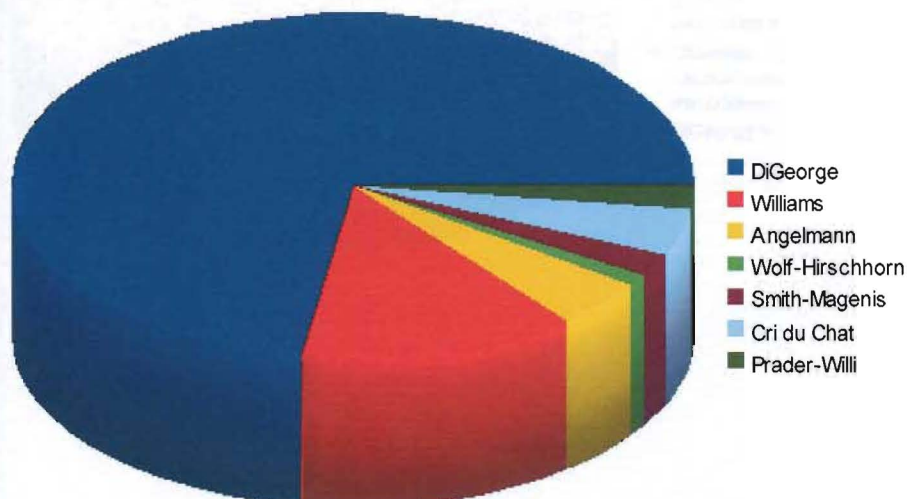
Tab.9: Prokázané mikrolece u jednotlivých pacientů

Číslo pacienta	Dg pacienta	Fenotyp pacienta	Molekulárně cytogenetický nález pacienta (výsledek FISH)
1	Angelman	těžká mentální retardace, epilepsie, nestabilní chůze, bezdůvodný smích	Mikrolece 15q12
2	Prader - Willi	morbidní obezita, zlost na lačno, mentální retardace, hypotonie	Mikrolece 15q12
3	Williams	mentální a růstová retardace, dysmorfie obličeje – elfin face , hyperkalcémie	Mikrolece 7q11.23
10	Cri-du-Chat	těžká mentální retardace, hypertelorismus, opožděný motorický vývoj	Mikrolece 5p15.31
11	Cri-du-Chat	těžká psychomotorická retardace, okrouhlá tvář,	Mikrolece 5p15.2
13	DiGeorge	rozštěp patra, stp. operaci umbilikální hernie, mentální retardace, VCC- Fallotova tetralogie.	Mikrolece 22q11.2
19	DiGeorge	VCC-pravostranný aortální oblouk, stp. operaci patra, faciální stigmatizace, umbilikální hernie.	Mikrolece 22q11.2
31	Smith-Magenis	porucha růstu, orofaciální stigmatizace, automutilace, lehká anomálie levé ledviny, lehký defekt síňového septa, mikrocytární anémie, velmi kariézní, rozpadající se měkké, načernalé zuby, trombocytopenie	Mikrolece 17p11.2
39	DiGeorge	stp. operaci palatoschisis, krátké patro, retence zubů; malé, rotované dysplastické uši, plochý obličej, mentální retardace, bez VCC; do 8 let inverze spánku, okusování prstů (autoagrese)	Mikrolece 22q11.2
54	DiGeorge	VCC-společný truncus, pravostranný aortální oblouk, levostranná arteria lusoria	Mikrolece 22q11.2
55	DiGeorge	Bez VCC, dysmorfie obličeje	Mikrolece 22q11.2
78	DiGeorge	VCC-defekt komorového septa, hypokalcémie, PMR, porucha sluchu, rozštěp patra, dysplázie lopatky a klíčku vlevo, u matky a babičky trombocytopenie	Mikrolece 22q11.2

Z tabulky 7 i z grafu 3 vyplývá, že DiGeorge syndrom, resp. mikrodelece, které s ním souvisí (zejména mikrodelece chromozomu 22q11.2), patří v této práci mezi nejčastěji vyšetřované. K analýze FISH se zaměřením na tuto aberaci bylo odesláno celkem 66 pacientů, z nichž u dvou jsme zjišťovali vzácnější delecí chromozomu 10p14.

Druhým nejastěji vyšetřovaným patří v této práci Williamsův-Beurenův syndrom, kde bylo indikováno 12 pacientů. V daleko menším počtu jsem vyšetřovala delecce zodpovědné za syndromy Cri-du-Chat (4 případy), Angelman (4 případy), Smith-Magenis (2 případy), Prader-Willi (2 případy) a Wolf-Hirschhorn (1 případ).

Graf 3: Vyšetřované mikrodeleční syndromy



6.3 Výsledky vyšetření mikrodelece chromozomu 22q11.2 metodou FISH

K vyšetření mikrodelece chromozomu 22q11.2 bylo odesláno celkem 66 pacientů. Z nich v 6 případech byla tato aberace prokázána metodou FISH. Výsledky jsou zřejmé z grafu č. 4. Následující výběr fotografií (foto 9 – foto 12) dokumentuje výsledky analýzy FISH u pacientů s prokázanou a neprokázanou mikrodelecí chromozomu 22q11.2.

U dvou pacientů (č. 67 a 84) s velmi suspektním fenotypem pro syndrom DiGeorge však mikrodelece 22q11.2 prokázána nebyla. Proto jsme po konzultaci s klinickým genetikem provedli vyšetření méně časté mikrodelece 10p14, která vyvolává podobné fenotypové abnormality (tzv. syndrom DiGeorge II). Analýza této aberace se v molekulárně

cytogenetické laboratoři ÚBLG UK 2.LF a FNM dosud neprováděla, proto byla úkolem mé práce nejen samotná diagnostika, ale také ověření nové sondy „DiGeorge II Probe“ od firmy Kreatech (viz též kapitola 5 – tabulka použitých sond). Výsledky hybridizace ukázaly, že uvedená sonda poskytuje dobře vizuálně pozorovatelné i počítačově hodnotitelné signály (viz foto 13). Delece 10p14 však nebyla zjištěna ani u jednoho z uvedených pacientů.

Graf 4: Podíl pacientů s molekulárně cytogeneticky prokázanou a neprokázanou mikrodeleci 22q11.2, resp. 10p14

