

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Detekce aberací genu *SHOX* u pacientů  
s nízkým vzrůstem**

**Bakalářská práce**

**Nikola Golová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2019**

**Vedoucí práce: Mgr. Zuzana Čapková**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití uvedených literárních zdrojů pod vedením Mgr. Zuzany Čapkové.

V Olomouci dne .....

## SOUHRN

Růst je jednou ze základních charakteristik sledovaných při vývoji dítěte, která umožňuje včasný záchyt různých onemocnění. Dosavadní studie uvádí, že až 2,4 % pacientů malého věku jsou nositeli aberace genu *SHOX*. Gen *SHOX* může být poškozen změnami počtu kopií genomu (CNV) a/nebo jednonukleotidovými změnami. Ačkoliv je vyšetření tohoto genu běžně indikováno pro zjištění příčiny malého věku u pacienta, stále se nedaří plně porozumět významu některých nalezených variant.

Cílem práce byla diagnostika změn v genu *SHOX* u 86 pacientů s malým věkem, u nichž byl vyloučen Turnerův syndrom, metodami multiplexové PCR a Sangerova sekvencování. Následně byla získaná genetická data korelována s klinickými nálezy (vady lebky, končetin, páteře a opožděné kostní vyžívání) u pacientů Fisherovým exaktním testem.

Metoda MLPA u 4 pacientů odhalila CNV v přilehlých oblastech genu *SHOX* (4,7 %), tři heterozygotní delece v oblasti CNE7, 8, 9 a „downstream“ a jednu heterozygotní duplikaci CNE9 a „downstream“. Sangerovo sekvencování zachytilo, mimo běžné varianty, u dvou pacientů jednonukleotidové změny v oblasti blízké exonu 3 (1,2 % a 1,2 %), u kterých dosud nebyl prokázán klinický význam (NC\_000023.11:g.634477C>G a NC\_000023.11:g.634871G>A). Nalezené genetické aberace neprokázaly významnou souvislost se sledovanými klinickými znaky ( $p > 0,05$ ).

Dosud publikovaná literatura uvádí, že existuje souvislost mezi malým věkem, fenotypovými abnormalitami a aberacemi genu *SHOX*, v této práci se však nepotvrdila. Na druhou stranu duplikaci CNE9 a „downstream“ doprovázel klinický obraz, který by mohl podpořit hypotézu o jejím dopadu na regulaci exprese genu *SHOX*.

## SUMMARY

The growth is one of the basic characteristics observed in child development which enables an early capture of different diseases. Current studies show that 2,4 % of patients with short stature have *SHOX* gene aberration. Gene *SHOX* can be changed by copy number variation (CNV) and/or by one nucleotide change. Although the examination of this gene is routinely indicated for determining the cause of short stature in the patient, the impact of some changes in *SHOX* gene is not fully understand.

This thesis is focused on *SHOX* gene testing by multiplex PCR and Sanger sequencing method in 86 patients with short stature, with excluded Turner syndrome. The genetic data of our patients were correlated with their findings (cranial deformations, limbs and spine deformities and delayed bone age) by Fisher's exact test.

MLPA method detected CNV in 4 patients in part close to the gene *SHOX* (4,7 %), three heterozygous deletions in the CNE7, 8, 9 and „downstream“ region and one heterozygous duplication of CNE9 and „downstream“ region. Moreover, out of ordinary one nucleotide change Sanger sequencing detected one nucleotide change in the region close to exon 3 (1,2 % and 1,2 %), which are still uncertain significance (NC\_000023.11:g.634477C>G and NC\_000023.11:g.634871G>A) in two patients. There is no significant relationship between detected genetic aberrations and observed clinical features ( $p > 0,05$ ).

Published literature conclude that there is a possibility of connection between short stature, phenotypic abnormalities and *SHOX* gene aberrations, although this work did not confirm it. On the other hand, the clinical report which went along with duplication CNE9 and „downstream“ could support hypothesis of its impact on the regulation of *SHOX* gene expression.

# PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala Mgr. Zuzaně Čapkové, vedoucí mé bakalářské práce, za odborné vedení, ochotu a čas, který mi věnovala. Dále bych ráda poděkovala kolektivu Ústavu lékařské genetiky Fakultní nemocnice Olomouc. Tato práce vznikla za finanční podpory SUG 87\_82 a IGA\_LF\_2019\_003.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>3</b>
3.1	Klinický popis vzrůstu a jeho poruch .....	3
3.2	Malý vzrůst .....	3
3.2.1	Exogenní faktory .....	3
3.2.2	Endogenní faktory .....	4
3.3	<i>SHOX</i> gen .....	4
3.3.1	Charakteristika <i>SHOX</i> genu .....	4
3.3.2	Exprese genu <i>SHOX</i> .....	5
3.3.3	Short stature homeobox protein .....	6
3.4	Patologie genu <i>SHOX</i> .....	7
3.4.1	Turnerův syndrom .....	7
3.4.2	Lériho-Weillův syndrom (LWD) .....	8
3.4.3	Langerův syndrom (LS) .....	8
3.4.4	Idiopatická růstová retardace (ISS) .....	9
3.5	Možnosti detekce genetických aberací .....	9
3.5.1	G-pruhování .....	9
3.5.2	Metoda MLPA .....	10
3.5.3	Sekvencování dle F. Sanger .....	11
3.5.4	Další techniky .....	12
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>13</b>
4.1	Biologický materiál .....	13
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky .....	13
4.3	Použité přístroje a pomůcky .....	14

4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy .....	15
4.4.1	Stanovení karyotypu.....	15
4.4.2	Izolace DNA.....	15
4.4.3	Stanovení koncentrace DNA.....	17
4.4.4	MLPA.....	17
4.4.5	Sangerovo sekvencování.....	20
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>25</b>
5.1	Klinická data.....	25
5.2	Genetická data.....	25
5.3	Korelace fenotyp – genotyp.....	29
<b>6</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>31</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>33</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>34</b>
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHY</b>	

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ACAN	aggrecan core protein
aCGH	čipová komparativní genomová hybridizace (z angl. array comparative genomic hybridization)
bp	páry bází (z angl. base pairs)
CNEs	konzervované nekódující oblasti (z angl. conserved non-coding elements)
CNV	variabilita počtu kopií (z angl. copy number variation)
dAP	deoxyadenosinmonofosfát
dCP	deoxycytosinmonofosfát
ddNTP	dideoxynukleotidtrifosfát
dGP	deoxyguanosinmonofosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
dTP	deoxythymidinmonofosfát
DQ	kvocient dávky (z angl. dosage quotient)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
HiDi	vysoce deionizovaný (z angl. highly deionized)
ID	identifikační číslo
ISS	idiopatická růstová retardace (z angl. idiopathic short stature)
kb	kilobáze
LS	Langerův syndrom
LWD	Lériho-Weillův syndrom/Léri-Weillova dyschondrosteóza
Mb	megabáze
MD	Madelungova deformita
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina



NGS	sekvencování nové generace (z angl. new generation sequencing)
<i>NPPB</i>	gen natriuretic peptide B
PAR1	pseudoautozomální oblast 1
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
RTG	rentgenový
SD	směrodatná odchylka (z angl. standart deviation)
SDS	skóre směrodatné odchylky
SDS	dodecylsulfát sodný
<i>SHOX</i>	gen short stature homeobox
SOX	transkripční faktory účastníci se determinace pohlaví (z angl. Sry-related HMG box)
STH	somatotropin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TS	Turnerův syndrom
VVV	vrozená vývojová vada
WGS	celogenomové náhodné sekvencování (z angl. whole-genom shotgun)
WT	wild type

## SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ

Obr. 1: Diagram evoluční konzervace genu <i>SHOX</i> .....	5
Obr. 2: Lokace <i>SHOX</i> genu na chromozomu X, detailní přehled exonů genu <i>SHOX</i> a dvou isoform mRNA – <i>SHOXa</i> (s OAR doménou) a <i>SHOXb</i> .....	5
Obr. 3: Exprese mRNA genu <i>SHOX</i> v jednotlivých tkáních. ....	6
Obr. 4: Detekce proteinu <i>SHOX</i> . ....	6
Obr. 5: Fotografie demonstrující klasický fenotyp desetileté dívky s Turnerovým syndromem. .....	7
Obr. 6: RTG snímek předloktí 12leté dívky s Madelungovou deformitou. ....	8
Obr. 7: Karyotyp Turnerova syndromu. ....	9
Obr. 8: Princip metody MLPA. ....	11
Obr. 9: Sangerova metoda pro sekvenaci DNA. ....	12
Obr. 10: Krabicový digram heterozygotní delece CNE7, 8, 9 pacienta 199/17.....	26
Obr. 11: Elektroforeogram heterozygotní delece CNE7, 8, 9 pacienta 199/17.....	26
Obr. 12: Detekce produktů PCR jednotlivých amplikonů. ....	27
Obr. 13: Zachycená heterozygotní bodová mutace NC_000023.11:g.634871G>A v části intronu nedaleko exonu 3 v řetězci syntetizovaného forward primerem. ....	27
Graf 1: Počty pacientů v příslušných genotypových třídách u jednotlivých detekovaných jednonukleotidových změn zjištěných Sangerovým sekvencováním. ....	28

## SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Hodnoty DQ a jejich interpretace. ....	10
Tab. 2: Teplotní a časový profil MLPA reakce pro termocykler. ....	17
Tab. 3: Příprava Ligase-65 master mixu pro 1 reakci. ....	18
Tab. 4: Příprava polymerázového master mixu pro 1 reakci. ....	19
Tab. 5: Parametry separace pro fragmentační analýzu MLPA produktů. ....	19
Tab. 6: Příprava PCR směsi pro 1 reakci. ....	20
Tab. 7: Seznam použitých primerů k sekvenaci kódujících sekvencí genu <i>SHOX</i> . ....	20
Tab. 8: Teplotní profil PCR reakce pro přípravu templátů. ....	21
Tab. 9: Příprava sekvenační směsi na 1 vzorek. ....	22
Tab. 10: Teplotní program sekvenační PCR. ....	23
Tab. 11: Parametry separace pro sekvenování dle Sangerova. ....	23
Tab. 12: Počty pacientů s přítomnou/nepřítomnou abnormalitou. ....	25
Tab. 13: Přehled detekovaných jednonukleotidových změn v přílehlých oblastech exonu 3 a příslušné klinické obrazy pacientů. ....	29
Tab. 14: Fisherův exaktní test pro analýzu rovnoměrné distribuce CNV mezi pohlavími. ....	29
Tab. 15: Přehled detekovaných CNV a příslušné klinické obrazy pacientů. ....	30
Tab. 16: Souhrn výsledků kontingenčních tabulek Fisherova exaktního testu. ....	30

# 1 ÚVOD

Růst je jednou ze základních charakteristik sledovaných při vývoji dítěte. Tato charakteristika umožňuje včasný záchyt onemocnění. Je známo, že na růstu mají značný podíl genetické faktory za spoluúčasti environmentálních faktorů. Pacienti s malým vzrůstem jsou dnes běžně vyšetřováni na možnou přítomnost genetické aberace. Jedním ze stěžejních vyšetření je analýza genu *SHOX*, který ovlivňuje růst kostí, a tedy i výšku již od embryonálního stádia vývoje. Aberace tohoto genu může způsobovat řadu klinických obrazů, zejména Léri-Weillovu dyschondrosteózu (LWD), Langerův syndrom (LS) a idiopatickou růstovou retardaci (ISS), která může být doprovázena celou řadou vrozených vad. I přes to, že je gen *SHOX* velice dobře popsán a prozkoumán, zůstává význam některých jeho změn stále nejasný.

Proto se tato bakalářská práce zabývá detekcí změn počtu kopií (CNV) genu *SHOX* a jeho nejbližšího okolí a jednonukleotidových změn v kódujících oblastech genu a jejich nejbližším okolí u pacientů malého vzrůstu. Dále pak se tato práce věnuje korelaci genetických nálezů s klinickými obrazy těchto pacientů.

Odhalení významu genetických změn v genu *SHOX* a jeho okolí by mohlo napomoci k lepšímu pochopení příčiny malého vzrůstu. Prokázání asociace genetických změn genu *SHOX* a vývojových vad skeletu u pacientů s malým vzrůstem by mohlo vést ke zvýšení efektivity genetického testování a snížení nákladnosti tohoto vyšetření.

## 2 CÍLE PRÁCE

1. Literární rešerše genetické podstaty malého vzrůstu a možností diagnostického testování.
2. CNV analýza genu *SHOX* a jeho nejbližších oblastí metodou MLPA u pacientů s malým vzrůstem.
3. Analýza kódujících oblastí genu *SHOX* a jejich nejbližšího okolí metodou Sangerova sekvencování u pacientů s malým vzrůstem.
4. Korelace genetických nálezů metod MLPA a Sangerova sekvencování s klinickými daty pacientů s malým vzrůstem.

## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Klinický popis vzrůstu a jeho poruch

Růst je jednou ze základních charakteristik sledovaných při vývoji dítěte. Tato charakteristika umožňuje včasný záchyt onemocnění. K posouzení růstu dítěte slouží percentilové grafy tělesné výšky (u dětí do 2 let se hovoří o tělesné délce). Jedná se o variantu statistického zpracování dat vycházející z národních referenčních studií, která zjišťuje extrémní odchylky růstu dítěte. Extrémními hodnotami jsou ty, které se pohybují pod 3. percentilem (ve směru mínus), které signalizují významný růstový podprůměr nebo nad 97. percentilem (ve směru plus) poukazující na významný nadprůměr (Pomahačová *et* Kalvachová, 2013). Hodnoty tělesné výšky je také možné vyjádřit v normalizované podobě, s využitím z-skóre (směrodatná odchylka, SD; skóre směrodatné odchylky, SDS). V praxi se toto vyjádření užívá především pro určení míry extrémních odchylek od normy v pásmech, kam již percentilová síť nezasahuje (pod 3. percentilem a nad 97. percentilem) (Krásničanová *et al.*, 1996).

### 3.2 Malý vzrůst

Malý vzrůst lze definovat jako výšku pod 3. percentilem pro určitý věk a pohlaví jedince či pod 25. percentilem rychlosti růstu jedince daného věkem a pohlavím (Pomahačová *et* Kalvachová, 2013). Incidence malého vzrůstu je v pediatrické praxi okolo 3 : 100 (Zapletalová *et al.*, 2010). Na růstu dítěte se podílí různé faktory, které jsou rozděleny základně do dvou skupin, exogenní (environmentální) a endogenní (genetické) faktory.

#### 3.2.1 Exogenní faktory

Faktory prostředí lze ovlivnit již v prenatální fázi vývoje dítěte. Nejrizikovější období je mezi 3.– 6. měsícem těhotenství. Mezi rizika ze strany matky patří kouření, alkohol, drogy, nevhodná strava, nedostatek spánku atd. (Šulová, 2004).

Pro správný postnatální růst dítěte je důležitá vhodně zvolená strava a přiměřená fyzická aktivita. Dále je růst ovlivněn zdravotním stavem dítěte. Při každém déle trvajícím onemocnění se rychlost růstu zpomalí (Pomahačová *et* Kalvachová, 2013). Dalším faktorem, který lze ovlivnit, je dostatek spánku a odpočinku, jelikož právě tehdy se tvoří růstový hormon (STH). Neméně podstatným faktorem je také rodinné a sociální prostředí, ve kterém se dítě pohybuje (Paciorek *et al.*, 2013).

### 3.2.2 Endogenní faktory

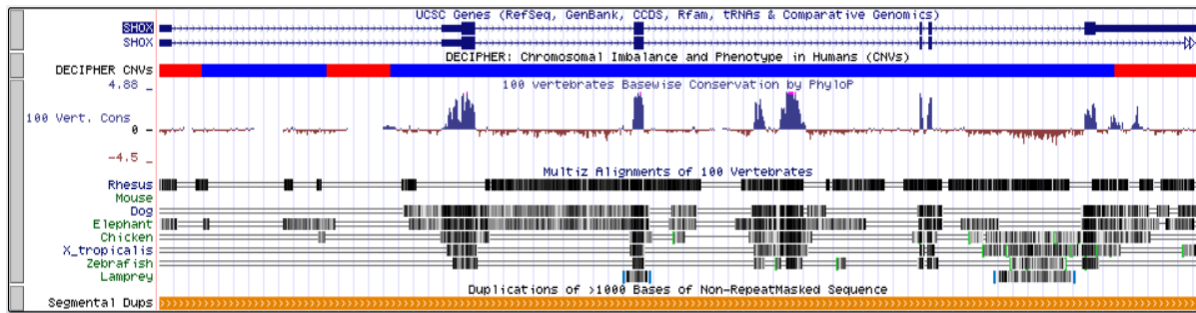
Za neovlivnitelné faktory jsou považovány hormony, geny či metabolismus. Je tedy nutné stanovit správnou diagnózu příčiny poruchy růstu. Dosavadní studie odhadují, že malým vzrůstem trpí 80 % dětí s výškou pod 3. percentilem z důvodu familiární genetické predikce malého vzrůstu, děti jsou tedy malé, ale zdravé („short-normal“). 15 % dětí s malým vzrůstem trpí chronickým onemocněním systémové povahy (chronická renální insuficience, Crohnova nemoc aj.) a 1–2 % trpí hormonálním deficitem (endokrinní porucha). Malý vzrůst se také vyskytuje jako průvodní jev jiných geneticky podmíněných chorob (Turnerův syndrom). U 2,4 % pacientů s malým vzrůstem je nalezena genetická aberace v oblasti genu *SHOX* (Zapletalová *et al.*, 2010).

### 3.3 *SHOX* gen

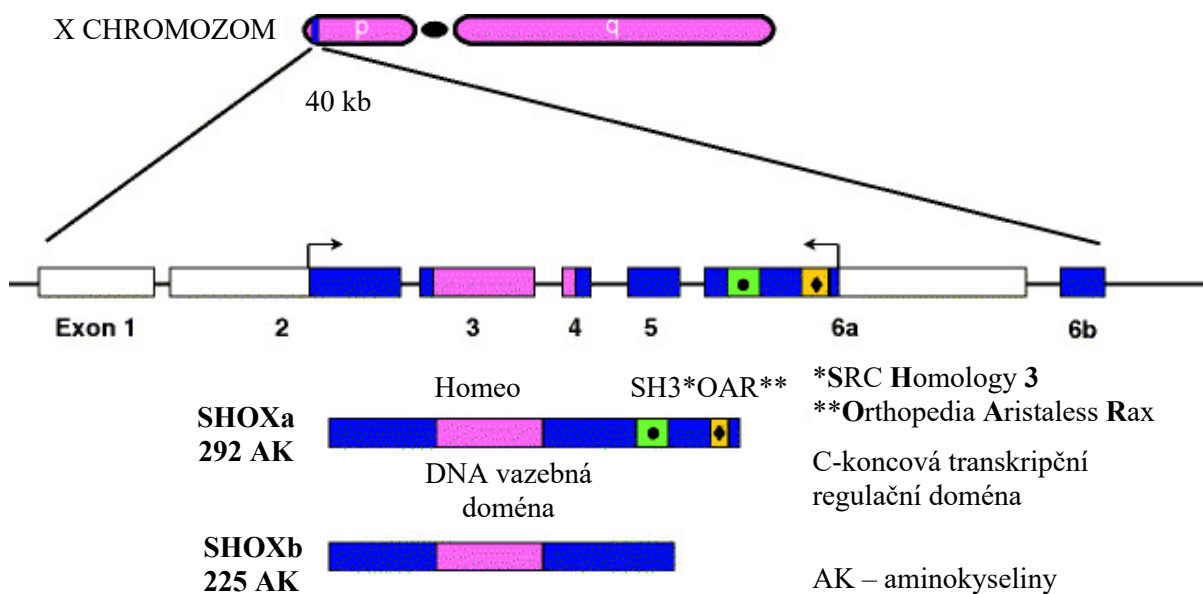
Gen *SHOX* byl odhalen v průběhu sledování příčin Turnerova syndromu na konci 90. let a jeho objev posloužil jako výchozí model pro léčbu malého vzrůstu růstovým hormonem (Zapletalová *et al.*, 2010). Tento gen je součástí velké rodiny genů homeobox, které působí jak během časného embryonálního vývoje, tak i po něm (Blaschke *et Rappold*, 2006).

#### 3.3.1 Charakteristika *SHOX* genu

*SHOX* gen je umístěn na obou pohlavních chromozomech (Xp22.3/Yp11.3) v distální oblasti PAR1, která nepodléhá inaktivaci tzv. lyonizaci. *SHOX* je 35 kb dlouhý gen, je složen ze sedmi exonů a je vysoce evolučně konzervován (Obr. 1 a 2). V jeho nejbližším okolí se nachází regulační oblasti (CNEs, „conserved non-coding elements“), které hrají významnou roli při expresi genu *SHOX*. Tyto vysoce konzervované nekódující oblasti jsou umístěny před a za genem *SHOX* neboli 5' „upstream“ a 3' „downstream“ (NCBI Gene, 2019). CNEs jsou interferující cis-elementy představující zesilovače transkripce tzv. „enhancers“. Ve studii z roku 2009 je potvrzeno, že zesilovač CNE9, umístěn v nekódující oblasti „downstream“, je podle všeho nejdůležitějším zesilovačem a projevuje se jako vysoce penetrantní alela (Chen *et al.*, 2009). Mutace (delece a duplikace) v tomto elementu jsou totiž nalézány u pacientů s LWD a ISS (Fukami *et al.*, 2016). Mutace zesilovačů CNE7 a CNE8 jsou taktéž asociovány s ISS, oba tyto elementy se opět nachází za kódující oblastí genu *SHOX* (Chen *et al.*, 2009).



Obr. 1: Diagram evoluční konzervace genu *SHOX* (převzato z UCSC Genome Browser, 2019).

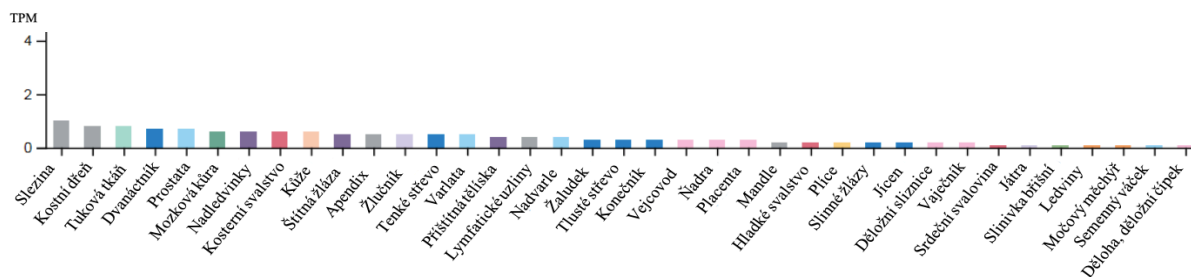


Obr. 2: Lokace *SHOX* genu na chromozomu X, detailní přehled exonů genu *SHOX* a dvou isoform mRNA – SHOXa (s OAR doménou) a SHOXb (převzato z Child *et al.*, 2012).

### 3.3.2 Exprese genu *SHOX*

Gen *SHOX* disponuje dvěma isoformami mRNA (NM\_000442.1, NM\_006883.2), jejichž zastoupení je zhruba 70% NM\_000442.1 (SHOXa) a 30% NM\_006883.2 (SHOXb) (Pomahačová *et* Kalvachová, 2013). SHOXa je exprimován v kosterních svalech, placentě, pankreatu, srdečních fibroblastech a kostní dřeni. SHOXb je vysoce exprimován ve fibroblastech kostní dřeně, ledvinách a kosterních svalech plodu. U dospělých není SHOXb exprimován v mozku, ledvinách, játrech a plicích. Obě formy jsou hojně exprimovány v osteogenních buňkách (Obr. 3) (UniProt, 2019).





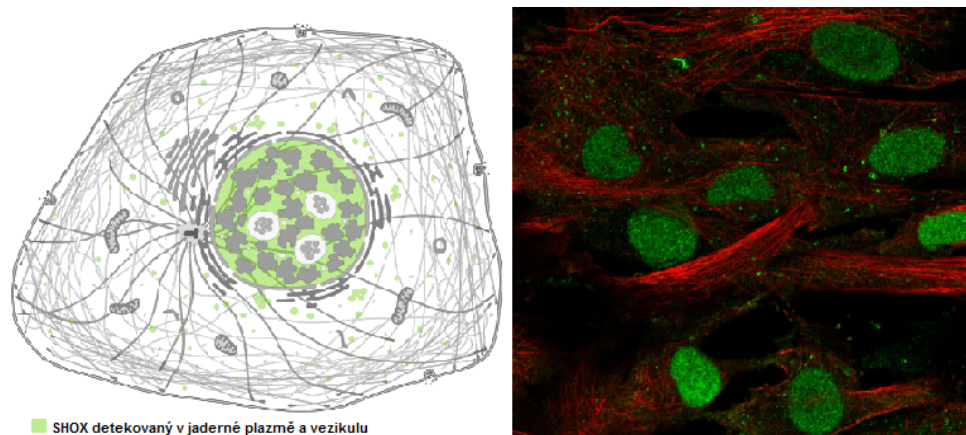
Obr. 3: Expres mRNA genu *SHOX* v jednotlivých tkáních (převzato a upraveno z The Human Protein Atlas b, 2019).

Legenda: TPM („transcripts per million“) – počet transkriptů v milionech

### 3.3.3 Short stature homeobox protein

Protein (Short stature homeobox protein) kódovaný genem *SHOX* reguluje aktivitu jiných genů. Tento protein je schopný translokace do jádra a nasednutí na určité místo DNA (Rao *et al.*, 2001). Vazebné místo proteinu se nachází v oblasti kódované exony 3 a 4 (homeodoména) (Rao *et al.*, 1997). Na základě toho se protein *SHOX* nazývá transkripčním faktorem (Blaschke *et Rappold*, 2006). Dvě exprimované isoformy genu *SHOX* jsou tvořeny 292 (NP\_000442.1) a/nebo 225 aminokyselinami (NP\_006874.1). Tento protein se nachází zejména v jaderné plazmě a vezikulu fibroblastů (Obr. 4) (UniProt, 2019).

Pomocí luciferázového testu bylo navíc prokázáno, že *SHOXB*, podobně jako *SHOXA*, reguluje přímo gen *NPPB* (natriuretic peptide B). *NPPB* kóduje protein udržující srdeční homeostázu. Protein *SHOX* souběžně aktivuje *ACAN* (aggrecan), protein extracelulární matrice v chrupavkovité tkáni, která odolává kompresi v chrupavce, prostřednictvím kaskády *SOX* trio (zahrnující *SOX5*, *SOX6* a *SOX9*) (Aza-Carmona *et al.*, 2014).



Obr. 4: Detekce proteinu *SHOX* (převzato a upraveno z The Human Protein Atlas a, 2019).

### 3.4 Patologie genu *SHOX*

Fyziologický vývoj člověka je podmíněn přítomností obou kopií homologního genu *SHOX*. Insuficience genu *SHOX* vede k syndromu Léřiho-Weilla (LWD, dyschondrosteóza) (Hirschfeldova *et al.*, 2016), Langerově syndromu (LS, mezomelická kostní dysplazie) (Child *et al.*, 2012), idiopatické růstové retardaci (ISS) a je součástí Turnerova syndromu (Rappold *et al.*, 2007).

Deficience genu *SHOX* je také spojována se širokou škálou dalších klinických znaků, jejichž výskyt u pacientů není ovlivněn věkem, pohlavím či pubertou. Jedinci s haploinsuficiencí *SHOX* genu, tedy s TS nebo LWD, sdílejí mnoho dysmorfických rysů, jako je nízký vzrůst, valgozita loketního kloubu, gotické patro, zkrácení IV. metakarpu a metatarzu, zkrácení středních segmentů dlouhých kostí a Madelungova deformita s vysokým výskytem u LWD syndromu (Ross *et al.*, 2001; Zapletalová *et al.*, 2010)

#### 3.4.1 Turnerův syndrom

Turnerův syndrom je genomová mutace vyskytující se pouze u žen. Ženám s TS chybí ve většině buněk či ve všech buňkách jeden X chromozom, jejich karyotyp je tedy 45,X. Turnerův syndrom se vyskytuje u 1 dívky ze 2 500 narozených a je spojen s vysokou fetální mortalitou, pouze 1 % takto postižených embryí se dožívá porodu (Catovic, 2005). U postižené pacientky se vyskytuje pouze jedna zdravá alela *SHOX* genu. Tato haploinsuficience podmiňuje vznik charakteristických kostních deformit (Obr. 5) (Zapletalová *et al.*, 2010).



Obr. 5: Fotografie demonstrující klasický fenotyp desetileté dívky s Turnerovým syndromem (převzato z Bucerzan *et al.*, 2017).

### 3.4.2 Lériho-Weillův syndrom (LWD)

Lériho-Weillův syndrom je pseudoautozomálně dědičnou chorobou kostí, pro kterou je charakteristická zejména Madelungova deformita, tj. bajonetovitě nasedání předloktí (Obr. 6). Klinický popis dále zahrnuje zkrácení středních segmentů dlouhých kostí, svalovou hypertrofií dolních končetin a nízký vzrůst. Incidence tohoto onemocnění je v populaci 1 : 5 000 a u žen se vyskytuje až 4x častěji než u mužů. Příčinou vzniku Lériho-Weillova syndromu je aberace jedné ze dvou alel tohoto genu (heterozygot). Gen *SHOX* může v jedné ze svých alel zcela chybět (81 %), což způsobí pokles exprese výsledného proteinu. Nebo zahrnuje bodovou mutaci genu *SHOX*, která může vést k záměně aminokyseliny v polypeptidovém řetězci či ke vzniku/zániku stop kodonu a následné ztrátě správné funkce proteinu (19 %) (Zapletalová *et al.*, 2010).



Obr. 6: RTG snímek předloktí 12leté dívky s Madelungovou deformitou (převzato ze Scott *et al.*, 2015).

### 3.4.3 Langerův syndrom (LS)

Langerův syndrom je mezomelická kostní dysplazie způsobená homozygotní změnou genu *SHOX*, tedy aberace je přítomna na obou alelách. To vede k absenci výsledného proteinu. Pacienti s tímto syndromem mají velice závažný klinický obraz zahrnující extrémně malý vzrůst a velké deformity kostí. Také se u nich často vyskytuje hypoplazie či aplazie loketní a lýtkové kosti (Hintz, 2002).