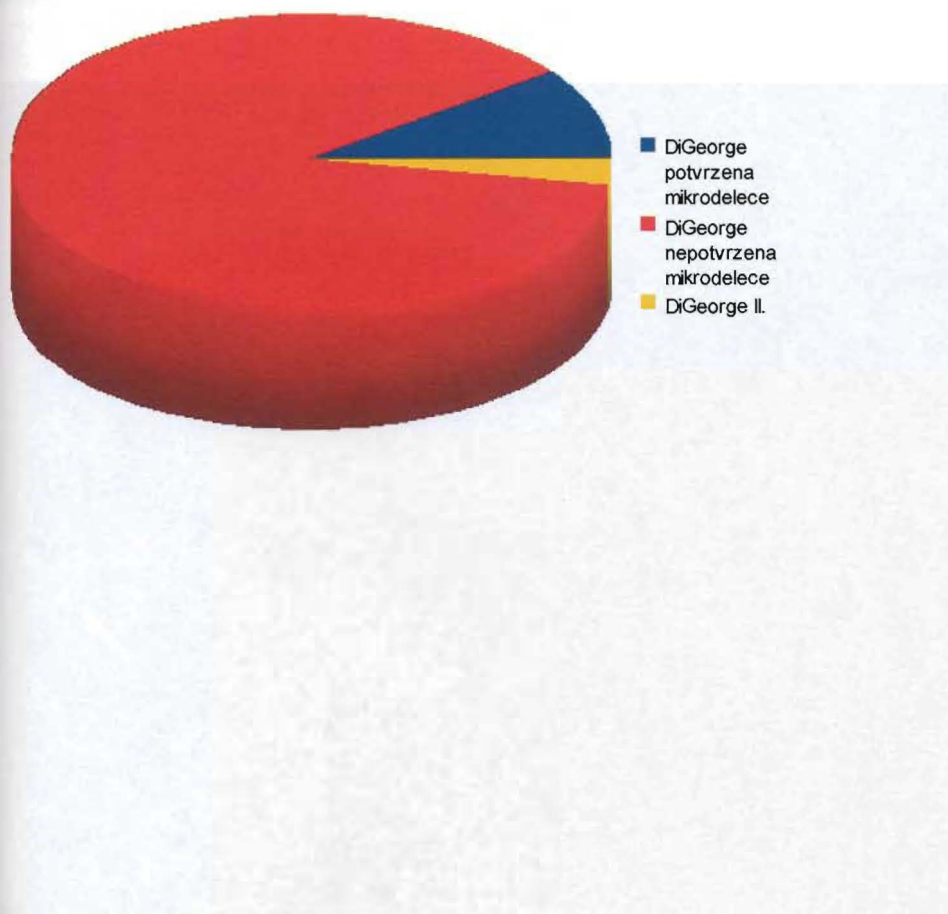


Foto 9. Mikrodelece chromozomu 22q11.2 prokázaná metodou FISH na metafázních chromozomech obarvených roztokem DAPI. Sonda hybridizující s genem HIRA (dříve TUPLE1) a okolními sekvencemi v kritické oblasti syndromu DiGeorge je značena červeně. Kontrolní subtelomerická sonda (klon N85A3), která hybridizuje s úsekem 22q13.3, je značena zeleně. Na snímku metafázních chromozomů (barvených roztokem DAPI) pozorujeme dva zelené signály kontrolní sondy, které prokazují přítomnost obou chromozomů 22. Pouze na jednom z těchto chromozomů je však přítomen také červený signál sondy na lokusu HIRA. Znamená to, že šipkou označený druhý chromozom bez červeného signálu kritický region HIRA neobsahuje a je tedy deletován.

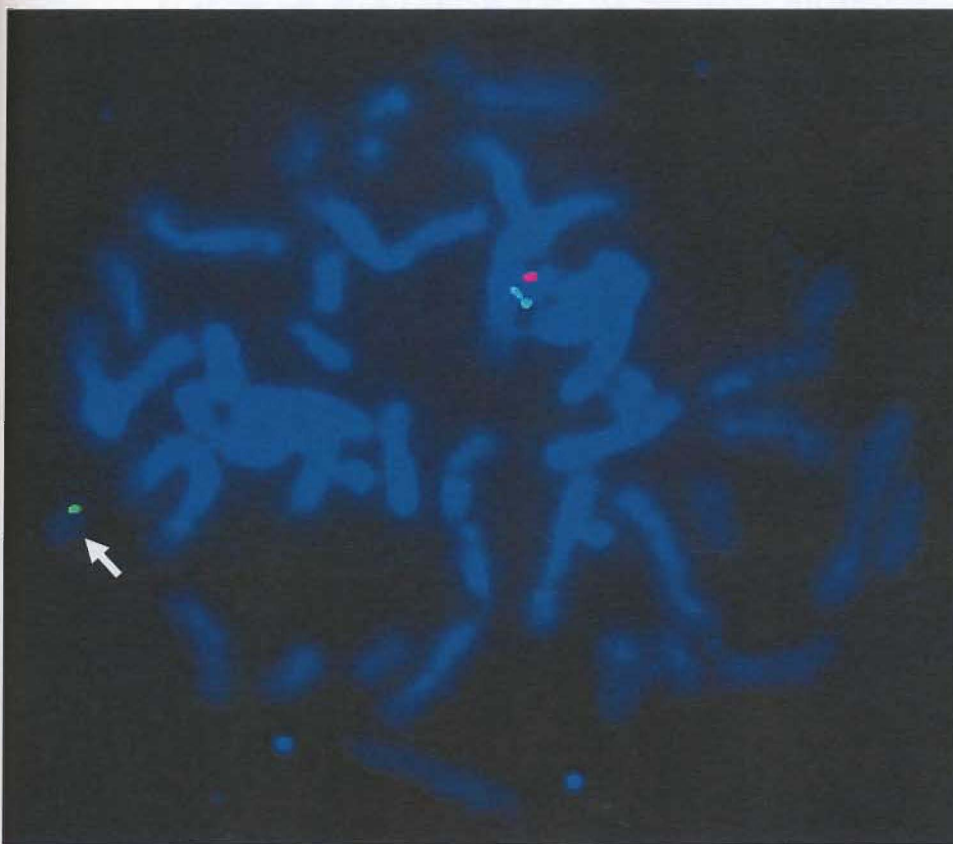


Foto 10. Jiná ukázka pozitivního molekulárně cytogenetického nálezu mikródelece 22q11 na metafázních chromozomech. Výsledek vyšetření FISH je stejný jako u předchozího fota 9. Na snímku můžeme vidět dva zelené signály kontrolní sondy a pouze jeden červený signál kritické sondy. Proto lze uzavřít, že chromozom bez červeného signálu označený šipkou je deletován.