### 3.4.4 Idiopatická růstová retardace (ISS)

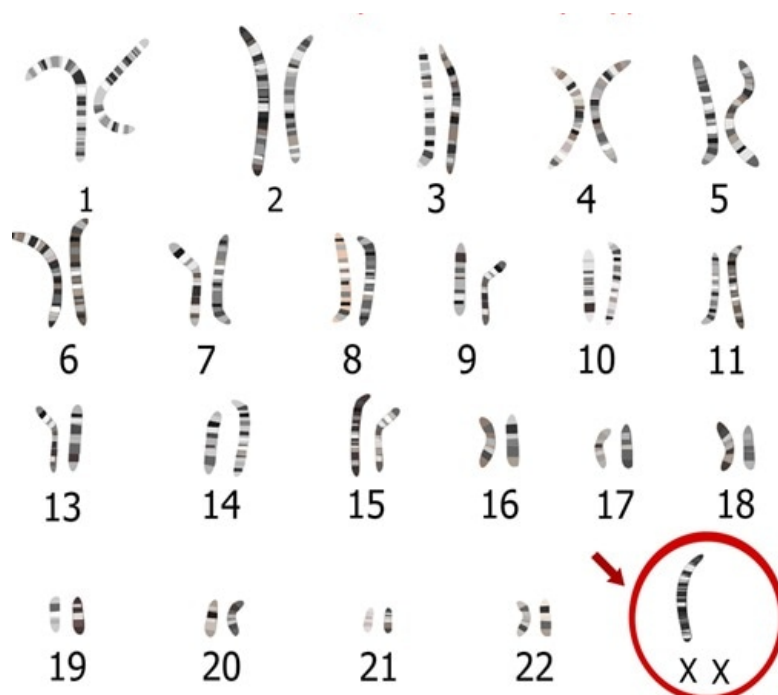
Pacienti s idiopatickou růstovou retardací jsou pouze nižšího vzrůstu, netrpí jiným postižením. Na základě výsledků studie Rappold *et al.* z roku 2002 bylo odhadováno, že až 2,4 % pacientů s ISS trpí defektem v *SHOX* genu. Avšak v roce 2016 se odhad zvýšil až na 10 % (Marchini *et al.*, 2016). I přesto, že se dnes daří rozvíjet diagnostické techniky, stále je velký podíl pacientů s idiopaticky malým vzrůstem bez zjevné příčiny (Huang *et al.*, 2018).

### 3.5 Možnosti detekce genetických aberací

Možnosti detekce změn genu *SHOX* se odvíjejí od velikosti dané aberace, od standartního G-pruhování chromozomů (karyotyp) až po DNA sekvencování.

#### 3.5.1 G-pruhování

G-pruhování je velmi důležitým krokem pro sledování chromozomů. Díky němu lze odhalit absenci X chromozomu, tedy i jedné alely genu *SHOX*. G-pruhování je prováděno na metafázních chromozomech a je založeno na působení trypsinu a následném obarvení Giemsovým roztokem. Výsledný karyotyp slouží k popisu strukturních i numerických změn chromozomů (Obr. 7). Největší limitou tohoto vyšetření je rozlišovací schopnost, která se pohybuje do 5 Mb (Adam *et al.*, 2008). Pro diagnostiku menších změn je třeba zvolit některou z citlivějších genetických metod, jako jsou FISH nebo aCGH (Martin *et Warburton*, 2015).



Obr. 7: Karyotyp Turnerova syndromu (převzato z News Medical Life Sciences, 2018).

### 3.5.2 Metoda MLPA

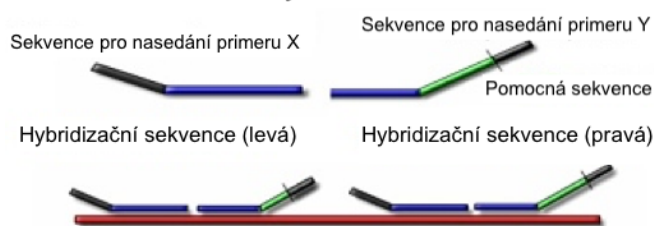
Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) je semi-kvantitativní metoda umožňující detekci submikroskopických změn počtu kopií genomu (CNV), jež nemohou být odhaleny konvenčním G-pruhováním. Soubor maximálně 60 specifických sond hybridizuje na DNA v jediné reakci (Schouten *et al.*, 2002). Každá sonda se skládá ze dvou částí, které obsahují specifickou sekvenci, sekvenci pro nasedání univerzálních primerů a pomocnou sekvenci, která odlišuje jednotlivé sondy. Obě části jsou po hybridizaci spojeny ligázou do jednoho celku a pomocí PCR amplifikovány (viz Obr. 8). Vzniklé produkty jsou separovány pomocí kapilární elektroforézy a výsledný elektroforeogram (Obr. 8) je porovnán se záznamem kontrolní DNA. Je-li signál dané sondy nižší než u kontrolní DNA, jedná se o delecí dané oblasti a naopak (Vícha *et Eckschlager*, 2008). Číselné/absolutní vyhodnocení je prováděno pomocí kvocientu dávky (DQ). Hodnota DQ v intervalu 0,8–1,2 vyjadřuje fyziologický stav. Hodnoty mimo tento interval jsou vyhodnoceny jako zisk nebo ztráta genetického materiálu (viz Tab. 1). Pík u homozygotní nebo hemizygotní delecce zcela chybí (BIOGEN, 2019).

Výhodou této metody je specifita a množství sledovaných úseků v jediné reakci, umožňuje sledování až 60 sond. Dále také použití malého množství DNA pacienta, které by se mělo pohybovat v rozmezí 50–250 ng. Avšak tato metoda má svá omezení. MLPA nedokáže odhalit balancované přestavby (translokace, inverze), neumožňuje sledování oblastí mimo design sond a přítomnost bodových mutací je vždy nutné ověřit sekvenační technikou. V neposlední řadě MLPA vyžaduje vysokou kvalitu (integritu) DNA (BIOGEN, 2019).

Tab. 1: Hodnoty DQ a jejich interpretace (převzato a upraveno z MLPA<sup>®</sup> General Protocol, 2018).

Počet kopií	Kvocient dávky (DQ)	Status
Normální	$0.70 < DQ < 1.30$	normální hodnota
Heterozygotní duplikace	$1.30 < DQ < 1.65$	kritická hodnota
Heterozygotní delecce	$0.40 < DQ < 0.70$	kritická hodnota
Homozygotní delecce	0	kritická hodnota

## 1. Denaturace a hybridizace



## 2. Ligace

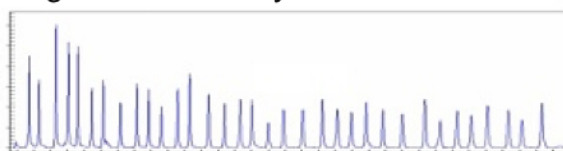


## 3. PCR s univerzálními primery X a Y

exponenciální amplifikace pouze ligovaných sond



## 4. Fragmentační analýza

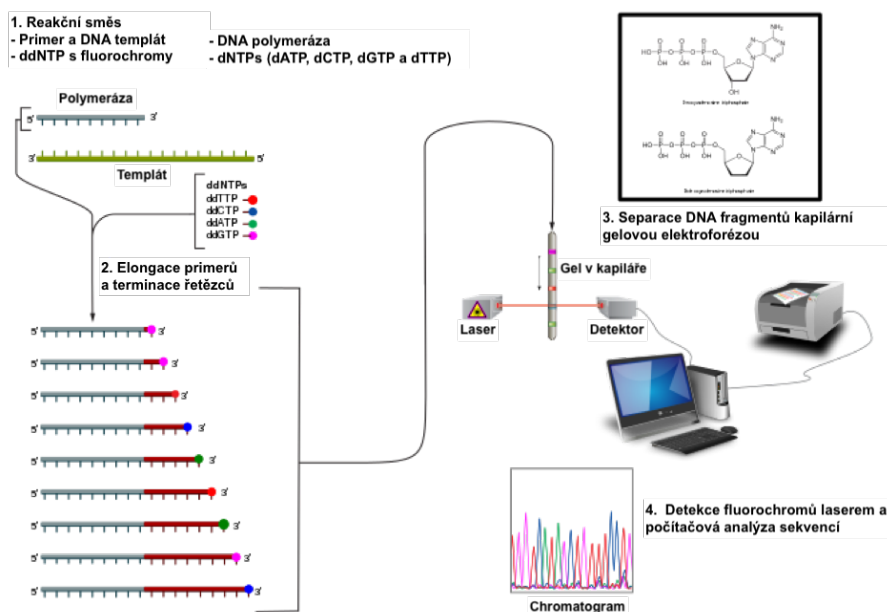


Obr. 8: Princip metody MLPA (převzato a upraveno z BIOGEN, 2019).

### 3.5.3 Sekvencování dle F. Sangera

Sangerovo sekvencování je metoda určená ke sledování bodových změn v sekvenci DNA. Tato metoda je založena na principu PCR. Do reakce jsou mimo standardní nukleotidy (dTP, dAP, dGP, dCP) přidány i modifikované nukleotidové báze – 2',3'-dideoxynukleotidy (ddNTP), jež jsou barevně značeny (G – černá, T – červená, A – zelená, C – modrá). DNA-polymeráza vyžaduje pro svou funkci přítomnost volné 3'-OH skupiny, jestliže se však na řetězec připojí jeden z dideoxynukleotidů, DNA-polymeráza na něj nedokáže nasednout, zastaví se elongace řetězce a dochází k terminaci. Výsledkem je množství různě dlouhých fragmentů DNA, které jsou na svém 5' konci barevně značeny na základě zařazeného ddNTP (viz Obr. 9) (Kolísko, 2017).

Sekvence podle F. Sangera je limitována zejména velikostí sledované oblasti, ta je dána umístěním primerů pro PCR, a separační kapacitou kapilární elektroforézy. Běžně lze sekvencovat oblast do 1 000 bp, což může vyloučit záchyt větší CNV v heterozygotním stavu (Besser *et al.*, 2018). To znamená, že výsledná sekvence odpovídá pouze zbylé alele, ale není z ní patrné, že jedna chybí (Engelhardt *et al.*, 2017).



Obr. 9: Sangerova metoda pro sekvenaci DNA (převzato a upraveno z Wikipedia, 2018).

### 3.5.4 Další techniky

Molekulárně cytogenetická metoda aCGH (čipová komparativní genomová hybridizace) umožňuje copy number variation (CNV) analýzu celého genomu v jediném experimentu. Metoda aCGH je prováděna na čipu. Ten je osazen specificky navrhnutými sondami, k nimž je hybridizována směs flouroforem označených molekul DNA, tj. DNA pacienta a kontrolní. Pokud je množství genomického materiálu shodné v obou DNA, mají také stejnou šanci přichytit se k jednotlivým sondám. Jestliže množství jedné DNA převažuje nad druhou, jedná se o zisk/ztrátu genomické informace. Čip je následně oskenován a výsledný signál je digitalizován příslušným softwarem. Tato technologie je z hlediska vyšetření insuficience genu *SHOX* uplatnitelná jen tehdy, jedná-li se o zisk/ztrátu materiálu větší než 100 kb a zahrnuje i tento gen (Volejnikova *et al.*, 2018).

Další molekulárně-genetickou metodou je sekvencování nové generace (NGS). Ta je určena především k sekvenaci mnoha genů v jediné reakci (panelu). Její princip je závislý na výrobci. V současnosti rozlišujeme dva přední výrobce NGS technologií, a to Illumina a IonTorrent. Při použití těchto technik je gen *SHOX* součástí skupiny genů nebo může být sledován pomocí celogenomového náhodného sekvencování (WGS). Avšak testování pouze jednoho genu pomocí NGS by bylo finančně náročné a je přednostně využíváno sekvencování dle Sanger (Koubková *et al.*, 2014).

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Biologický materiál

Pacienti s indikací malého vzrůstu byli konzultováni lékaři Ústavu lékařské genetiky Fakultní nemocnice Olomouc v letech 2015–2017. V průběhu této konzultace byl pacientům odebrán bukální stěr a/nebo periferní krev do 9ml zkumavky EDTA a do zkumavky s heparinem za doprovodu informovaného souhlasu zákonného zástupce pacienta. Vzorky z EDTA zkumavky a z bukálního stěru byly odeslány k izolaci DNA. Vzorek s heparinem byl odeslán ke stanovení karyotypu a vyloučení 45,X. Výsledná kohorta pacientů zahrnovala 86 jedinců s malým vzrůstem bez TS.

### 4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

#### Použité chemikálie

- Agaróza (Thermo Fisher, katalogové číslo: 17852)
- Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, katalogové číslo: B0126)
- Chlorid amonný (Sigma-Aldrich, katalogové číslo: 254134)
- Chlorid sodný (Sigma-Aldrich, katalogové číslo: 746398)
- DMSO (Sigma-Aldrich, katalogové číslo: W387520)
- EDTA (Sigma-Aldrich, katalogové číslo: 03609)
- Exonukleáza I 4000 U (Thermo Fisher, katalogové číslo: EL0011)
- FastAP termosenzitivní alkalická fosfatáza (Thermo Fisher, katalogové číslo: EF0654)
- GelRed (Labmark, katalogové číslo: 41003)
- GeneScan 500 LIZ velikostní standard (Thermo Fisher, katalogové číslo: 4322682)
- HiDi Formamid (Thermo Fisher, katalogové číslo: 4311320)
- Hydrogenuhličitan draselný (Sigma-Aldrich, katalogové číslo: 237205)
- Hydroxid sodný (Sigma-Aldrich, katalogové číslo: S8045)
- Polymer POP7<sup>TM</sup> (Applied Biosystems, katalogové číslo: 4352759)
- Proteináza K (Eurobio, katalogové číslo: GEXPRK00-6R)
- SDS (Serva, katalogové číslo: 20760.03)
- TRIS 10mmol·l<sup>-1</sup> o pH 8,2 (Lékárna FNOL, z 3. 5. 2017)
- TRIS (Sigma Aldrich, katalogové číslo: 252859)
- TRIS-HCl (Thermo Fisher, katalogové číslo: 4322682)
- Voda v PCR čistotě (Top Bio, katalogové číslo: P440)



## Použité soupravy

- BigDye<sup>®</sup> XTerminator<sup>™</sup> Purification Kit (Thermo Fisher, katalogové číslo: 4376486)
- BigDye<sup>™</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher, katalogové číslo: 4337454)
- PPP Master Mix (Top Bio, katalogové číslo: P124)
- QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, katalogové číslo: 51304)
- SALSA MLPA Kit (MRC Holland, katalogové číslo: EK1/EK5-FAM)
- SALSA probe mix P018-G1, G2 (MRC Holland, katalogové číslo: P018-100R)

## Použité roztoky a jejich příprava

- **Hmotnostní standard pro fragmentační analýzu:** 22,2  $\mu$ l GeneScan 500 LIZ přidáno do 1 ml HiDi Formamidu
- **LB pufr (Lysis buffer):** 8,825 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $155\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), 1,001 g  $\text{KHCO}_3$  ( $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), 0,372 g EDTA ( $1\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), doplněno deionizovanou vodou do 1 l, pH 7,3–7,4 upraveno přidáním cca 800  $\mu$ l  $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaOH
- **NLB pufr (Nuclear Lysis buffer):** 1,211 g  $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TRIS-HCl (10 ml  $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), 23,376 g  $400\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl, 0,745 g  $2\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  EDTA (4 ml  $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), doplněno deionizovanou vodou do 1 l, pH 7,3–7,4 upraveno přidáním cca 800  $\mu$ l  $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaOH,
- **20% SDS (w/v):** 5 g SDS doplněno deionizovanou vodou do 25 ml
- **20mg·ml<sup>-1</sup> proteináza K:** 500 mg proteinázy K doplněno deionizovanou vodou do 25 ml
- **0,5x TBE pufr:** 27 g TRIS, 13,75 g kyseliny borité, 1 ml  $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  EDTA, pH 8, doplněno deionizovanou vodou na 5 l
- **TE pufr:** 2,5 ml  $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  TRIS-HCl, 0,5 ml EDTA ( $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), doplněno deionizovanou vodou do 250 ml

## 4.3 Použité přístroje a pomůcky

- Automatický sekvenátor ABI 3130 (Thermo Fisher)
- Centrifuga FVL-2400N (Biosan)
- Chladnička kombinovaná (Electrolux)
- Chlazená centrifuga M-240R (Boeco)
- NanoDrop 2000 (Thermo Fisher)
- Termoblok TD 200 PS (Falc Instruments)

- Termostat B 5061 EC/CO<sub>2</sub> Auto-Zero (Heraeus)
- Termocykler pro PCR (Bio-Rad)
- Transluminátor MiniBis Pro (Serva)
- Vana pro agarózovou elektroforézu JSB-30 (Shelton Scientific)
- Vodní lázeň (HandyLAB)
- Centrifuga/Vortex Combispin (BioVendor)
- Zdroj napětí GPS 200/400 (Pharmacia)

## **4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy**

### **4.4.1 Stanovení karyotypu**

Karyotyp pacientů byl stanoven standartním G-pruhováním k vyloučení chromozomálních aberací, zejména Turnerova syndromu, v cytogenetické laboratoři Ústavu lékařské genetiky Fakultní nemocnice Olomouc dle SOP 02\_01 (viz Příloha 1).

### **4.4.2 Izolace DNA**

#### **Izolace DNA z bukálního stěru pomocí QIAamp DNA Mini Kitu**

1. Odběrovou tyčinku namáčet do 1 ml deionizované vody po dobu 2 min.
2. Materiál centrifugovat 5 min/13 000 g, slít supernatant, k peletu napipetovat 1 ml deionizované vody, promíchat na Vortexu a nechat stát 10 min při pokojové teplotě.
3. Slít supernatant, přidat 180 µl ATL pufru + 20 µl proteinázy K a protřepat.
4. Inkubovat na vodní lázni při 56 °C 1–3 hodiny, v průběhu promíchat na Vortexu a kontrolovat, zda je materiál zcela zlyzován.
5. Po úplné lýzi buněk přidat 200 µl AL pufru, protřepat a inkubovat při 70 °C 10 min.
6. Přidat 210 µl 96% ethanolu a protřepat.
7. Objem přenést na kolonku pomocí pipety a poté centrifugovat 1 min/8 000 g.
8. Kolonku přenést do čisté zkumavky, na kolonku přidat 500 µl AW1 pufru a centrifugovat 1 min/8 000 g.
9. Kolonku přenést do čisté zkumavky, přidat 500 µl AW2 pufru a centrifugovat 3 min/13 000 g.
10. Kolonku přenést do čisté zkumavky a prázdnou centrifugovat 30 s/8 000 g.
11. Kolonku přenést do čisté označené zkumavky typu Eppendorf, přidat 100 µl AE pufru (vytemperovaného na 70 °C).
12. Inkubovat 1 min při pokojové teplotě a poté centrifugovat 1 min/8 000 g.

13. Přenést filtrát zpět na kolonku pomocí pipety, uzavřít zkumavku a inkubovat na termobloku při 70 °C/5 min.

14. Centrifugovat 5 min/13 000 g a zkumavky řádně označit.

## **Izolace DNA Millerovou metodou**

### **Den 1.:**

1. Krev přelít do označené kónické zkumavky (Falkony, 50 ml), dolít do 50 ml chlazeným LB pufrem a promíchat.
2. Inkubovat při pokojové teplotě 15 min a poté centrifugovat 30 min/1 000 g.
3. Slít supernatant tak, aby na dně zůstal pelet bílých krvinek.
4. Přidat 5 ml chlazeného LB pufru, promíchat a centrifugovat 10 min/1 000 g.
5. Slít supernatant, lehce opláchnout pelet chlazeným LB pufrem a nechat zkumavky okapat na ubrousku otočené dnem vzhůru.
6. Přidat 3 ml NLB pufru, 50 µl proteinázy K (20mg·ml<sup>-1</sup>), 150 µl 20% SDS a poté důkladně protřepat.
7. Inkubovat v termostatu při 37 °C přes noc.

### **Den 2.:**

1. Ke směsi inkubované z přechozího dne přidat 1 ml NaCl o koncentraci 6 mol·l<sup>-1</sup>, důkladně protřepat a centrifugovat 15 min/5 000 g.
2. Supernatant přelít do čisté 10ml popsané zkumavky a centrifugovat 10 min/5 000 g.
3. Supernatant přelít do čisté 15ml popsané zkumavky a doplnit 96% vychlazeným ethanolem.
4. Pomalým převrácením zkumavky promíchat až do vysrážení DNA.
5. Vysráženou DNA přenést pomocí sterilního skleněného háčku do označené zkumavky typu Eppendorf s 1 ml 70% ethanolu.
6. Zkumavku s DNA nechat centrifugovat 5 min/14 000 g, poté opatrně slít 70% ethanol na ubrousek.
7. DNA nechat volně schnout cca 1 hod při pokojové teplotě.
8. Rozpustit DNA v TE pufru (na 1 ml výchozí krve přidat 50 µl TE pufru) přes noc nebo 1 hod při 65 °C za současného promíchávání na třepačce.
9. Řádně označenou zkumavku uschovat v lednici nebo pro delší skladování uschovat v mrazáku do -25 °C.

### 4.4.3 Stanovení koncentrace DNA

Koncentraci vyizolované DNA změřit pomocí spektrofotometru NanoDrop. Pro další použití DNA je nutno upravit příslušnou koncentraci na hodnotu  $15 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  pomocí  $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TRIS.

### 4.4.4 MLPA

#### Denaturace

1. Do označených 0,2ml zkumavek napipetovat 5  $\mu\text{l}$  DNA vzorku o koncentraci  $15 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  do každé zkumavky a jako slepý vzorek použít  $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TE pufr místo DNA.
2. Vložit zkumavky se vzorky do termocykleru a spustit program (viz Tab. 2). Nechat vzorky DNA denaturovat 5 min při  $98 \text{ }^\circ\text{C}$  a následně je ochladit na  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Tab. 2: Teplotní a časový profil MLPA reakce pro termocykler.

Proces	Čas	Teplota [ $^\circ\text{C}$ ]
Denaturace	5 min	98
	pauza	25
Hybridizace	1 min	95
	16–20 hod	60
	pauza	54
Ligace	15 min	54
	5 min	98
	pauza	20
PCR	30 s	95
	35x 30 s	60
	60 s	72
	20 min	72
	pauza	15

### Hybridizační reakce

1. Před použitím MLPA pufr a MLPA směs sond promíchat na Vortexu.
2. Připravit si hybridizační master mix obsahující pro každý vzorek: 1,5 µl MLPA pufru + 1,5 µl směsi sond. Hybridizační master mix dobře promíchat pipetováním či promícháním na Vortexu.
3. Po DNA denaturaci přidat 3 µl směsi hybridizačního master mixu do každé zkumavky. V každé zkumavce dobře promíchat pipetováním nahoru a dolů.
4. Zkumavky vložit zpět do termocykleru a spustit program inkubace po dobu 1 min při 95 °C a poté na 16–20 hod při 60 °C (Tab. 2).

### Ligační reakce

1. Před použitím promíchat na Vortexu oba ligační pufrы.
2. Připravit si Ligase-65 master mix dle Tab. 3, poté ho pipetou dobře promíchat.
3. Při 54 °C pozastavit program termocykleru, zkumavky nevyndávat, přidat do každé 32 µl směsi (Ligase-65 master mix) a jemně pipetou promíchat nahoru a dolů.
4. Pokračovat programem MLPLIG – inkubace 15 min při 54 °C, poté 5 min při 98 °C a potom zastavit program při 20 °C a vytáhnout zkumavky.

Tab. 3: Příprava Ligase-65 master mixu pro 1 reakci.

Reagencie	Objem [µl]	Celkový objem [µl]
H <sub>2</sub> O (v PCR čistotě)	25	
Ligase pufr A	3	32
Ligase pufr B	3	
Ligase-65 enzym	1	

### PCR reakce

1. Před použitím promíchat na Vortexu SALSA PCR primer mix a v ruce zahřát polymerázu.
2. Připravit polymerázový master mix dle Tab. 4, poté ho pipetou dobře promíchat nahoru a dolů.

3. Při pokojové teplotě přidat do každé zkumavky 10 µl polymerázového master mixu, směs jemně pipetou promíchat nahoru a dolů a pokračovat v programu PCR pro MLPA metodu dle Tab. 2.
4. Produkty PCR lze skladovat po dobu jednoho týdne při 4 °C nebo mezi -25 °C a -15 °C pro delší dobu uchovávání. Produkty musí být skladovány ve tmě (např. v alobalu) z důvodu použití fluorescenční barvy, která je citlivá na světlo.

Tab. 4: Příprava polymerázového master mixu pro 1 reakci.

Reagencie	Objem [µl]	Celkový objem [µl]
H <sub>2</sub> O (v PCR čistotě)	7,5	
SALSA PCR primer mix	2	10
SALSA polymeráza	0,5	

### Fragmentační analýza

1. Do UV dekontaminované pipetovací destičky (12x8 jamek) napipetovat 14,5 µl směsi HiDi Formamidu a GeneScan 500 LIZ do každé jamky.
2. Přidat 0,5 µl produktu MLPA reakce do každé jamky s hmotnostním standardem.
3. Pipetovací destičku přikrýt gumovým septem a denaturovat při 86 °C po dobu 3 min a poté schladit na ledové lázni nejméně 2 min.
4. Pipetovací destičku se septem po ledové lázni osušit a vložit do plastového krytu.
5. Kapilární elektroforézu provést podle Tab. 5 v přístroji ABI 3130 s filtrem G5, kapilárami o délce 36 cm a plněné polymerem POP7™.

Tab. 5: Parametry separace pro fragmentační analýzu MLPA produktů.

Parametr	Hodnota
Teplota	60 °C
Elektrické napětí nástřiku	1,2 kV
Doba nástřiku	12 s
Elektrické napětí separace	15 kV
Čas separace	1 000

## Vyhodnocení výsledků

1. Pro vyvolání elektroforeogramu použít software GeneMapper.
2. K vyhodnocení dat použít software Coffalyser.

### 4.4.5 Sangerovo sekvencování

#### Příprava templátů

1. Připravit PCR směs dle Tab. 6.

Tab. 6: Příprava PCR směsi pro 1 reakci.

Reagencie	Objem [μl]	Celkový objem [μl]
PPP Master Mix	7,5	
H <sub>2</sub> O v PCR čistotě	4,5	14
DMSO	1,5	

2. PCR směs promíchat a přenést do 0,2ml zkumavek po 14 μl.
3. Přidat 1 μl DNA a 0,8 μl (0,4 μl forward + 0,4 μl reverse) příslušného páru primerů, zkumavku vložit do termocyklieru a spustit program (viz Tab. 7 a 8).

Tab. 7: Seznam použitých primerů k sekvenaci kódujících sekvencí genu *SHOX*.

Název primeru	Exon	Směr	Sekvence primerů (5' → 3')
SHOX_2	2	forward	GAAAGGCGTAAATAACAGCG
		reverse	TGCCTTCCTTCCTTTCTTAG
SHOX_3	3	forward	GAGTATCCTCCTCGGCTTTGC
		reverse	CGTCTCCAAAAGTCCAGGACC
SHOX_4_5	4 a 5	forward	CAAAGTGCTTGGTTCAGCCTC
		reverse	AGGGACTAGGAGTGTTCAGGATG
SHOX_6a	6a	forward	TAGGGAGAAGAGGCACGTTG
		reverse	GAAGGAGCTCCAGGCGGGTTG
SHOX_6b	6b	forward	ATTGATGGTTAGTATTTTTTTGTAGCAGTTG
		reverse	TTAAAAATAAAGTTACAAAGGCCGG

Tab. 8: Teplotní profil PCR reakce pro přípravu templátů.

Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
95	3 min	1
94	30 s	
56	30 s	9
72	90 s	
90	30 s	24
56	30 s	
72	90 s	1
10	pauza	neomezeno

### Ověření přítomnosti PCR produktů pomocí gelové elektroforézy

#### Příprava 1,5% agarózového gelu s barvicím roztokem GelRed

1. Do uzavíratelné láhve navážit na analytických vahách 0,9 g agarózy a přilít 60 ml 0,5x TBE pufru ze zásobní lahve.
2. Láhev uzavřít na jeden závit a vložit do mikrovlnné trouby asi na 2 min.
3. Po spuštění v časových intervalech láhev promíchávat (uchopit pomocí gumové chňapky) a sledovat, dokud není agaróza zcela rozpuštěná.
4. Po vychladnutí gelu na teplotu asi 70 °C napipetovat 6 µl GelRed, poté lehce láhev promíchat.
5. Nalít gel při jeho teplotě kolem 60 °C (lze láhev udržet v ruce) do elektroforetické vaničky, tak aby nevznikly bubliny a ihned zasadit do gelu hřeben.
6. Po ztuhnutí gelu odstranit hřeben, vaničku přenést do elektroforetické vany a dolít pufr po rysku.

#### Elektroforetická separace

1. Smíchat 5 µl PCR produktu se 3 µl bromfenolové modři (1 : 10 naředěnou vodou v PCR čistotě) a objem napipetovat do jamky v gelu.
2. Víkem uzavřít elektroforetickou vanu a připojit ke zdroji.
3. Zapnout zdroj a nastavit na 90 V na dobu asi 30 min.
4. Po separaci vypnout zdroj, gel odnést do fotodokumentačního zařízení a vyfotit jej UV transluminačním zařízením MiniBis Pro.



## Enzymatické přečištění PCR produktů

1. K 5  $\mu\text{l}$  PCR produktu napipetovat 0,5  $\mu\text{l}$  exonukleázy I, 1  $\mu\text{l}$  FastAP termosenzitivní alkalické fosfatázy a pipetou jemně promíchat.
2. Inkubovat v termocykleru při 37 °C po dobu 15 min a poté deaktivovat enzym při 85 °C na 15 min.

## Sekvenační PCR

1. Připravit sekvenační kit BigDye™ Terminator v3.1 naředěním sekvenačním pufrům (BigDye® Terminator v1.1 & v3.1 5x Sequencing buffer) v poměru 1 : 8 nebo ředícím pufrům BDx 256 Dilution Buffer v poměru 1 : 256.
2. Ke 2  $\mu\text{l}$  přečištěného DNA templátu napipetovat 8  $\mu\text{l}$  sekvenační směsi dle Tab. 9.

Tab. 9: Příprava sekvenační směsi na 1 vzorek.

Reagencie	Objem [ $\mu\text{l}$ ]	Celkový objem [ $\mu\text{l}$ ]
BigDye® Terminator v1.1 & v3.1 5x Sequencing buffer	1,500	
BDx64 buffer	0,937	
PCR voda	4,500	8,000
Naředěný sekvenační kit (BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit )	0,063	
Primer o koncentraci 10 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1,000	
DNA templát	2,000	2,000

3. Celou směs s DNA templátem jemně a krátce promíchat pipetou a vložit do termocykleru na zvolený teplotní program (viz Tab. 10).

Tab. 10: Teplotní program sekvenační PCR.

<b>Teplota [°C]</b>	<b>Čas</b>	<b>Počet cyklů</b>
94	30 s	1
96	10 s	
50 °C/(1 °C/s)	5 s	34
60	4 min	
10	pauza	neomezeno

### **Přečištění sekvenačních produktů**

1. Do označené 0,2ml zkumavky napipetovat 5 µl postsekvenačního produktu a následně přidat 22,5 µl SAM<sup>TM</sup> Solution a 5 µl XTerminator<sup>TM</sup> roztoku.
2. Směs promíchat na Vortexu při 2700 rpm/40 min.
3. Směs centrifugovat při 1000 g/2 min.