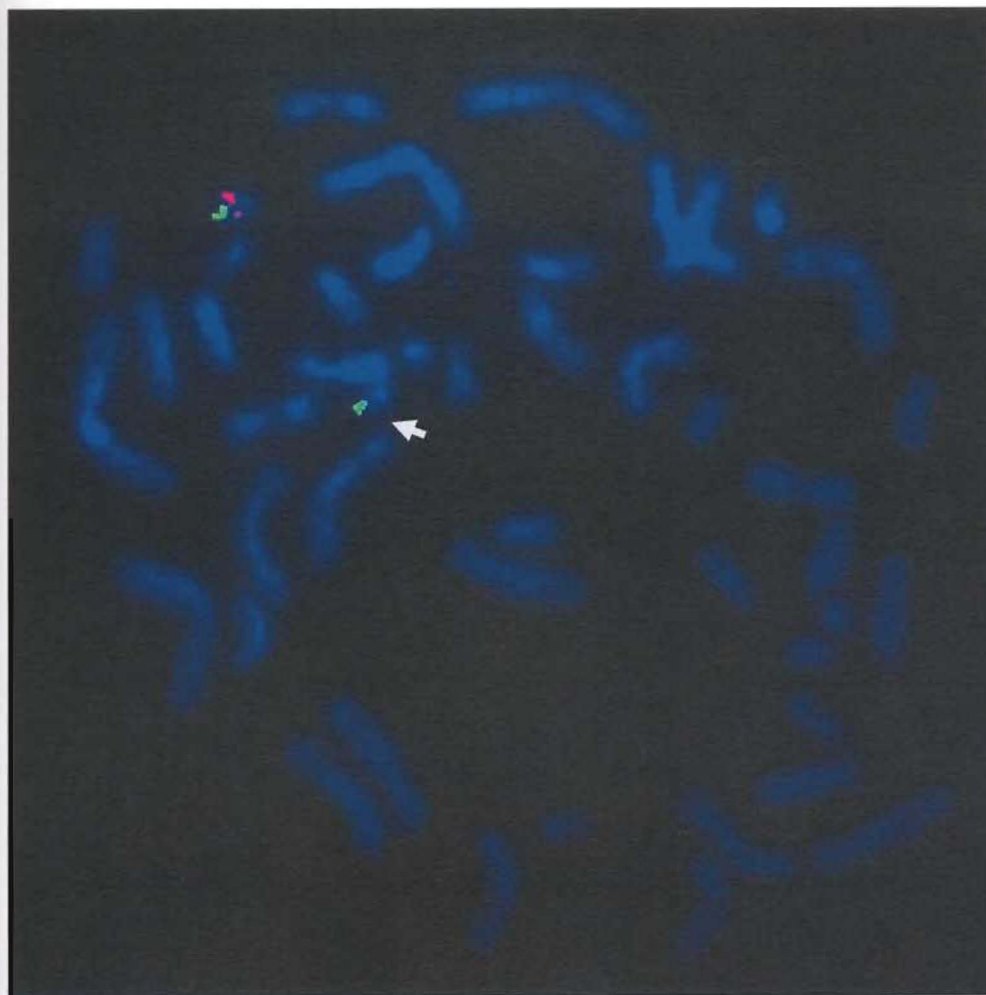


Foto 11. Mikrodelece chromozomu 22q11.2 diagnostikovaná metodou FISH na interfázním jádře. Byly použity stejné sondy jako v předchozích případech (viz doprovodný text k fotu 9). Na snímku pozorujeme interfázní jádro, které má dva zelené signály kontrolní sondy, které signalizují správnost použité sondy. Dále vidíme jen jeden červený signál sondy na lokusu HIRA. Znamená to, že kritický region (označený šipkou a popisem „HIRA“) je přítomen pouze na jednom z chromozomů 22, zatímco na druhém chybí. To dokazuje mikrodeleci chromozomu 22q11.

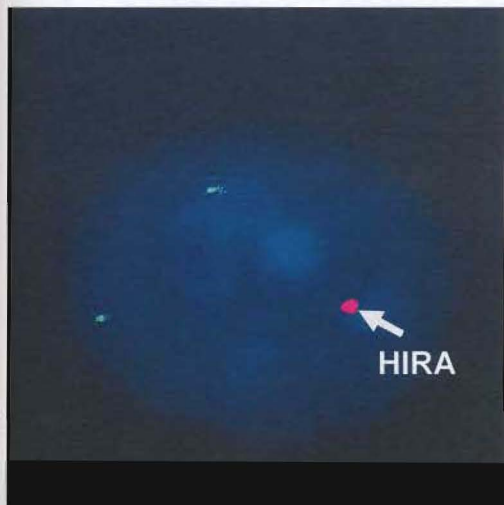


Foto 12. Neprokázaná mikrodelece 22q11 vyšetřovaná metodou FISH na interfázním jádře. Byly použity stejné sondy jako v předchozích případech (viz doprovodný text k fotu 9). Na snímku můžeme vidět interfázní jádro se dvěma zelenými signály kontrolní sondy, a dva červené signály sondy na kritickém regionu. Znamená to, že kritický region je přítomen na obou chromozomech 22 a ani jeden z nich tedy není deletován.

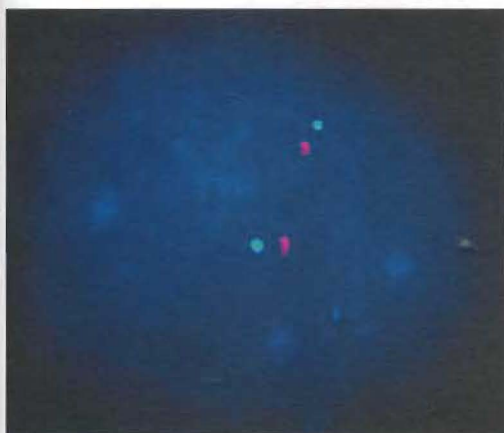
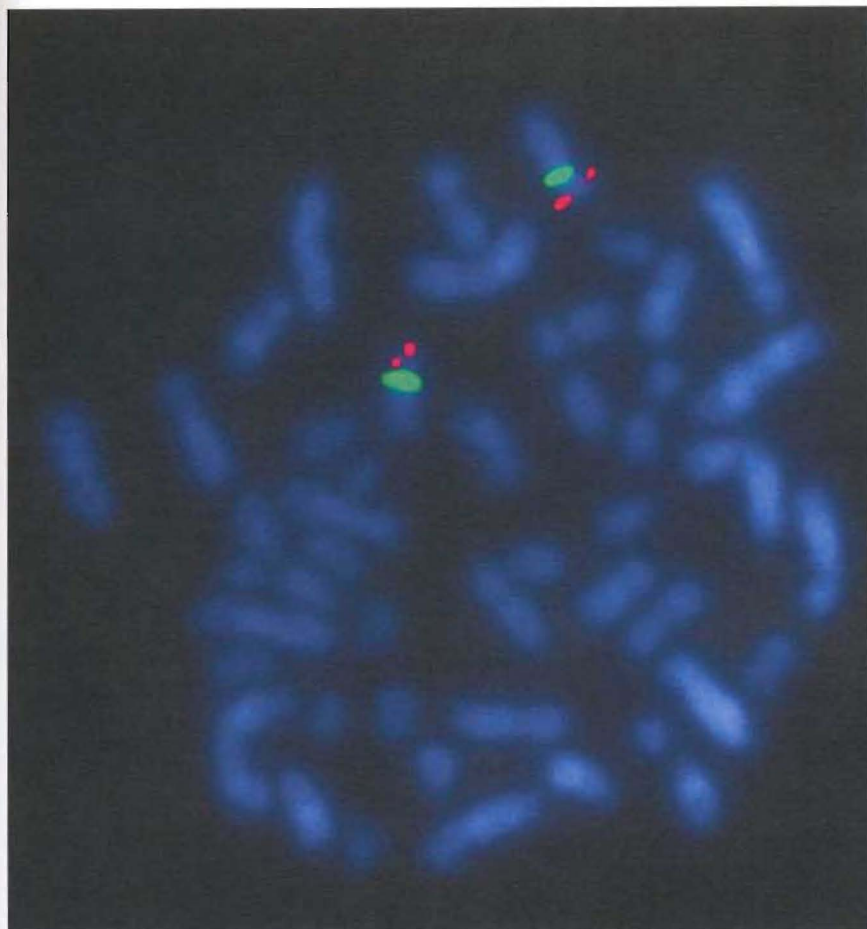