### **Kapilární elektroforéza**

1. Přepipetovat 15 µl supernatantu do 96-jamkové destičky pro detekci pomocí kapilární elektroforézy.
2. Pipetovací destičku uzavřít septem a vložit do plastového krytu.
3. Kapilární elektroforézu provést podle Tab. 11 v přístroji ABI 3130 s filtrem G5, kapilárami o délce 36 cm, plněné polymerem POP7<sup>TM</sup>.

Tab. 11: Parametry separace pro sekvencování dle Sangera.

<b>Parametr</b>	<b>Hodnota</b>
Teplota	60 °C
Elektrické napětí nástřiku	1,2 kV
Doba nástřiku	12 s
Elektrické napětí separace	8,5 kV
Čas separace	2780 s

### **Vyhodnocení výsledků**

1. Pro vyvolání přečtené sekvence („base calling“) použít software Sequencing analysis 5.4.
2. K vyhodnocení dat použít software Seqscanner a Align Sequences Nucleotide BLAST pro určení změn v sekvenci genu *SHOX*.

### **Klinické vyhodnocení nalezených variant z metod MLPA a sekvencování podle Sangera**

Nalezené varianty byly klinicky hodnoceny podle informací dostupných v databázích ClinVar a LOVD. Referenčním genomem byla NC\_000023.11. Zápis variant byl prováděn pomocí referenčních sekvencí jednotlivých transkriptů NM\_000451.3 a NM\_006883.2.

### **Statistické zhodnocení korelace fenotyp – genotyp**

Statistické zhodnocení korelace fenotyp – genotyp bylo provedeno pomocí Fisherova exaktního testu (Social Science Statistics, 2018). Fisherův exaktní test zjišťoval závislost mezi jednotlivými pozorovanými klinickými znaky a zjištěnými genetickými aberacemi.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Klinická data

Kohorta 86 pacientů s malým vzrůstem zahrnovala 58 žen a 28 mužů. Průměrný věk pacientů byl 9 let a 3 měsíce (min. 7 měsíců, max. 45 let). U pacientů byly sledovány čtyři skupiny vývojových vad. Vady lebky (n = 23) zahrnovaly mikrocefalii, makrocefalii, faciální stigmatizaci, hypertelorismus, jiné deformace lebky a přítomnost hypoplastických křídel nosních. Mezi vady končetin (n = 19) byly řazeny rohlíčkovité malíčky, rhizomelické zkrácení končetin, brachydaktylie, pedes plani/planovalgi, kratší metakarpy/metatarsy, limitace extenze loketních kloubů a Madelungova deformita. Další skupinu fenotypových abnormalit tvořily deformity páteře (n = 6), jako jsou skolióza, hyperlordóza či hyperkyfóza. Dalším znakem tvořící samostatnou skupinu bylo opožděné kostní vyžrávání (n = 19). Počty pacientů s přítomnou/nepřítomnou abnormalitou a jejich procentuální zastoupení jsou uvedeny v Tab. 12.

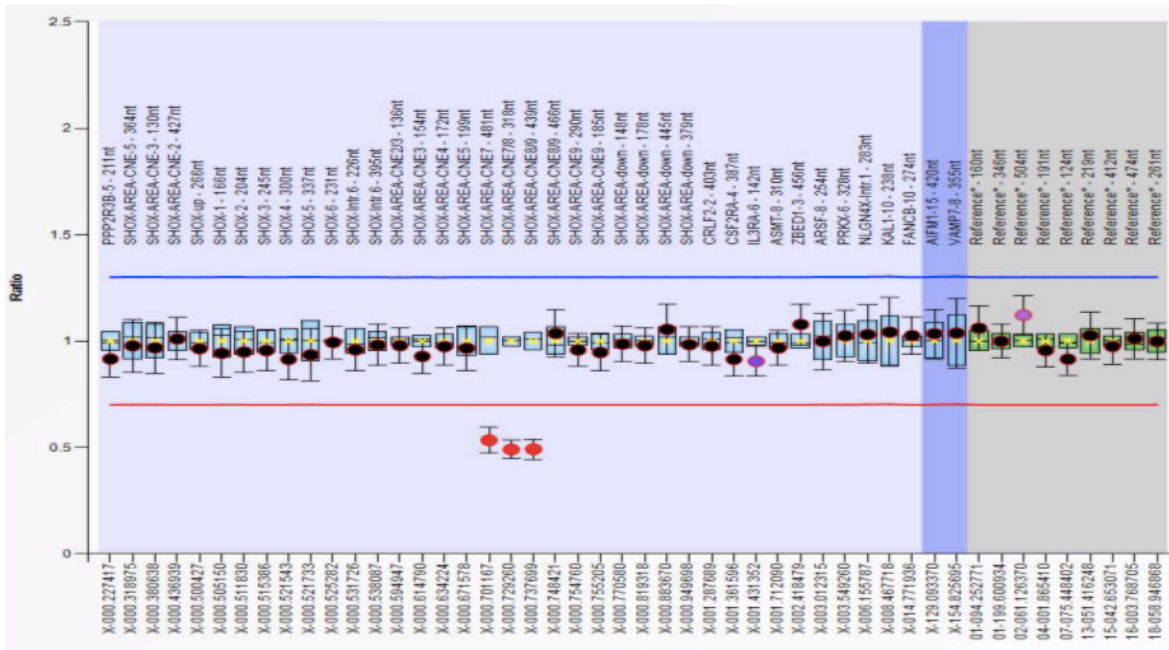
Tab. 12: Počty pacientů s přítomnou/nepřítomnou abnormalitou.

Skupina fenotypových abnormalit	Počet pacientů s vadou [%]	Počet pacientů bez vady [%]
Vady lebky	23 (27 %)	63 (73 %)
Vady končetin	19 (22 %)	67 (78 %)
Deformity páteře	6 (7 %)	80 (93 %)
Opožděné kostní vyžrávání	19 (22 %)	67 (78 %)

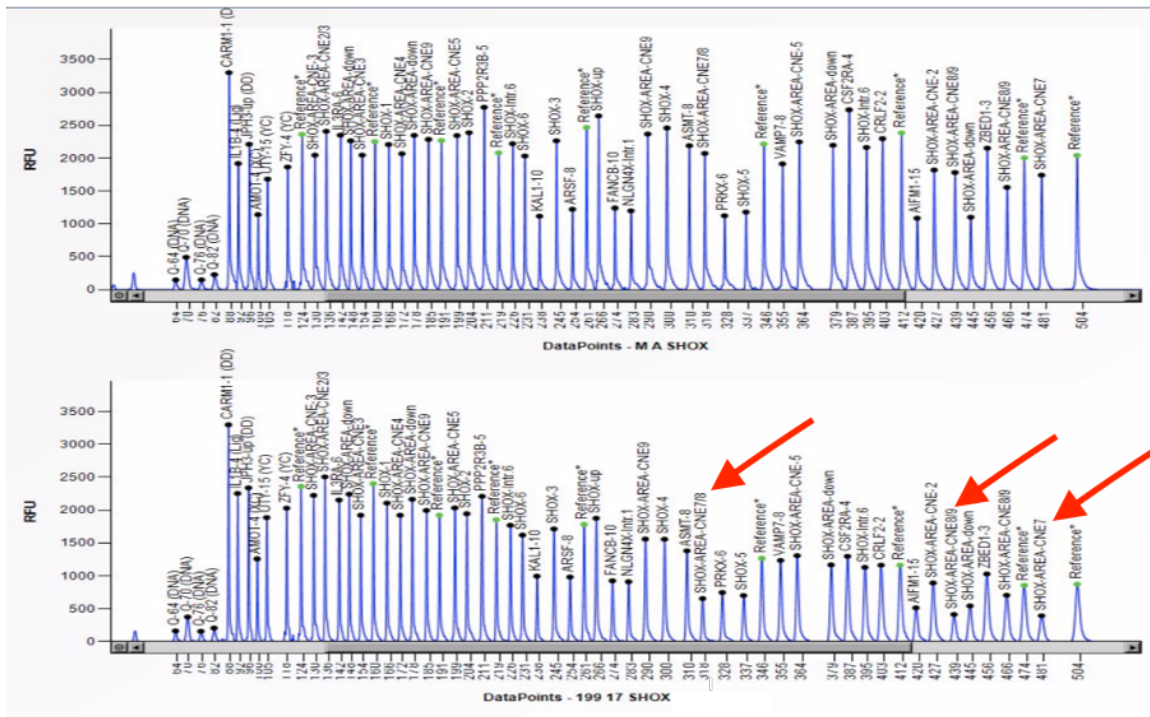
### 5.2 Genetická data

U pacientů s malým vzrůstem byl pomocí konvenčního G-pruhování vyloučen Turnerův syndrom. DNA těchto pacientů byla dále analyzována metodami MLPA a Sangerova sekvencování pro vyloučení CNV, respektive bodových změn genu *SHOX*.

Metoda MLPA zachytila 4 CNV (4,7 %) v přilehlých oblastech genu *SHOX*. U tří pacientů (3,5 %) byla zachycena heterozygotní delece v oblasti CNE7, 8, 9 (199/17 a 1106/15) a „downstream“ (84/17) (Obr. 10 a Obr. 11). Heterozygotní duplikace CNE9 a „downstream“ byla pozorována pouze u jednoho pacienta (1,2 %, 1346/18).



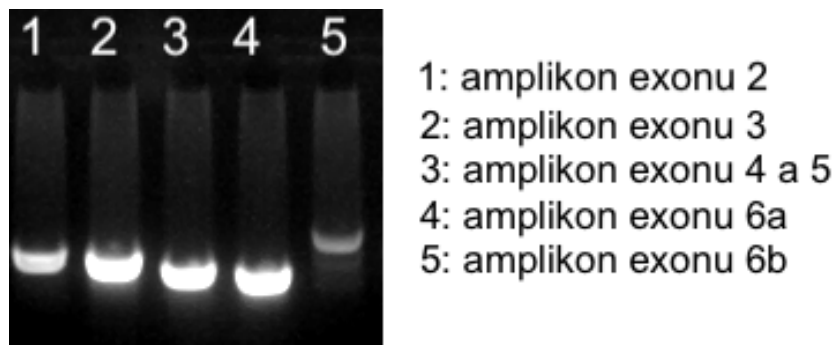
Obr. 10: Krabicový digram heterozygotní delece CNE7, 8, 9 pacienta 199/17.



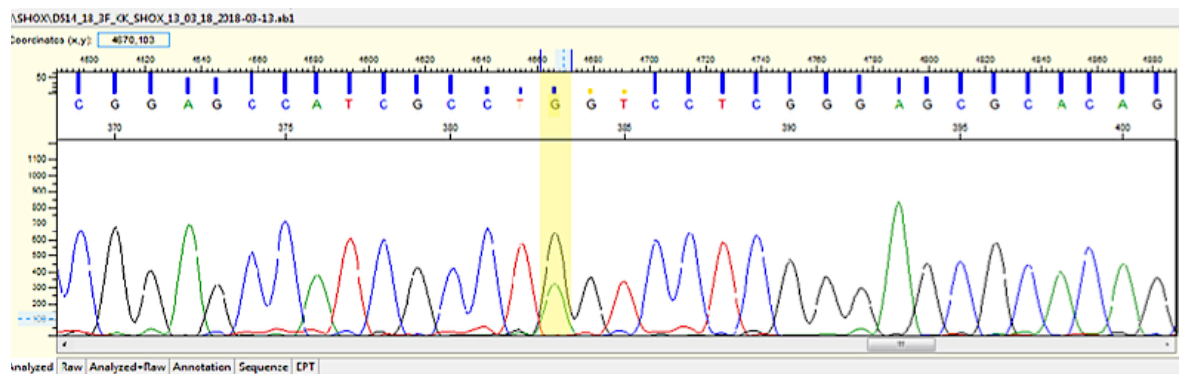
Obr. 11: Elektroforeogram heterozygotní delece CNE7, 8, 9 pacienta 199/17.

Před samostatným sekvencováním bylo nutné si ověřit gelovou elektroforézou, zda došlo k amplifikaci požadovaných úseků genu *SHOX* (Obr. 12). Po vyvolání přečtených bází byla všechna data vyhodnocena dle referenčního genomu hg19. Metoda Sangerova

sekvencování odhalila bodové změny v intronech mezi exonem 2 a 3, za exonem 3 a v exonu 6b. Benigní varianty NC\_000023.11:g.631191T>A/T>G (rs2239402) za exonem 2 a NC\_000023.11:g.658808G>C/G>T/G>A (rs28474801) v exonu 6b byly pozorovány u většiny pacientů (100,0 % a 77,9 %). U dvou pacientů byla detekována bodová mutace v blízkosti rozhraní exon/intron u exonu 3, heterozygotní změna NC\_000023.11:g.634871G>A (514/18) (viz Obr. 13) a homozygotní změna NC\_000023.11:g.634477C>G (rs2895543, 1699/15). Zastoupení jednotlivých jednonukleotidových změn je shrnuto v Grafu 1.

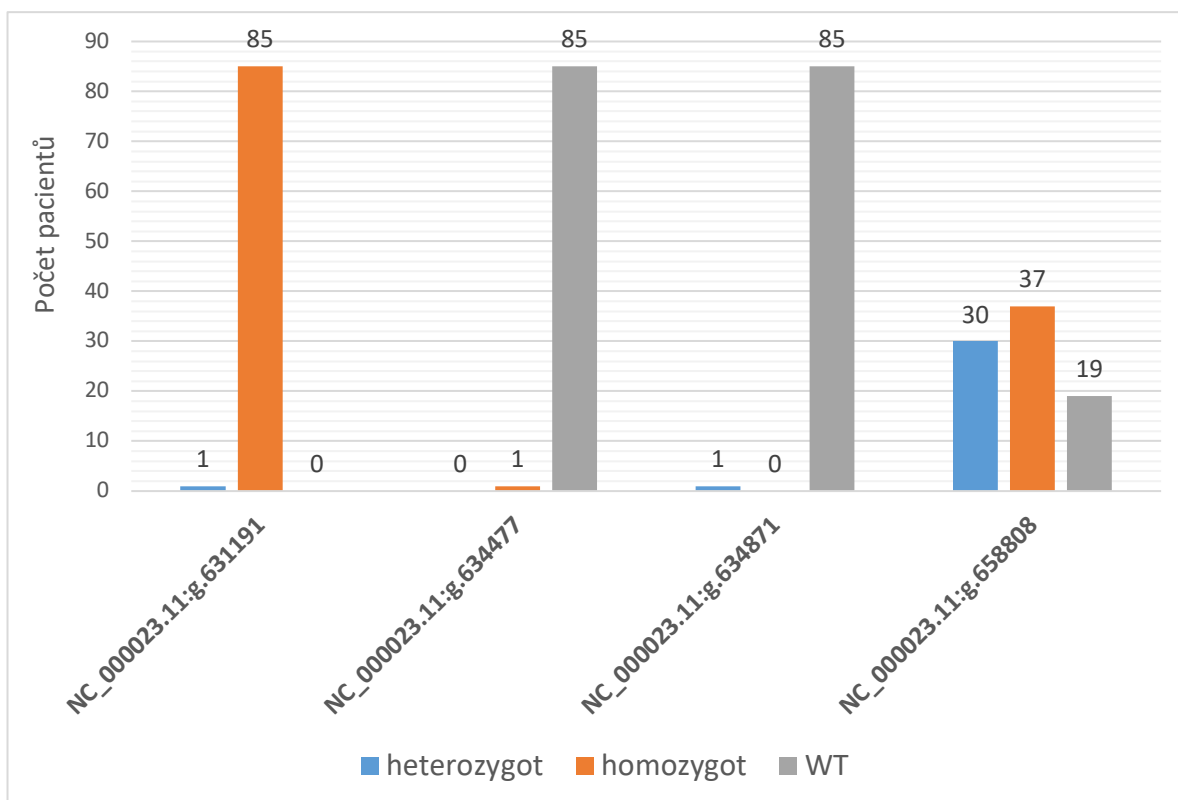


Obr. 12: Detekce produktů PCR jednotlivých ampliconů.