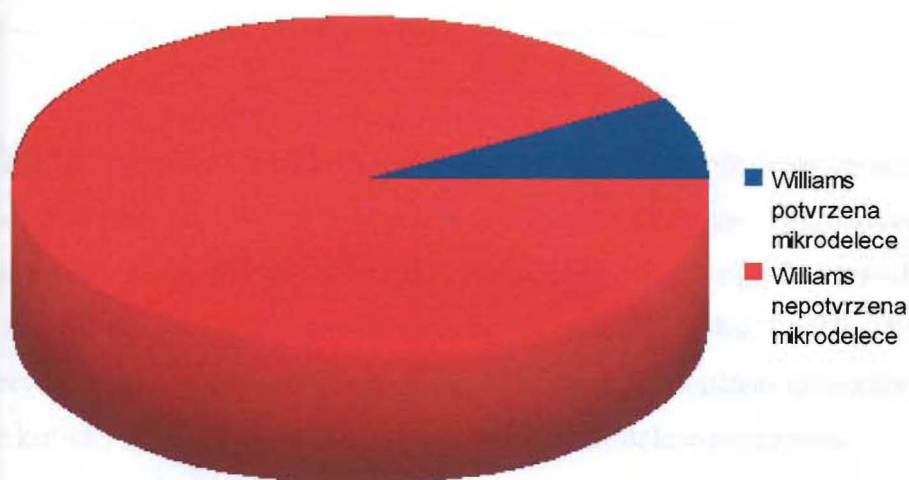
Foto 13: Výsledek vyšetření suspektní mikrodelece 10p14 metodou FISH. Kritický region na chromozomu 10p14 hybridizuje s červeně značenou lokus-specifickou sondou. Jako kontrola byla použita alfa satelitní sonda na centromeru chromozomu 10. Protože jsou oba chromozomy 10 hybridizují s červeně značenou sondou, delece není prokázána.



6.4 Výsledky vyšetření mikrodelece chromozomu 7q11.23 metodou FISH

K vyšetření Williamsova-Beurenova syndromu bylo indikováno 12 pacientů. Z nich však byla mikrodelece 7q11.23 diagnostikována metodou FISH pouze u jednoho pacienta. Výsledky jsou zřejmé z grafu č. 5.

Graf 5. Prokázaná / neprokázaná mikrodelece 7q11.23 metodou FISH.



6.5 Výsledky molekulárně cytogenetických vyšetření dalších mikrodelečních syndromů

Kromě výše uvedených syndromů byli vyšetřeni rovněž pacienti se suspektními syndromy Angelman, Prader-Willi, Cri-du-Chat, Smith-Magenis a Wolf-Hirschhorn. Vzhledem k malému počtu pacientů nelze výsledky analýzy FISH u těchto méně častých mikrodelecí souborněji hodnotit. Níže uvedená tabulka č.10. uvádí pouze přehled těchto vyšetření. Příklady konkrétních výsledků FISH dokumentuje foto 14 – foto 15.

Tab.10: Souhrn výsledků vyšetření ostatních, méně častých mikrolečních syndromů.

Syndrom	Chromozomová lokalizace mikrolece	Počet vyšetřených pacientů	Počet pozitivních nálezů
Cri-du-Chat	5p15.2	4	2
Angelman	15q12	4	1
Prader-Willi	15q12	2	1
Smith-Magenis	17p11.2	2	1
Wolf-Hirschhorn	4p16.3	1	0

Foto 14. Negativní molekulárněcytogenetický nález mikrolece chromozomu 15q11-q13 (u pacienta č. 8 se suspektním Angelmanovým syndromem) na metafázních chromozomech. Na výsledku FISH pozorujeme zelené signály kontrolní sondy (klon 154P1) v subtelomerických oblastech obou chromozomů 15. Na každém z nich je přítomen také červený signál sondy na lokusu SNRPN/IC, který je součástí kritického regionu. Znamená to, že kritický region je přítomen, a proto není mikrolece prokázána.

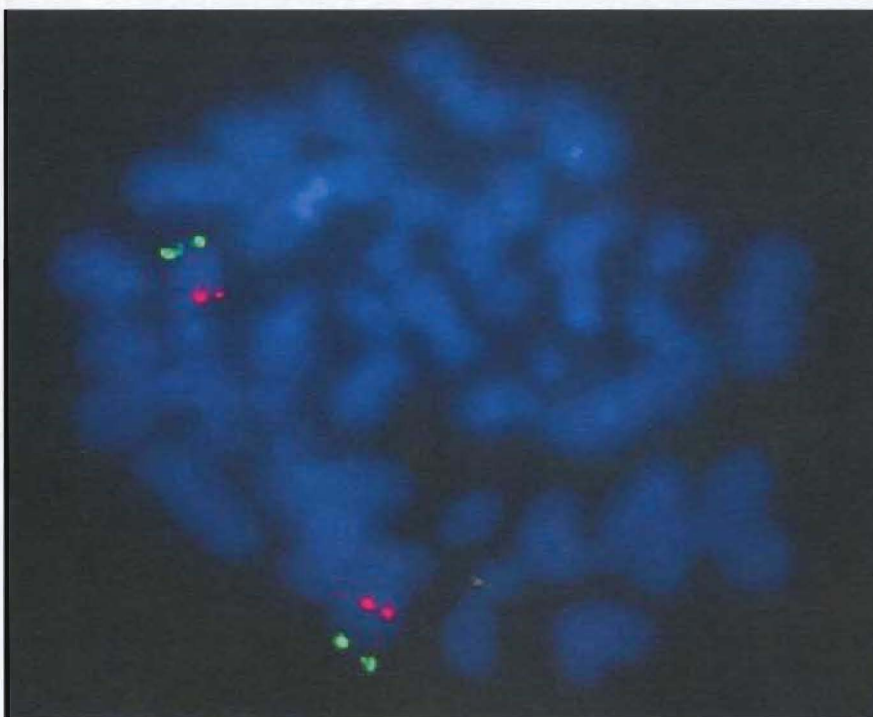
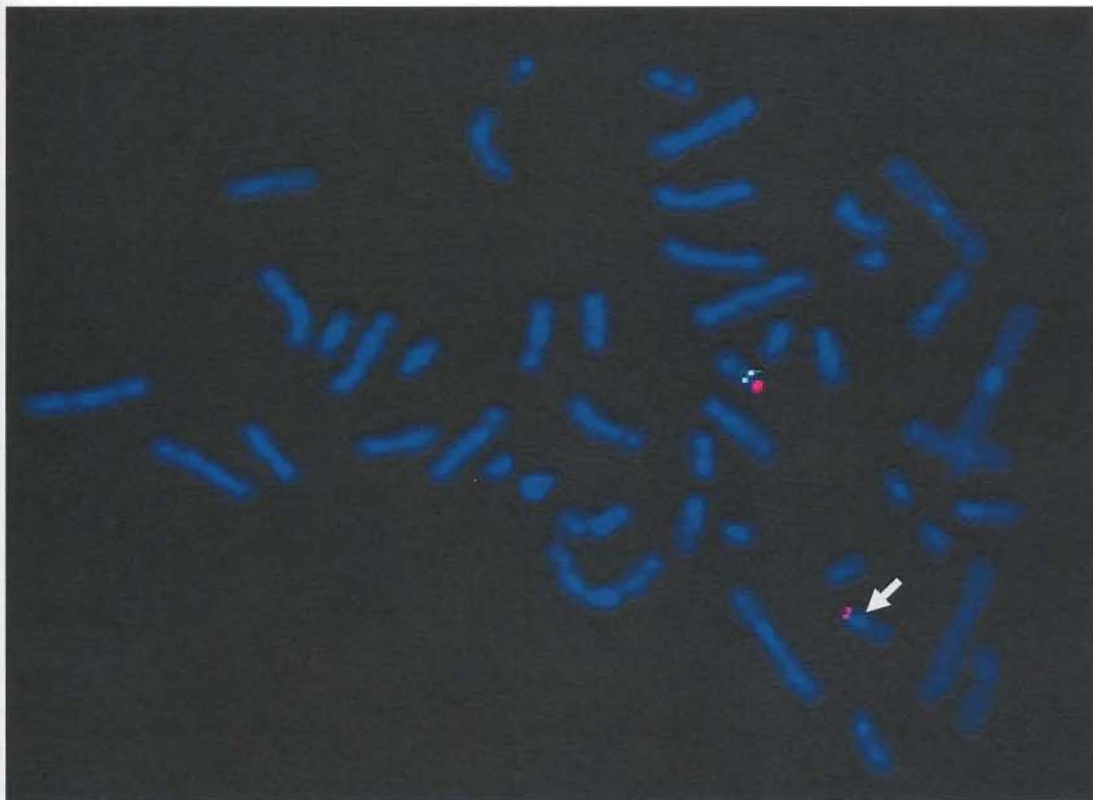


Foto 15. Prokázaná mikrodelece chromozomu 17p11.2 u pacienta č. 31 se syndromem Smith-Magenis. K vyšetření byla použita metoda FISH, metafázní chromozomy jsou obarveny roztokem DAPI. Na snímku pozorujeme dva červené signály kontrolní sondy na lokusech LIS1 (17p13.3). Na jednom z chromozomů je přítomen také zelený signál sondy, která hybridizuje s lokusem FL1 v kritickém regionu. Druhý chromozom bez zeleného signálu (označený šipkou) je v pruhu 17p11.2 deletován.



6.6 Vyšetření familiárního výskytu mikrodelecí

V šesti případech jsme mikrodeleci vyšetřili u většího počtu rodinných členů se zaměřením na možný familiární výskyt. Výsledky uvádějí tabulky 8 – 17. V jednom případě jsme sledovali familiární výskyt mikrodelece chromozomu 7q11.23, v ostatních pěti rodinách výskyt mikrodelece chromozomu 22q11.2. V případě rodiny V. (viz tab. 15) jsme prokázali výskyt mikrodelece 22q11.2 u matky a jejího syna (pacienta č. 54), který zemřel 6 dnů po narození. Příčinou úmrtí byla závažná VVV srdce (blíže viz tab. 8). V ostatních případech šlo o izolovaný výskyt mikrodelece bez nálezu dalšího postiženého člena rodiny.

Tab.11. Rodina I. - Familiární výskyt mikrodelece 7q11.23

Pacient	Otec (pac. č. 20)	Dcera (nevyšetřena u nás)
Věk v době vyšetření	30	9
Prokázaná mikrodelece 7q11.23		+
Neprokázaná mikrodelece 7q11.23	+	
Hyperkalcemie		+
Srdeční anomálie	+	
Mentální retardace		+
Ostatní		makrostomie

Tab.12. Rodina II. - Familiární výskyt mikrodelece 22q11

Pacient	Otec (pac. č. 34)	Matka (pac. č. 33)	Dcera (nevyšetřena u nás)
Věk v době vyšetření	30	34	2
Prokázaná mikrodelece 22q11.2			+
Neprokázaná mikrodelece 22q11.2	+	+	
VCC	+		+
Anomálie patra			+
Dysmorfie obličeje			+
Ostatní			umbilikální hernie

Tab.13. Rodina III. - Familiární výskyt mikrodelece 22q11

Pacient	Matka (pac. č. 38)	Dcera (pac. č. 19)
Věk v době vyšetření	31	6
Prokázaná mikrodelece 22q11.2		+
Neprokázaná mikrodelece 22q11.2	+	
VCC	+	
Anomálie patra		+
Dysmorfie obličeje		+
Mentální retardace		+
Ostatní		retence zubů, okusování prstů -autoagrese

Tab.14. Rodina IV.-Familiární výskyt mikrodelece 22q11

Pacient	Otec (pac. č. 48)	Matka (pac. č. 49)	Mladší syn (pac. č. 39)	Starší syn (pac. č. 79)
Věk v době vyšetření	41	41	14	16
Prokázaná mikrodelece 22q11.2			+	
Neprokázaná mikrodelece 22q11.2	+	+		+
VCC			+	
Anomálie patra			+	
Dysmorfie obličeje				
Ostatní	porucha sluchu			

Tab.15. Rodina V.-Familiární výskyt mikrodelece 22q11

Pacient	Matka (pac. č.55)	Syn (pac. č. 54)	Starší dcera (pac. č. 58)	Mladší dcera (pac. č. 57)
Věk v době vyšetření	33	6 dní	11	4
Prokázaná mikrodelece 22q11.2	+	+		
Neprokázaná mikrodelece 22q11.2			+	+
VCC		+		
Anomálie patra			+	
Dysmorfie obličeje				
Ostatní		exitus v 10 dnech		

Tab.16. Rodina VI.-Familiární výskyt mikrodelece 22q11

Pacient	Matka (pac. č. 89)	Otec (pac. č. 90)	Syn (pac. č. 78)
Věk v době vyšetření	31	48	9
Prokázaná mikrodelece 22q11.2			+
Neprokázaná mikrodelece 22q11.2	+	+	
VCC			+
Anomálie patra			+
Dysmorfie obličeje			
Ostatní	porucha sluchu		dysplázie lopatky

7. Diskuse

7.1 Metodické možnosti FISH

Cílem tohoto studia bylo získat teoretické a především praktické dovednosti v oblasti základních cytogenetických a molekulárně-cytogenetických metod, zejména FISH. Současně jsem ověřila protokoly FISH používané v molekulárněcytogenetické laboratoři ÚBLG FNM a v molekulárně cytogenetické laboratoři Pronatal podle standardních operačních postupů (26, 27). Úspěšné a dobře hodnotitelné výsledky hybridizace ukazují, že použité protokoly FISH, které se liší v nepatrných a nepodstatných detailech jsou pro rutinní klinickogenetickou diagnostiku zcela vyhovující.

Současně jsem do laboratorní praxe zavedla sondu „DiGeorge II Region Probe“ od firmy Kreatech. Výsledky vyšetření prvních dvou pacientů ukazují, že sonda při dodržení standardního postupu poskytuje velmi dobře pozorovatelné a hodnotitelné signály (viz foto 13). Úprava laboratorního protokolu (tj. podmínek pro hybridizaci nebo pro odmývání nespecifických signálů – tzv. „stringent washing“) tedy v jejím případě není nutná. Pro spolehlivé posouzení by však bylo třeba provést hybridizaci s větším počtem vzorků, což časový rámec mé bakalářské práce nedovolil.

Metoda FISH je oproti mnoha jiným molekulárněbiologickým metodám méně pracná, slouží k rychlejší detekci delecí, ale její klasický protokol využívající jednotlivých centromerických, resp. lokus specifických sond bohužel neumožňuje komplexní analýzu zaměřenou na identifikaci většího počtu aberací (2).