Obr. 13: Zachycená heterozygotní bodová mutace NC\_000023.11:g.634871G>A v části intronu nedaleko exonu 3 v řetězci syntetizovaného forward primerem.

Legenda: Bodová mutace je vyznačena žlutým sloupcem a heterozygotní konstituci představují dva překrývající se vrcholy rozličných bází.



Graf 1: Počty pacientů v příslušných genotypových třídách u jednotlivých detekovaných jednonukleotidových změn zjištěných Sangerovým sekvencováním.

Legenda: WT („wild type“) – standartní alela dle referenčního genomu

Jednonukleotidové změny v oblasti blízké exonu 3 (NC\_000023.11:g.634477C>G a NC\_000023.11:g.634871G>A) jsou ve sledovaném souboru zachyceny s nízkou frekvencí (1,2 % a 1,2 %) a dosud u nich nebyl prokázán klinický význam. Klinické obrazy nositelů těchto změn jsou shrnuty v Tab. 13. Jedinou pozorovanou vývojovou vadou bylo opožděné kostní vyhrávání, a to u pacienta 514/18.

Tab. 13: Přehled detekovaných jednonukleotidových změn v přilehlých oblastech exonu 3 a příslušné klinické obrazy pacientů.

ID pacienta	Jednonukleotidové změny	Vady lebky	Vady končetin	Deformity páteře	Opožděné kostní vyžívání
Heterozygot					
514/18	NC_000023.11:g.634871	-	-	-	+
G>A					
Homozygot					
1699/15	NC_000023.11:g.634477	-	-	-	-
C>G					

Legenda: + přítomnost fenotypové abnormality, - nepřítomnost fenotypové abnormality

### 5.3 Korelace fenotyp – genotyp

V této skupině pacientů nebyl pozorován žádný významný rozdíl v záhytu genetických aberací mezi muži a ženami (Tab. 14,  $p > 0,05$ ). Heterozygotní delece „downstream“ a CNE7, 8, 9 u tří pacientů neodhalila žádnou významnou závislost k výskytu pozorovaných klinických znaků, stejně jako duplikace CNE9 s „downstream“ oblastí (Tab. 15 a 16,  $p > 0,05$ ), ačkoliv u pacienta s duplikací CNE9 a „downstream“ byly zpozorovány 2 vady ze 4 sledovaných (Tab. 15, 1346/18).

Tab. 14: Fisherův exaktní test pro analýzu rovnoměrné distribuce CNV mezi pohlavími.

	Počet pacientů s CNV a s přítomností vady	Počet pacientů s CNV a bez přítomnosti vady	Celkem v řádcích
Počet žen	1	57	58
Počet mužů	3	25	28
Celkem ve sloupcích	4	82	86

P-hodnota Fisherova exaktního testu je 0,9991. Výsledek není signifikantní při  $p < 0,05$ .



Tab. 15: Přehled detekovaných CNV a příslušné klinické obrazy pacientů.

ID pacienta	CNV	Vady lebky	Vady končetin	Deformity páteře	Opožděné kostní vyžrávání
84/17	Heterozygotní delece „downstream“	-	-	-	-
199/17	Heterozygotní delece CNE7, 8, 9	-	-	-	-
1106/15	Heterozygotní delece CNE7, 8, 9	-	-	-	-
1346/18	Heterozygotní duplikace CNE9 a „downstream“	+	+	-	-

Legenda: + přítomnost fenotypové abnormality, - nepřítomnost fenotypové abnormality

Tab. 16: Souhrn výsledků kontingenčních tabulek Fisherova exaktního testu.

VVV	Počet pacientů s CNV a s přítomností vady	Počet pacientů s CNV a bez přítomnosti vady	P-hodnota	Statistická významnost
Vady lebky	1	3	> 0,05	nesignifikantní
Vady končetin	1	3	> 0,05	nesignifikantní
Deformity páteře	0	4	> 0,05	nesignifikantní
Opožděné kostní vyžrávání	1	3	> 0,05	nesignifikantní

Legenda: VVV – vrozená vývojová vada

## 6 DISKUZE

Nízký vzrůst je jeden ze základních fenotypových znaků sledovaných při vývoji dítěte. Růst dítěte může být ovlivněn faktory prostředí a/nebo genetickými faktory (Zapletalová *et al.*, 2010). Podle Chen *et al.* (2009) se nízký vzrůst vyskytuje u 2–3 % dětí po celém světě. Uvádí se, že u 3–15 % pacientů s ISS je příčinou jejich nízkého vzrůstu genetická aberace v oblasti *SHOX* genu. Jelikož je gen *SHOX* jedním z esenciálních genů pro správný růst, mutace v něm mohou být příčinou růstových abnormalit (Sandoval *et al.*, 2014).

Ve studii Rappold *et al.* (2007) byl sledován genotyp a fenotyp u 1608 pacientů s nízkým vzrůstem. Pacienti, u kterých byl následně potvrzen defekt genu *SHOX*, měli řadu klinických dysmorfických znaků, především vady končetin. Z této studie vyplývá, že tyto fenotypové znaky by mohly být klinickými ukazateli genetických aberací genu *SHOX* u malých dětí.

Madelungova a Lériho-Weillova deformita (MD a LWD) jsou úzce spojovány s aberací genu *SHOX* (Hirschfeldova *et al.*, 2016; Šolc, 2017). Hirschfeldova *et al.* (2016) zaznamenali mnohem vyšší četnost výskytu aberace genu *SHOX* u pacientů s malým vzrůstem a Medelungovou deformitou než bez ní ( $p < 0,05$ ). Uvádí se, že až 68,8 % pacientů s malým vzrůstem a LWD má prokázanou aberaci genu *SHOX*. Také se odhaduje, že četnost genetických změn v oblasti *SHOX* u jedinců malého vzrůstu s jinými dysmorfickými rysy se pohybuje kolem 13,7 % (Šolc, 2017).

Ačkoli byla tato předložená práce provedena na obdobně velkém souboru pacientů s malým vzrůstem (86 vs. 98) a záchyt změn genu *SHOX* se pohyboval okolo 6,9 %, stejně jako ve studii Sandoval *et al.* (2014), nemůžeme potvrdit vztah mezi přítomností aberací v genu *SHOX* a vadami lebky, končetin, deformitami páteře a opožděným kostním vyžíváním. Navíc jsme v našem souboru pozorovali pouze jednoho pacienta s MD, u něhož nebyla zachycena žádná aberace genu *SHOX*.

V této práci byly zachyceny změny zejména v oblastech CNEs, u kterých se předpokládá regulační charakter, a intronové bodové změny, které by mohly vést ke změně sestřihu daného genu (Fukami *et al.*, 2015; dbSNP, 2019). Fukami *et al.* z roku 2015 publikovali, že duplikace oblastí CNEs narušuje expresi genu *SHOX*, která by následně měla vyvolat příslušný klinický obraz. V této práci byl zachycen pouze jeden pacient s duplikací CNE9 a „downstream“, u kterého byly pozorovány vady lebky a končetin. Statisticky se však souvislost těchto dvou znaků s genetickým nálezem nedala prokázat. U pacientů s delecí

v CNEs oblastech nebyly pozorovány žádné klinické abnormality. Z literatury se zdá, že význam delecí v oblasti CNE je stále neznámý (Fukami *et al.*, 2015).

Analýza genu *SHOX* je standardně prováděna i na úrovni jednotlivých nukleotidů dle doporučení Binder *et Rappold* z roku 2005, avšak dodnes bylo popsáno pouze 7 patogenních variant na základě klinického testování, z nichž byla pouze jedna intronová (NM\_000451.3(*SHOX*):c.544+1G>A) (ClinVar, 2019). V této práci byly posuzovány pouze jednonukleotidové změny v blízkosti exonu 3 (NC\_000023.11:g.634477C>G, 1,2 % a NC\_000023.11:g.634871G>A, 1,2 %), které jsou nejasného klinického významu (dbSNP, 2019). U nositele jednonukleotidové změny NC\_000023.11:g.634871G>A bylo pozorováno pouze opožděné kostní vyžívání. V této práci se nepodařilo potvrdit vztah mezi pozorovaným klinickým znakem a přítomnou variantou.

Dosud většina studií ukazuje, že pouze u malé části pacientů s diagnostikovaným nízkým vzrůstem byl detekován defekt v *SHOX* genu (Fukami *et al.*, 2016; Hirschfeldova *et al.*, 2016). V této bakalářské práci se však statisticky nepotvrdilo, že by jakákoliv fenotypová abnormalita z uvedených ukazovala na přítomnost aberace v genu *SHOX* ( $p > 0,05$ ). Na druhou stranu byl gen *SHOX* analyzován pouze pomocí MLPA a Sangerova sekvencování exonů a jejich nejbližšího okolí, což vylučuje možnost nalezení změn mimo oblasti vymezené metodou MLPA a dále bodových změn v regulačních oblastech genu *SHOX*. Nálezy jednonukleotidových změn v oblasti okolí exonu 3 by bylo vhodné doplnit o analýzu původu a dále pak o expresní a funkční studii pro úplné odhalení jejich významu.

Úprava klinických kritérií pro testování genu *SHOX* by mohla napomoci zvýšení záhytu jeho genetických aberací a tím napomoci k odhalení příčin malého vzrůstu a i jiných růstových deformit. V neposlední řadě by nový selekční systém mohl snížit finanční náklady při vyšetřování pacientů s malým vzrůstem díky snížení počtů testovaných pacientů.

## 7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce byla genetická analýza pacientů s malým vzrůstem metodami MLPA a Sangerova sekvencování. Dále pak korelace získaných genetických dat s klinickými nálezy těchto pacientů, zejména vrozené vývojové vady lebky, končetin, deformity páteře a opožděné kostní vyžívání. V této práci se nepodařilo prokázat souvislost mezi nalezenými CNV v oblasti blízké genu *SHOX* ani mezi nalezenými jednonukleotidovými změnami v oblasti intronu 3 a přítomností některých vývojových vad. Na druhou stranu nositel duplikace v oblastech CNE7, 8, 9 a „downstream“ vykazoval klinické rysy, které by mohly podpořit hypotézu o deregulačním významu duplikací oblastí blízkých genu *SHOX*.

Odhalení významu genetických změn v *SHOX* genu a jeho okolí by mohlo napomoci k lepšímu pochopení příčiny malého vzrůstu. Prokázání asociace genetických změn genu *SHOX* a vývojových vad skeletu u pacientů s malým vzrůstem by mohla napomoci ke zvýšení efektivity genetického testování a snížení nákladnosti tohoto vyšetření.

## 8 LITERATURA

Adam Z., Krejčí M., Vorlíček J. (2008): Hematologie: Přehled maligních hematologických nemocí. 2. vydání, pp. 404, Grada Publishing, Praha.

Aza-Carmona M., Barca-Tierno V., Hisado-Oliva A., Belinchón A., Gorbenko-del Blanco D., Rodriguez J. I., Benito-Sanz S., Campos-Barros A., Heath K. E. (2014): *NPPB* and *ACAN*, two novel *SHOX2* transcription targets implicated in skeletal development. *PloS One*, 9(1), e83104.

Besser J., Carleton H. A., Gerner-Smidt P., Lindsey R. L., Trees E. (2018): Next-Generation Sequencing Technologies and their Application to the Study and Control of Bacterial Infections. *Clinical Microbiology Infection*, 24(4), 335–341.

Binder G., Rappold G. A. (2005) [aktualizováno 2018]: *SHOX* Deficiency Disorders. Gene. In: Adam M. P., Ardinger H. H., Pagon R. A. *et al.* (eds): Gene Reviews® [Internet]. Seattle, WA: University of Washington, Seattle, 1993–2019.

BIOGEN. [online] [navštíveno 7. 1. 2019] Dostupné z: <https://biogen.cz/mlpa-kity>

Blaschke R. J., Rappold G. (2006): The pseudoautosomal regions, *SHOX* and disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16(3), 233–239.

Bucerzan S., Miclea D., Popp R., Alkhzouz C., Lazea C., Popp I. V., Grigorescu-Sido P. (2017): Clinical and genetic characteristics in a group of 45 patient with Turner syndrome (monocentric study). *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 13, 613–622.

Catovic A. (2005): Cytogenetics findings at Turner Syndrome and their correlation with clinical findings. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 5(3), 54–58.

ClinVar. [online] [navštíveno 3. 4. 2019] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>

dbSNP. [online] [navštíveno 28. 3. 2019] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>

Engelhardt K. R., Xu Y., Grainger A., Germani Batacchi M. C. C., Swan D. J., Willet J. D. P., Hamid I. J. A., Agyeman P., Barge D., Bibi S., Jenkins L., Flood T. J., Abinun M., Slatter M. A., Gennery A. R., Cant A. J., Koref M. S., Gilmour K., Hambleton S. (2017): Identification of Heterozygous Single- and Multi-exon Deletions in *IL7R* by Whole Exome Sequencing. *Journal of Clinical Immunology*, 37(1), 42–50.

- Fukami M., Naiki Y., Murova K., Hamajima T., Soneda S., Horikawa R., Jinno T., Katsumi M., Nakamura A., Asakura Y., Adachi M., Ogata T., Kanzaki S. & The Japanese SHOX study group (2015): Rare pseudoautosomal copy-number variations involving SHOX and/or its flanking regions in individuals with and without short stature. *Journal of Human Genetics*, 60(9), 553–556.
- Fukami M., Seki A., Ogata T. (2016): SHOX Haploinsufficiency as a Cause of Syndromic and Nonsyndromic Short Stature. *Molecular syndromology*, 7(1), 3–11.
- Hintz R. L. (2002): *SHOX* Mutations. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 3, 363–367.
- Hirschfeldova K., Florianova M., Kebrdlova V., Urbanova M., Stekrova J. (2016): Detection of SHOX gene aberrations in routine diagnostic practice and evaluation of phenotype scoring form effectiveness. *Journal of Human Genetics*, 62(2), 253–257.
- Huang Z., Sun Y., Fan Y., Wang L., Liu H., Hong Z., Wang J., Yan H., Wang Y., Hu G., Wang R., Ye J., Han L., Qiu W., Zhang H., Liang L., Yang Y., Dauber A., Yu Y., Gu X. F. (2018): Genetic Evaluation of 114 Chinese Short Stature Children in the Next Generation Era: a Single Center Study. *Cellular physiology and biochemistry*, 49(1), 295–305.
- Chen J., Wildhardt G., Zhong Z., Röth R., Weiss B., Steinberger D., Decker J., Blum W. F., Rappold G. (2009): Enhancer deletions of the SHOX gene as a frequent cause of short stature: the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. *Journal of medical genetics*, 46(12), 834–839.
- Child Ch. J., Rappold G. A., Blum W. F. (2012): Short Stature Homeobox-Containing (SHOX) Gene Deficiency: Genetics and Growth Response to Growth Hormone Treatment in Comparison with Turner Syndrome. In: Preedy V. R. (ed.): *Handbook of Growth and Growth Monitoring in Health and Disease*, 2299–2318, Springer New York, New York.
- Kolísko M. (2017): Moderní metody sekvenování DNA. *Živa*, 3, 73–76.
- Koubková L., Vojtěšek B., Vyzula R. (2014): Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi. *Klinická onkologie*, 27 (Supplementum 1), 61–68.
- Krásničanová H., Zemková-Hellerová D., Lebl J. (1996): *Růst dětí a jeho poruchy*, Galén, Praha.