V současnosti existují nové metody molekulární genetiky, které umožňují přesnější, rychlejší a méně nákladné diagnostikování mikrodelečních syndromů. Mezi takové metody patří především metoda MLPA, jejíž význam v současnosti výrazně stoupá na úkor donedávna nejvyužívanější metody FISH (20).

Přesto lze uzavřít, že k optimální diagnostice mikrodelecí a k získání relevantních závěrů nezátížených falešně pozitivními nebo falešně negativními výsledky je nejvhodnější kombinovat výsledky různých metod, konkrétně FISH a MLPA. Předpokládám proto, že i v budoucnosti zůstane FISH důležitou pomocnou metodou v klinickogenetických laboratořích.

Kromě ověření základního laboratorního protokolu jsem v této bakalářské práci měla možnost vyzkoušet a srovnat počítačové programy LUCIA Karyo i ISIS (Metasystems)

k analýze a k dalšímu zpracování mikroskopického obrazu, popř. k jeho archivaci do souboru dat o vyšetřovaných pacientech. Oba systémy umožňují základní zpracování obrazu v mikroskopu do podoby vhodné pro dokumentaci výsledků v genetické laboratoři.

Ze srovnání těchto dvou systémů od snímání po úpravu obrazů metafázních chromozomů či jader v interfázi však vyplývá, že počítačový program LUCIA je na rozdíl od počítačového programu ISIS citlivější a v určitých ohledech snadněji zpracovává mikroskopické obrazy. Pomocí programu LUCIA lze jednodušeji měnit intenzity jednotlivých barevných vrstev a lépe zacílit analýzu obrazu tak, aby byly zpracovávány signály pouze v určité, často velmi malé ploše.

7.2 Výsledky základní cytogenetické analýzy

Z uvedených výsledků vyplývá, že ani u jednoho z pacientů s molekulárně cytogeneticky prokázanou mikrolecí nebyla při základním chromozomovém vyšetření pozorována žádná chromozomová změna. Toto zjištění je v plné shodě s dosud dostupnými údaji podle nichž lze kryptické delece vizuálně pozorovat pouze asi u 1% pacientů s mikrolečnými syndromy, a to většinou pouze na málo kondenzovaných metafázních chromozomech získaných technikou HRT (1, 2). Z tohoto hlediska jsou FISH a další molekulárněcytogenetické metody při vyšetření mikrolečných syndromů zcela nezastupitelné a mají klíčový význam při stanovení konečné diagnózy.

7.3 Molekulárněcytogenetické vyšetření mikrolečných syndromů

Dalším cílem bylo porovnat molekulárně cytogenetický nálezný s fenotypem vyšetřených pacientů. Abychom toho dosáhli, museli jsme zjistit základní údaje o klinickém stavu, resp. fenotypu pacienta, které jsme pak srovnali s výsledkem molekulárně cytogenetické analýzy. Celkově lze konstatovat, že uvedené výsledky korespondují s recentními údaji o uvedených mikrolečných syndromech (např. 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36). V dalším textu se zabývám některými konkrétními výsledky.

7.4 Záchyt mikrolecí v souboru pacientů

Do této práce bylo zahrnuto 66 pacientů s podezřením na DGS, z nichž jsme prokázali metodou FISH mikroleci 22q11 u 6 vyšetřených pacientů. V testovaném souboru pacientů

činí záchyt mikrolece 9%. Uvedené výsledky v zásadě korespondují s literárními údaji (41). Přesto je záchyt těchto delecí nižší, než uvádí např. Kočárek a kol. (35). Je to způsobeno tím, že v současnosti se indikuje k vyšetření (ve srovnání s předchozími roky) stále více pacientů a to i takových, kteří nemají příliš typický fenotyp (Kočárek – ústní sdělení). Vzhledem k výrazné fenotypové variabilitě klinických projevů asociovaných s mikrolecí chromozomu 22q11.2 se však zvyšuje pravděpodobnost záchytu některých méně typických a případů, jejichž dokumentace může výrazně rozšířit klinické poznatky. Musíme dát za pravdu, že fenotypová variabilita u mikrolece 22q11.2 je velmi rozsáhlá, protože kritická oblast zahrnuje až 40 genů. Díky této škále genů se mohou syndromy asociované s touto mikrolecí ve svých příznacích překrývat (8).

U pacientů s mikrolecí 22q11 jsme mohli zaregistrovat nejčastěji tyto srdeční vady: pravostranný oblouk aorty (2 případy), pravostranný oblouk aorty + truncus arteriosus communis (1 případ) a defekt komorového septa (2 případy). Jedna osoba neměla žádnou srdeční vadu. Dále jsme si všimli častého výskytu anomálie patra, nejčastěji rozštěpu, který jsme prokázali u 3 pacientů z 6, což činí 50% pacientů s diagnostikovaným DiGeorgeovým syndromem. Proto se zdá, že VVV srdce a anomálie patra, popř. orofaciální stigmatizace budou i nadále používány, jako hlavní indikující parametr k cílenému vyšetření mikrolece chromozomu 22q11.2. To odpovídá také dosud publikovaným údajům (9, 35, 41). Na základě těchto údajů se domníváme, že prenatální vyšetření mikrolece 22q11 metodou FISH by mělo nabídnuto všem těhotným ženám, jejichž plody mají diagnostikovanou těžší srdeční vadu.

K daleko vzácnějším nálezům, které jsme u pacientů v našem souboru nezaznamenali, můžeme zařadit např. anomálie CNS, rozštěp páteře či hypoplazie mozečku, které dokumentují některé práce – např. Nickel a kol. (40).

Nelze však také vyloučit, že mezi pacienty s neprokázanou mikrolecí se vyskytly i případy se změnami malého rozsahu (tj. menšími delecemi nebo dokonce pouze bodovými mutacemi genů v kritické oblasti), které nejsou metodou FISH s běžně používanými sondami zjištělné (41). V současnosti se proto v cytogenetické laboratoři ÚBLG FNM zavádí metoda arrayCGH, s jejíž pomocí budou pacienti dovyšetřeni. To se týká nejen DGS, ale také WBS a dalších mikrolečních syndromů.

Výskyt mikrolece chromozomu 10p14 je velmi vzácný (Bartsch – osobní sdělení), a proto jsme ho nediodagnostikovali ani u jednoho ze dvou námi vyšetřených případů. Dříve se v literatuře objevovaly pochybnosti, zda tento syndrom vůbec existuje (37).

U Praderova-Williho a Angelmanova syndromu souvisí nízký záchyt také se skutečností, že většina pacientů není molekulárně cytogeneticky vyšetřována, ale jejich vzorky DNA jsou zasílány přímo k molekulárněbiologickému vyšetření podle algoritmu popsaného v práci Čalounové a kol. (39). Problémem u těchto syndromů je také poměrně vysoký výskyt dizomických, metodou FISH nediodagnostikovatelných forem (2, 39). Do budoucna by bylo však vhodné uvážit, zda by analýza FISH neměla být pro spolehlivější potvrzení diagnózy prováděna i u případů vyšetřených jinými molekulárněbiologickými metodami (44, 45).

Zajímavým výsledkem je pozitivní nález poměrně vzácného syndromu Smith-Magenis. Jde o typický případ, jehož fenotyp odpovídá popisu v literatuře (46).

Výsledky vyšetření dalších syndromů, které jsou v práci prezentovány, nelze pro relativně malý počet pacientů komplexněji hodnotit a komentovat. Záchyt těchto delecí je obecně nízký.

7.5 Familiární výskyt mikrodelece chromozomu 22q11 a 7q11.23

U 5 pacientů s prokázanou mikrodelecí chromozomu 22q11.2 jsme vyšetřili také jednoho nebo více jejich rodinných příslušníků (zpravidla rodičů – blíže viz tab. 11 – 16). Z těchto rodin se familiární výskyt zmíněné aberace podařilo prokázat pouze u jedné (tedy u 20% rodin v našem souboru). Tento poznatek je ve shodě s dostupnými údaji (2, 35, 38). U popsané rodiny č. V. (viz tab. 15) pozorujeme výrazně diskordantní fenotyp u osob s prokázanou mikrodelecí 22q11: Matka (pacient č.55) se dožila dospělého věku, nemá VCC, pouze dysmorfické rysy v obličeji a je schopna reprodukce. Její novorozený syn (pacient č.54) měl těžkou VCC, která se stala příčinou jeho úmrtí v 10 dnech života. Krutílková a kol. (38) uvádějí výskyt diskordantního fenotypu dokonce u monozygotních dvojčat.

Rodinný výskyt WBS je vzhledem k rozsahu postižení vzácný, téměř nulový. Ve většině případů nemá postižený jedinec potomky. Uvedené výsledky korespondují s literárními zdroji (43).

8. Závěr

Práce seznamuje s problematikou mikrodelečních syndromů a s možnostmi jejich diagnostiky prostřednictvím klasické cytogenetické analýzy a metody FISH. Během docházky do laboratoře jsem si obě metody osvojila a ověřila využití.

Výsledky jasně ukazují, že pouhá cytogenetická analýza k potvrzení diagnózy mikrodelečních syndromů nestačí, neboť v naprosté většině případů neposkytuje relevantní výsledky. Lze jí pouze využít při vyloučení rozsáhlejších chromozomových přestaveb, eventuálně aneuploidií, které by v určitých případech mohly vyvolat projevy podobné jako u některých mikrodelečních syndromů.

K diagnostice kryptických aberací podmiňujících vznik mikrodelečních syndromů je však nezbytné molekulárně cytogenetické vyšetření. Proto jsem užila analýzu FISH s vybranými lokus specifickými sondami a ověřila její metodické možnosti. Kromě sond běžně používaných ve většině laboratoří jsem se zabývala i možným využitím sondy určené k detekci mikrodelece chromozomu 10p14. Ačkoli jsem tuto delecii ani u jednoho ze dvou indikovaných pacientů neprokázala, výsledky ukazují, že sonda „Di Geoge II Region Probe“ od firmy Kreatech poskytuje při dodržení standardního protokolu dobré výsledky a nevyžaduje speciální úpravu hybridizačních podmínek nebo změnu teploty při odmývání nespecifických signálů („stringent washing“). Hybridizační signály jsme pozorovali s pomocí epifluorescenčního mikroskopu Olympus BX51 a srovnali možnosti jejich hodnocení dvěma různými počítačovými systémy. Jako vhodnější k úpravě mikroskopických obrázků se jeví systém LUCIA.

Ze sledovaného souboru 91 pacientů se podařilo detekovat různé mikrodelece u 12 pacientů s nejrůznějšími fenotypovými projevy. U zbylých 79 pacientů nebyla delece prokázána.

Nejčastějším nálezem byla mikrodelece chromozomu 22q11 prokázána u 6 pacientů. Vyšetřili jsme dva případy suspektní mikrodelece 10p14, která však nebyla metodou FISH prokázána. Záchyt této aberace je málo provděpodobný, neboť její incidence se odhaduje na 1:100 000 novorozenců.

U pacientů s mikrodelecí 22q11 jsme sledovali údaje o fenotypových projevech a srovnávali jsme je s molekulárně cytogenetickým nálezem. Výsledky analýzy námi prezentovaného souboru ukazují, že vzhledem k rozsáhlé variabilitě klinických projevů může být fenotyp u každého pacienta individuální.

Dále jsme sledovali familiární výskyt mikrodelece chromozomu 22q11 u 5 rodin. V jednom případě (u rodiny číslo V.) jsme prokázali familiární výskyt mikrodelece 22q11. Matka s touto aberací a její syn se stejným nálezem měli značně rozdílný rozsah postižení. Tento případ je dalším popsáním nálezem dokumentující diskordantní fenotyp u často velmi blízkých rodinných příslušníků se stejnou mikrodelecí. Záchyt familiární mikrodelece 22q11 tedy činí 20%. Tento podíl se může zdát poměrně nízký, avšak je v plném souladu s publikovanými údaji.

Pokud bych na studii mikrodelečních syndromů pracovala déle, jistě by byly výsledky více rozsáhlé a detailnější, s vyšší možností záchytu i dalších vzácných mikrodelecí, jakou byl např. Smith-Magenis syndrom.

Závěrem lze konstatovat, že molekulární genetiky je stále rozvíjející se obor. V laboratořích jsou zaváděny stále dokonalejší, kvalitnější a rychlejší metody k diagnostice mikrodelecí a každé pracoviště se může rozhodnout pro metodu, kterou považuje za maximálně vhodnou. Zdá se však, že vzhledem ke své relativní jednoduchosti a dobré reprodukovatelnosti zůstane metoda FISH nadlouho jednou ze základních diagnostických postupů umožňujících diagnostiku mikrodelečních syndromů a mnoha dalších chromozomových aberací. Lze však předpokládat, že v budoucnosti budou její výsledky stále častěji kombinovány, popř. srovnávány s výsledky jiných, zejména molekulárně biologických vyšetření (např. metodou MLPA nebo arrayCGH).

9. Seznam použité literatury

1. Michalová K. (1999): Úvod do lidské cytogenetiky. 1.vydání, Brno : Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví (Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů).
2. Kočárek E., Pánek M., Novotná D.: Klinická cytogenetika I. Karolinum, Praha, 2006
3. Sršeň, Š., Sršňová, K.: Základy klinické genetiky a její molekulární podstata. Osveta, Martin, 2000
4. http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.sandoz.sk/img/chromozomy/y.jpg&imgrefurl=http://www.sandoz.sk/home.php%3Fid%3D90%26category%3D4%26subid%3D348%2612_id%3D350&h=200&w=100&sz=8&hl=cs&start=60&tbnid=11bgM4_yQrr7LM:&tbnh=104&tbnw=52&prev=/images%3Fq%3DCHROMOZOM%2BY%26start%3D40%26gbv%3D2%26ndsp%3D20%26hl%3Dcs%26sa%3DN
5. Hájek Z., Kulovaný E., Macek M.: Základy prenatální diagnostiky. Grada, Praha, 2000
6. Selikowitz M.: Downův syndrom. Portál, Praha, 2005
7. Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F.: Klinická genetiky. 6.vydání, Triton, Praha 2004
8. Seemanová E.: Mikrodeleční syndromy. Časopis lékařů českých, 141, 2002, No.12, p. 363-370
9. Kočárek E., Vejvalková Š., Novotná D., Zapletal R., Strnad M., Novotná K., Puchmajerová A., Simandlová M., Rašková D., Koudová M., Goetz P.: Syndrom Williamsův-Beurenův, Čes.-slov.Pediat. 2000, 55, No.12,p.762-767.