Marchini A., Ogata T., Rappold G. A. (2016): A Track Record on SHOX: From Basic Research to Complex Models and Therapy. *Endocrine Reviews*, 37(4), 417–448.

Martin C. L., Warburton D. (2015): Detection of Chromosomal Aberrations in Clinical Practice: From Karyotype to Genome Sequence. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 16, 309–326.

MLPA® General Protocol, 2018. [online] [navštíveno 2. 9. 2018] Dostupné z: [https://www.mlpa.com/WebForms/WebFormDBData.aspx?FileOID=\\_g2hKwvshD9I](https://www.mlpa.com/WebForms/WebFormDBData.aspx?FileOID=_g2hKwvshD9I).

NCBI Gene. [online] [navštíveno 7. 1. 2019] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6473>

News Medical Life Sciences. [online] [navštíveno 13. 11. 2018] Dostupné z: <https://www.news-medical.net/health/Turner-Syndrome-Signs-and-Symptoms.aspx>

Paciorek C. J., Stevens G. A., Finucane M. M., Ezzati M. (2013): Children's height and weight in rural and urban populations in low-income and middle-income countries: a systematic analysis of population-representative data. *The Lancet Global Health*, 1(5), 300–309.

Pomahačová R., Kalvachová B. (2013): *Dětská endokrinologie do kapsy*. 2. vydání, pp. 144, Mladá fronta, Praha.

Rao E., Blaschke R. J., Marchini A., Niesler B., Burnett M., Rappold G. A. (2001): The Leri–Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX encodes a cell-type specific transcriptional activator, *Human Molecular Genetics*, 10(26), 3083–3091.

Rao E., Weiss B., Fukami M., Rump A., Niesler B., Mertz A., Murova K., Binder G., Kirsch S., Winkelmann M., Nordsiek G., Heinrich U., Breuning M. H., Ranke M. B., Rosenthal A., Ogata T., Rappold G. A. (1997): Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nature Genetics*, 16(1), 54–63.

Rappold G., Blum W. F., Shavrikova E. P., Crowe B. J., Roeth R., Quigley C. A., Ross J. L., Niesler B. (2007): Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of *SHOX* haploinsufficiency. *Journal of medical genetics*, 44(5), 306–313.

Rappold G. A., Fukami M., Niesler B., Schiller S., Zumkeller W., Bettendorf M., Heinrich U., Vlachopapadopoulou E., Reinehr T., Onigata K., Ogata T. (2002): Deletions of the Homeobox Gene *SHOX* (Short Stature Homeobox) Are an Important Cause of Growth Failure in Children with Short Stature. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(3), 1402–1406.

Ross J. L., Scott C., Marttila P., Kowal K., Nass A., Papenhausen P., Abboudi J., Osterman L., Kushner H., Carter P., Ezaki M. E., Elder F., Wei F., Chen H., Zinn A. R. (2001): Phenotypes Associated with *SHOX* Deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(12), 5674–5680.

Sandoval G. T., Jaimes G. C., Barrios M. C., Cespedes C., Velasco H. M. (2014): *SHOX* gene and conserved noncoding element deletions/duplications in Colombian patients with idiopathic short stature. *Molecular genetics & genomic medicine*, 2(2), 95–102.

Scott H., Kozin M. D., Dan A., Zlotolow M. D. (2015): Madelung deformity. *The Journal of Hand Surgery*, 40(10), 2090–2098.

Schouten J. P., McElgunn C. J., Waaijer R., Zwijnenburg D., Diepvens F., Pals G. (2002): Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, 30.

Social Science Statistics. [online] [navštíveno 12. 10. 2018] Dostupné z:  
<https://www.socscistatistics.com/tests/fisher/default2.aspx>

Šolc R. (2017): Molekulárně genetická analýza vybraných kryptických přestaveb lidských chromosomů. Disertační práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha.

Šulová L. (2004): Raný psychický vývoj dítěte. Karolinum, Praha.

The Human Protein Atlas a. [online] [navštíveno 7. 1. 2019] Dostupné z:  
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000185960-SHOX/cell>

The Human Protein Atlas b. [online] [navštíveno 7. 1. 2019] Dostupné z:  
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000185960-SHOX/tissue>

UCSC Genome Browser. [online] [navštíveno 7. 1. 2019] Dostupné z:  
<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks>

UniProt. [online] [navštíveno 7. 1. 2019] Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/O15266>



Vícha A., Eckschlager T. (2008): Využití MLPA techniky k průkazu genetických změn u neuroblastomu. *Klinická onkologie*, 21(4), 149–153.

Volejnikova J., Zapletalova J., Jarosova M., Urbankova H., Petr V., Klaskova E., Horwitz M. S., Haiduch M., Mihal V. (2018): Acute lymphoblastic leukemia in a child with Leri-Weill syndrome and complete SHOX gene deletion: A Case Report. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, 162(1), 65–70.

Wikipedia. [online] [navštíveno 3. 10. 2018] Dostupné z:

[https://en.wikipedia.org/wiki/Sanger\\_sequencing](https://en.wikipedia.org/wiki/Sanger_sequencing)

Zapletalová J., Lebl J., Baxová A., Hirschfeldová K. (2010): Defekt v SHOX genu – příčina familiárního malého vzrůstu. *Remedia*, 5.

## 9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Cytogenetické vyšetření karyotypu z lymfocytu periferní krve.



**Fakultní nemocnice Olomouc**  
**Ústav lékařské genetiky**

**SOP-02-01**

Vydání: 2.	Počet stran: 9
Datum vydání: 01. 01. 2015	Platnost od: 01. 01. 2015

### Cytogenetické vyšetření karyotypu z lymfocytů periferní krve

Zpracoval: RNDr. Kateřina Adamová, Ph.D. vedoucí Postnatální cytogenetické laboratoře	Přezkoumal: RNDr. Pavlína Čapková, Ph.D. vedoucí Prenatální cytogenetické laboratoře	<input type="checkbox"/> Originál <input type="checkbox"/> Číslo kopie:
Schválil:  doc. RNDr. Radek Vrtěl, Ph.D. zástupce přednosty		
Dokument je majetkem FNOL a je zakázáno informace v něm předávat mimo nemocnici. Kopírování tohoto dokumentu je přípustné pouze se souhlasem manažera kvality pracoviště.		



## Obsah

<b>1. Vymezení pojmů</b> .....	<b>3</b>
1.1 DEFINICE .....	3
1.2 POUŽITÉ ZKRATKY .....	3
<b>2. Účel a rozsah platnosti</b> .....	<b>3</b>
<b>3. Odpovědnosti</b> .....	<b>3</b>
<b>4. Princip metody</b> .....	<b>3</b>
<b>5. Potřebná zařízení a činidla</b> .....	<b>3</b>
5.1 PŘÍSTROJE A POMOCNÁ ZAŘÍZENÍ.....	3
5.2 ROZTOKY.....	4
5.3 SPOTŘEBNÍ MATERIÁL .....	4
<b>6. Postupy kalibrace – metrologická návaznost</b> .....	<b>4</b>
<b>7. Požadavek na odběr biologického materiálu a transport</b> .....	<b>4</b>
<b>8. Postup</b> .....	<b>5</b>
8.1 KULTIVACE LYMFOCYTŮ PERIFERNÍ KRVE.....	5
8.2 NAsAZENÍ KE KULTIVACI.....	5
8.3 ZPRACOVÁNÍ KULTURY.....	5
8.4 G PRUHOVÁNÍ.....	6
8.5 HODNOCENÍ PREPARÁTŮ POSTNATÁLNÍHO CYTOGENETICKÉHO VYŠETŘENÍ BARVENÝCH G-PRUHOVÁNÍM 6	6
8.6 VYDÁVÁNÍ VÝSLEDKŮ .....	7
8.7 ÚDRŽBA MIKROSKOPICKÉ TECHNIKY A ZÁSADY PRÁCE S PROGRAMEM LUCIA .....	7
<b>9. Preventivní bezpečnostní opatření</b> .....	<b>7</b>
<b>10. Vyhodnocení výsledku (kritéria pro propuštění výsledku, kritické hodnoty)</b> .....	<b>7</b>
10.1 ZÁSADY POSTUPU VÝPOČTU VÝSLEDKU VČETNÉ NEJISTOTY MĚŘENÍ.....	7
10.2 BIOLOGICKÉ REFERENČNÍ ROZMEZÍ.....	7
10.3 ROZMEZÍ VÝSLEDKŮ VYŠETŘENÍ PŘIJATELNÉ PRO ZPRÁVU .....	7
10.4 VAROVNÉ KRITICKÉ HODNOTY .....	7
10.5 LABORATORNÍ INTERPRETACE .....	7
<b>11. Validace a verifikace</b> .....	<b>8</b>
11.1 PROCESNÍ VALIDACE.....	8
<b>12. Kontrola kvality</b> .....	<b>8</b>
12.1 INTERNÍ KONTROLA.....	8
12.2 EXTERNÍ KONTROLA KVALITY .....	8
<b>13. Související dokumenty</b> .....	<b>8</b>
13.1 DOKUMENTY VYŠŠÍ ÚROVNĚ, DOKUMENTY FNOL.....	8
13.2 VYSTAVENÉ DOKUMENTY .....	9
<b>14. Závěrečná ustanovení</b> .....	<b>9</b>
14.1 PLATNOST DOKUMENTU.....	9
14.2 DRŽITELÉ SMĚRNICE.....	9
<b>15. Přílohy</b> .....	<b>9</b>
<b>16. Revize</b> .....	<b>9</b>
<b>17. Poznámky (specifika CL)</b> .....	<b>9</b>
17.1. NÁRODNÍ ČÍSELNÍK LABORATORNÍCH VÝKONŮ .....	9



## 1. Vymezení pojmů

### 1.1 Definice

Neaplikováno.

### 1.2 Použité zkratky

AMC	odběr plodové vody (amniocentéza)
CEQA	cytogenetic european quality assessment (cytogenetická kontrola kvality)
CVS	odběr choriových klků
SVEOB	sklad všeobecného materiálu
ZL	zdravotní laborant

## 2. Účel a rozsah platnosti

Účelem vyšetření je získání a vyhodnocení karyotypu probanda vyšetřením lymfocytů z periferní krve.

## 3. Odpovědnosti

Stanoveny v textu.

## 4. Princip metody

Podrobná mikroskopická analýza metafázních chromozomů je základním cytogenetickým vyšetřením. Metodou kultivace lymfocytů periferní krve jsou získány mitotické buňky (chromozomy v metafázi buněčného dělení). Po jejich zpracování a diferenačním barvení je sestaven a hodnocen karyotyp probanda. V normálním jádře somatické buňky člověka je 46 chromozomů (22 párů autozomů a jeden pár gonozomů – dva gonozomy X u ženy a jeden gonozom X a jeden Y u muže). Pokud se vyskytne odchylka od standardního počtu nebo struktury chromozomů je popsána jako chromozomální aberace, podle svého typu numerická nebo strukturní.

Heparinovaná periferní krev probanda se kultivuje v kultivačním médiu, poté se působením kolcemidu nebo kolchicinu zastavuje buněčné dělení, preparát se hypotonizuje a fixuje na podložní sklíčko. To se následně barví (G- Pruhoování, C- barvení) a mikroskopicky analyzuje s pomocí světelného mikroskopu s použitím imerzního objektivu se 100 násobným zvětšením. Sestavuje se karyotyp probanda. Provádí se standardizovaný zápis nalezeného karyotypu v souladu s mezinárodním systémem lidské cytogenetické nomenklatury (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, zkr. ISCN 2009).

Výsledek je k dispozici do 14 dnů od odebrání vzorku. Celý Standardní operační postup je prováděn na pracovišti GEN.

## 5. Potřebná zařízení a činidla

Pro jednotlivé části pracovního postupu jsou používány komerčně vyráběné chemikálie, event. z nich připravené roztoky.

### 5.1 Přístroje a pomocná zařízení

#### 5.1.1 Přístroje pro hodnocení preparátů

Název	Specifikace	Výrobce
světelný mikroskop	BX41	OLYMPUS
světelný mikroskop	BX40	OLYMPUS
světelný mikroskop	BX 53	OLYMPUS
karyotypovací zařízení	Lucia Cytogenetics	Laboratory Imaging

#### 5.1.2 Pomocná zařízení

Název	Specifikace	Výrobce
laminární box	Biostar Plus	KRD



termostat	BT 120-TLK 38	Lab.přístroje Praha
centrifuga	NF 800/800R	Nüve
centrifuga	ROTOFIX 32	Hettich Zentrifugen
digestoř	Merci	Merci
nahřívací ploténka	SW 85	Adamas
chladnička		BOSCH
mrazák		BOSCH
teploměry		
automatické pipety		

## 5.2 Roztoky

Pro jednotlivé části pracovního postupu jsou používány komerčně vyráběné chemikálie a z nich připravené roztoky (lékárna FNOL).

### 5.2.1 Nasazení periferní krve

Název	Specifikace	Výrobce
RPMI	RPMI 1640	SIGMA Aldrich (resp.ekvivalent jiné firmy)
Bovinní sérum	PAN	Biotech GmbH (-dtto-)
Phytohemaglutinin	HA-15	REMEL Inc. (-dtto-)
Penicilin-Streptomycin	10mg/ml	Biotika SK (-dtto-)
Voda pro injekci	sterilní	Braun (-dtto-)

### 5.2.2 Zpracování periferní krve

Název	Specifikace	Výrobce
Kolcemid	10 ug/ml	EuroClone (resp. ekvivalent jiné firmy)
Chlorid draselný	p. a.	LACHEMA (-dtto-)
Metanol	p. a.	Lach-Ner (-dtto-)
Kyselina octová ledová	99%, p. a.	Lach-Ner (-dtto-)
Voda destilovaná	voda čištěná	Lékárna FNOL

### 5.2.3 Barvení preparátu

Název	Specifikace	Výrobce
Giemsa-Romanowski	zkoumadlo	PENTA (resp. ekvivalent jiné firmy)
Sörensenův roztok	pH 6,8 ± 0,1	Lékárna FNOL
Voda destilovaná	voda čištěná	Lékárna FNOL
Trypsin		SIGMA-Aldrich (-dtto-)

### 5.2.4 Mikroskopické hodnocení

Název	Specifikace	Výrobce
Imerzní olej	500CC	Olympus
Etylalkohol 96,5%	p.a.	Lékárna FNOL

## 5.3 Spotřební materiál

Název	Specifikace	Výrobce
Komerční sady k odběru krve		
Plastové kultivační zkumavky	Sterilní PP 10ccm	GAMA Group a.s. (resp.ekviv. jiné firmy)
Podložní mikroskopická skla	Thermo Scientific	Mänzel Gläser (-dtto-)
Injekční stříkačky a jehly	dle aktuál. nabídky SVEOB FNOL	
Jednorázové špičky pro ruční automatické pipety		(-dtto-)
Chemické sklo		(-dtto-)

## 6. Postupy kalibrace – metrologická návaznost

Kalibrace a validace přístrojů musí být v souladu s Metrologickým řádem.