10. Boyd S. G., Harden A., Patton M. A.: The EEG in early diagnosis of the Angelman syndrome. *Eur.J. Pediatr.*, 147, 1998; 6: 508-513.
11. Ďurovčíková D., Černáková I., Lukáčová M., Brozmanová M.: Smith-Magenis syndrome early diagnosis in Slovak origin patient. *Eur. J. Human. Genet*, Vol. 9, 2001; Suppl. 1: p. 197.
12. Markert M.L., Hummell D.S., Rosenblatt H. M., Schiff S.E., Harville T.O., Williams L. W., et al.: Complete DiGeorge syndrome: persistence of profound immunodeficiency. *J Pediatr*. 1998; 132(1): 15-21.
13. <http://www.wagr.org/>
14. This publication instructions BX40 system microscope 9704 M 200-1, Tokyo Japan. Propagační leták firmy Olympus.
15. <http://www.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/transmisni.jpg>
16. http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.advalytix.com/images/icons/figur_3_comparison_cgh.gif&imgrefurl=http://www.advalytix.com/hybridisation_330.htm&h=345&w=300&sz=12&hl=cs&start=1&um=1&tbnid=6e3-oiM4NWkAHM:&tbnh=120&tbnw=104&prev=/images%3Fq%3DCGH%26um%3D1%26hl%3Dcs%26lr%3D%26sa%3DN – (upraveno)
17. Kuglík P., Vranová V., Nečaslová E., Žežulková D., Štefančíková L., Filková H., Mazánek P., Štěrbá J., Veselská R.: Možnosti komparativní genomové hybridizace s vyšším rozlišením (HR-CGH) a array-CGH při detekci prognostických markerů u neuroblastomu. In II. dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie. Olomouc : Solen, 2006. ISBN 80-239-8240-0
18. Konečný M., Zavodna K., Vranova V., Vizvaryova M., Weismanova E., Mlkva I., Kuglik P., Kausitz J., Bartosova Z.: Identification of rare complete BRCA1 gene deletion using a combination of SNP haplotype analysis, MLPA and array-CGH techniques. *Breast Cancer Res Treat* [Epub ahead of print], 2007

19. Fernandez L, Lapunzina P, Arjona D, et al.: Comparative study of three diagnostic approaches (FISH, STRs and MLPA) in 30 patients with 22q11.2 syndrome. Clin Genet 2005;68:373.8.
20. <http://www.mlpa.com/pages/indexpag.html>
21. <http://www.mrc-holland.com/pages/indexpag.html>
22. <http://www.nature.com/bjc/journal/v97/n10/images/6604055f1.jpg>
23. <http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://math.berkeley.edu/~levyd/images/mfish.jpg&imgrefurl=http://math.berkeley.edu/~levyd/research%2520projects.htm&h=227&w=233&sz=14&hl=cs&start=18&tbnid=ohvgAbAOeH2LaM:&tbnh=106&tbnw=109&prev=/images%3Fq%3Dmfish%26gbv%3D2%26hl%3Dcs>
24. http://www.sdruzenidiagnozacml.cz/index.php?rubrika=6&page=clanek&clanek=13&meu_poz=&id_up_rubrika=1
25. Programmable Temperature Controlled Slide Processing System. ThermoBrite.
Propagační leták firmy StatSpin.
26. Analýza chromosomových odchylek metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH) – Standardní operační postup – interní nepublikované materiály laboratoře Pronatal
27. Analýza chromosomových odchylek metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH) – Standardní operační postup – interní nepublikované materiály ÚBLG FNM
28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=188400>
29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=601362>
30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=194050>
31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=105830>
32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=176270>
33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=182290>

34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=194190>
35. Kočárek, E. et al: Vztah genotypu a fenotypu u pacientů s mikrodeleci chromosomu 22q11. Čes.-Slov. Pediat., Vol.56, 2001, No.8, p. 427-437.
36. Devrient K. et al: Polyhydramnios as a prenatal symptom of the DiGeorge/velo-cardio facial syndrome. Prenatal diagnosis, Vol.18, 1998, No.1, p. 68-72.
37. Bartsch, O.; Wagner, A.; Hinkel, G. K.; Lichtner, P.; Murken, J.; Schuffenhauer, S. : No evidence for chromosomal microdeletions at the second DiGeorge syndrome locus on 10p near D10S585. (Letter) Am. J. Med. Genet. 83: 425-426, 1999.
38. Krutílková V., Havlovicová M., Kočárek E., Klein T., Novotná D., Hořínek A., Zapletal R., Mrázek J., Goetz P.: Familiární výskyt mikrodelece chromosomu 22q11 u monozygotních dvojčat a jejich matky s rozdílnými klinickými projevy. Čes.-Slov. Pediat., Vol.57, 2002, No.10, p. 578-581
39. Čalounová G., Bóday A., Havlovicová M., Zumrová A., Kočárek E., Novotná D., Maříková T., Apltová L., Števo J., Goetz P.: Diagnostické možnosti syndromů Prader Willi a Angelman. Čes. a Slov. Neurol. Neurochir., Vol. 68/101, 2005, No. 5, p. 284-293
40. Nickel, R.E., Pillers, D.M.A., Merkens, M., Magenis, R.E., Driscoll, D.A., Emanuel, B.S., Zonana, J. Velo-cardio-facial syndrome and DiGeorge semence with meningomyelocele and deletions of the 22q11 region. Am. J. Med. Genet., 52, 445-449, 1994.
41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=188400>
42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=601362>
43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=194050>
44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=105830>
45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=176270>
46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=182290>

10. Přílohy

Příloha 1. Názorný protokol k použití přístroje ThermoBrite

ThermoBrite™

Programmable Temperature Controlled Slide Processing System

This programmable system automates the denaturation and hybridization steps in slide-based FISH procedures, and provides walk-away convenience for clinical and research personnel. The low cost unit accepts a wide range of sample types, is easy to use, and reduces hands-on time by more than 50% while ensuring overall precision and accuracy in all FISH assays.

User Programmable Settings

- 40 user defined protocols and 3 operating modes
- Easy to read backlit display
- Numeric keypad allows for easy programming
- Can be used as a fixed temperature slide warmer



The ThermoBrite System holds up to 12 slides. The lid seals tightly when closed providing optimal chamber humidity. The system maintains uniform temperature across all slide positions. Slides can be easily added or removed with one hand. The numeric keypad allows for easy programming with 40 user programmable settings and 3 modes of operation; denaturation/hybridization, Hybridization, and Fixed Temperature.



Ideal for denaturation/hybridization of fluorescent in situ hybridization procedures

Easy to use

- Eliminates manual steps and reduces hands-on time during FISH procedures
- Slides do not need to be fully loaded to maintain temperature accuracy
- Slide guide keeps slides in place and allows for one hand removal

More stringent temperature control

- Rapid temperature ramp-up and accuracy of $\pm 1^\circ\text{C}$
- Superior temperature uniformity across all slide positions
- Optimal humidity control
- Heats slide to temperatures ideal for FISH procedures