## 7. Požadavek na odběr biologického materiálu a transport

Primárním vzorkem jsou 2 - 5 ml nesrážlivé žilní krve. Odběr musí být prováděn v souladu s Laboratorním manuálem GEN. Sterilní PET zkumavka s heparinem (Vacuette, Greiner bio-one resp. odpovídající výrobek jiné firmy).



Odebraný materiál je neprodleně transportován do prenatální cytogenetické laboratoře. Odběr a transport musí být v souladu s LM.

## 8. Postup

### 8.1 Kultivace lymfocytů periferní krve

Vzorky bývají nasazovány ke kultivaci v den odběru, uchovávány jsou při laboratorní teplotě. Vzorky lze skladovat v chladničce při 4 - 8°C 2-3 dny pro případné opakování vyšetření nebo pozdější nasazení.

Materiál: kultivační medium RPMI 1640

bovinní fetální sérum

penicilin 10mg/ml

phytohaemagglutinin lyofilizovaný

kolcemid

chlorid draselný p.a.

kyselina octová 99% p.a.

metanol konc. p.a.

spotřební materiál - zkumavky, podložní sklička, laboratorní sklo

#### 8.1.1 Příprava kultivačního roztoku (na kohortu 25 pacientů)

100 ml média

25 ml fetálního bovinního séra

2 kapky penicilinu žlutou jehlou

Pozn: při nevyužití celého objemu kultivačního roztoku je tento zamražen po alikvotech 2,5 ml při -18 až -22°C a použit při následujícím nasazení.

#### 8.1.2 Nasazení ke kultivaci

2,5 ml kultivačního roztoku (sterilní injekční stříkačkou se žlutou jehlou)

20 kapek žilní krve u novorozenců a dětí do cca 3 měsíců 10 a 15 kapek (žlutou jehlou)

3 kapky phytohaemagglutininu (žlutou jehlou)

vše do 10 ml plastové sterilní zkumavky, uzavřít zátkou, lehce protřepat

Pozn. Nasazujeme vždy dvě zkumavky od každého pacienta.

Kultivace probíhá 69 - 73 hod při 36,5 - 38°C v termostatu v šikmé poloze.

## 8.2 Zpracování kultury

- přidat 4 kapky kolcemidu černou jehlou, lehce protřepat
- cca 1,5 hod kultivovat v termostatu při 36,5 - 38°C
- centrifugace při 900 - 1000 ot/min 9 - 10 min.
- odsátí nebo slítí supematantu
- přidání cca 5 - 6 ml 0,075M KCl (1,4g KCl/250 ml destilované vody). Hypotonický roztok připravuje ZL den předem, ponechává při laboratorní teplotě a před použitím nahřívá v termostatu cca 1,5 hod na teplotu 36,5 - 38°C.
- hypotonizace probíhá 0 - 10 min v termostatu při 36,5 - 38°C (časy hypotonizace jsou závislé na empirických zkušenostech každé ZL a mění se podle aktuální situace)
- centrifugace 9 - 10 min 900 - 1000 ot/min
- odsátí nebo slítí supematantu
- 1. fixace - přidání cca 8 ml fixačního roztoku, zpočátku po kapkách a protřepávat asi 1 ml, zbytek je možno dolít, jemně ale důkladně protřepat  
fixační roztok - kyselina octová konc. p.a.: metanol konc. p.a. v poměru 1:3 je na každé zpracování čerstvě předem připravený a uložený cca 1,5 hodiny před použitím v mrazáku při -18 až -22°C
- centrifugace 9 - 10 min 900 - 1000 ot/min
- 2. fixace - přidat cca 8 ml fixačního roztoku, protřepat
- centrifugace 9 - 10 min 900 - 1000 ot/min



- odsátí nebo slítí supematantu
- 5 - 10 kapek suspenze sedimentu se nakapává automatickou pipetou na podložní skla nadýchnutá, namražená nebo namočená do destilované vody (způsob přípravy podložních sklíček stanoví ZL po mikroskopickém prohlédnutí nativního preparátu. Nevyhovující preparáty likviduje).
- Pokud ZL není spokojena s kvalitou preparátu po druhé fixaci, může být provedena ještě
- 3. fixace – analogická se 2. fixací
- z jedné zkumavky se nakápnou 3 - 4 skla
- popis skel - viz Sm 05
- skla před barvením ponechat 2 dny "dozrát" při lab. teplotě nebo nahřát na plotýnce cca 10 min při 75 - 85°C. Po skončení práce plotýnku očistit buničinou navlhčenou v destil. vodě.

### 8.3 G pruhování

Materiál: Giemsa

Peroxid vodíku 20% p.a. (připravuje lékárná)

Trypsin 1:250 (navážky trypsinu po 250 mg navažuje ZL a uchovává v uzavřených 10 ml plastových zkumavkách v mrazáku při -18 až -22°C)

Sörensenův pufr (připravuje lékárná)

#### 8.3.1 Barvicí roztoky

Roztok trypsinu: 0,25% (250 mg trypsinu ve 100 ml Sörensenova pufru)

Roztok Giemsy: 5% (5ml Giemsy, 95 ml Sörensenova pufru)

Peroxid vodíku: 20%

Postup barvení: skla ponořit na 2 - 12s do peroxidu vodíku, umýt pod proudem studené vody (z kohoutku), ihned ponořit do roztoku trypsinu 2 - 10s, opláchnout pod tekoucí vodou a barvit v 5% roztoku Giemsy 2 - 5 min. Opláchnout vodou, na vzduchu oschnout.

Poznámka: časy pro působení enzymu je nutno vyzkoušet. Časy stanoví ZL po mikroskopickém prohlédnutí nabarveného zkušebního preparátu.

### 8.4 Hodnocení preparátů postnatálního cytogenetického vyšetření barvených G-pruhováním

U každého případu hodnotí ZL minimálně 10 – 15 metafází numericky a zakreslí je. Pokud není možno zhodnotit numericky minimálně 10 metafází je nutno toto uvést ve výsledkové zprávě. Ze dvou mitóz jsou sestaveny karyogramy, které jsou ZL zdokumentovány pomocí zobrazovací techniky Lucia Karyo a uloženy do databáze. Podrobná strukturní analýza je prováděna VŠ minimálně u dvou mitóz. Je nutné strukturně zhodnotit každý pár chromosomů zřetelně viditelný, bez překřížení minimálně ve dvou mitózách.

Kvalita hodnocení spočívá na počtu pozorovaných hodnotitelných G pruhů v haploidní sadě. Příslušná kvalitativní úroveň je uvedena v příloze 1 této SOP.

Výsledný karyotyp a případné odchylky v počtu nebo struktuře chromosomů jsou zapsány atestovaným VŠ dle platné mezinárodní ISCN nomenklatury do výsledkové zprávy.

V případě nálezů mozaiky v některých mitózách, zvyšujeme počet hodnocených mitóz na minimálně 30.

V případě detekce suspektní fyziologické varianty ve formě fakultativního heterochromatinu je nutné ji ověřit C- barvením (Příloha č. 2).

Nelze-li strukturní analýzu provést v požadované kvalitativní úrovni, je nutno toto opět uvést ve výsledné zprávě. VŠ rozhodne o dalším postupu (nové nakapání suspenze na skla, opakované nasazení původní krve pacienta, případně se indikující lékař rozhodne o provedení nového odběru).



### 8.5 Vydávání výsledků

Písemnou laboratorní zprávu vydává po podpisu atestovaný VŠ - viz PK a Sm 05 Hlavní proces.

### 8.6 Údržba mikroskopické techniky a zásady práce s programem Lucia

Po skončení práce s mikroskopem je nutné očistit mikroskop od zbytků imerze. Stolek a objektiv očistíme suchou buničinou, objektivy nejprve jemně suchou buničinou a poté buničinou s několika kapkami roztoku etér : etanolu 7:3. Při práci s mikroskopem respektujeme pokyny výrobce uvedené v manuálu. Pravidelný servis a jiné zásahy jsou zapisovány do Provozního deníku. Za vedení Provozního deníku a péči o svěřený mikroskop zodpovídá příslušná ZL a VŠ. Přístup do databáze a programu Lucia je omezen pouze na pracovníky cytogenetických laboratoří, kteří se přihlašují pod svými čísly a hesly. ZL a VŠ pracují s programem Lucia v souladu s Uživatelskou příručkou. Další viz PK.

## 9. Preventivní bezpečnostní opatření

Vyšetření je prováděno v souladu s bezpečnostními a hygienickými pravidly platnými ve FNOL. Při založení kultury a během kultivace je nutné dodržovat zásady sterility při práci. Před zahájením práce v biohazardu je nutné provést preventivní UV sterilizaci (viz manuál biohazardu), stejně jako po skončení práce, kdy kromě UV programu provede ZL, která zde vykonávala práci, úklid a dekontaminaci vnitřního povrchu desinfekčním roztokem.

Za úklid biohazardu zodpovídá ZL, která provádí založení kultury. Svým podpisem do "Knihy nasazení vzorků k postnatální chromozomální analýze" stvrzuje ZL, že toto provedla.

Za očištění nahřívací plotýnky po použití zodpovídá ZL, která s přístrojem pracuje.

Další opatření jsou stanovena v samostatném dokumentu identifikovaném v Příručce kvality.

## 10. Vyhodnocení výsledku (kritéria pro propuštění výsledku, kritické hodnoty)

### 10.1 Zásady postupu výpočtu výsledku včetně nejistoty měření

Výstupem zkoušky je karyotyp o požadovaném počtu pruhů a požadované kvalitě barvení (nepodkročitelné minimum 400 nebo 500 pruhů v haploidní sadě) viz příloha č. 1 této SOP.

Hodnotíme optimální (co nejméně zkřížené a optimálně dlouhé a rozprostřené) mitózy (chromozomy). Numericky hodnotí laborantka nejméně 10 mitóz se zakreslením a dalších 5 bez zakreslení. Sestavuje 2 karyogramy pomocí programu Lucia.

VŠ pracovník kontroluje numerické hodnocení provedené ZL a provádí podrobnou cytogenetickou analýzu struktury všech chromozomů z mikroskopu a z obrazové analýzy.

### 10.2 Biologické referenční rozmezí

Nespecifikováno.

### 10.3 Rozmezí výsledků vyšetření přijatelné pro zprávu

Ze vzorku musí být získáno 10 - 15 hodnotitelných mitóz. Při nedosažení požadované kvalitativní úrovně metafází rozhodne VŠ o dalším postupu.

### 10.4 Varovné kritické hodnoty

Jakákoliv odchylka od fyziologického karyotypu 46,XX a 46,XY ve smyslu početním nebo strukturálním.

### 10.5 Laboratorní interpretace

Zápis karyotypu podle norem ISCN 2009 a písemné zhodnocení získaného výsledku provádí atestovaný VŠ. Výsledná interpretace laboratorního výsledku je prováděna výhradně klinickým genetikem s příslušnou odborností.





## 11. Validace a verifikace

### 11.1 Procesní validace

Aplikace procesní validace prováděná dle validačního protokolu: při výskytu neshod (např. neshoda při EKK nebo při meziročním poklesu úspěšnosti o více jak 2%), při selhání úspěšnosti kultivace v celé kohortě pacientů, na základě rozhodnutí vedoucí laboratoře.

## 12. Kontrola kvality

### 12.1 Interní kontrola

#### 12.1.1. Kontrola interpersonální variability – „dvoji čtení“

Dle doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích. Vzhledem k tomu, že neexistují obecná doporučení pro verifikaci dané metody je prováděna interní verifikace metody „dvojitým čtením“ (paralelní vyhodnocení dvěma atestovanými cytogenetiky) vždy u 4 vzorků za rok – viz verifikační list (u manažerky kvality).

#### 12.1.2 Kontinuální interní kontrola kvality

Stanovení úrovně resoluce pro jednotlivé indikační skupiny je uvedeno v příloze č. 1 této SOP. Při nedosažení této resoluce toto musí být uvedeno ve výstupní zprávě. Vedoucí laboratoře zajišťuje nápravu pro dosažení zlepšení kvality zpracování (např. procesní validací apod.) a průběžnou kontrolu kvality zpracování. Laboratoř má stanovena kritéria pro jednotlivé úrovně resoluce (viz příloha č. 1 této SOP). Interní kontrola kvality hodnocení je zajišťována dvoustupňově – prvotní hodnocení je prováděno ZL a posléze kontrolováno VŠ. V případě hodnocení dětských pacientů do patnácti let je prováděno dvojitě hodnocení dvěma VŠ pracovníky.

#### 12.1.3 Kontrola kvality vstupních chemikálií a nových šarží používaných chemikálií

Verifikace prováděná při vstupu nových materiálů a nových šarží porovnáním s dosavadně používanými. (Záznam viz dokument Fm-L009-026-GEN-040, Fm-L009-026-GEN-041, Fm-L009-026-GEN-042 a Fm-L009-026-GEN-043).

### 12.2 Externí kontrola kvality

Externí kontrola kvality je zajišťována formou mezilaboratorního porovnávání vzorků minimálně 1x ročně. V případě zavedení mezinárodního systému kontroly kvality cytogenetických laboratoří CEQA – Cytogenetic European Quality Assessment, který je součástí EurogenTest Network of Excellence kontrola probíhá 1x ročně.

## 13. Související dokumenty

### 13.1 Dokumenty vyšší úrovně, dokumenty FNOL

ISCN - An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Shaffer, L.G., Slovak M.L., Campbell L.J. Karger S. Medical and Scientific Publishers, Basel, 2009.

Professional Guidelines for Clinical Cytogenetics, 2007

Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance (A common European framework for quality assessment for constitutional and acquired cytogenetic investigation)

E.C.A. Permanent Working Group for Cytogenetics and Society.

Chromosome synchro P for cell culture (Euroclone)- protocol of use

Příručka kvality GEN

Laboratorní manuál GEN

Sm 04 Prostředí, zařízení a přístroje, nakupování

Sm 05 Hlavní proces

Sm 06 Příjem biologického materiálu



### 13.2 Vystavené dokumenty

formuláře: Kniha nasazení vzorků k postnatální chromosomální analýze  
Záznam o vyhodnocení metafáz „kolečka“  
Verifikace v případě nové šarže séra  
Verifikace v případě nové šarže PHA  
Verifikace v případě nové šarže média  
Verifikace v případě nové šarže kolcemidu  
Záznam o výsledku mezilab. porovnání vzorků  
Záznam o procesní validaci  
Verifikační protokol

Knihy: Evidence pacientů a výsledků postnatální chromosomální analýzy

### 14. Závěrečná ustanovení

#### 14.1. Platnost dokumentu

Uvedena v zápatí dokumentu.

#### 14.2. Držitelé směrnice

Dokument veden elektronicky.

### 15. Přílohy

Příloha č. 1 Kritéria pro jednotlivé úrovně a rezoluce pro jednotlivé indikační skupiny.

Příloha č. 2 C- barvení.

Příloha č. 3 Cytogenetické vyšetření karyotypu z lymfocytů periferní krve s využitím synchrosetu synchro P (Euroclone).

### 16. Revize

Revize a změny dokumentu se provádí do Fm-G001-REV-001 Záznam o revizi ON a Fm-G001-ZMENA-001 Změnový protokol vedených u správce dokumentace.

### 17. Poznámky (specifika CL)

Má-li být vzorek dlouhodobě skladován v podobě suspenze, ponechává se v uzavřené zkumavce v poslední fixaci v mrazáku (-18 až -22°C). Preparát lze později prefixovat 2 - 3 minuty v čerstvě připraveném fixačním roztoku (kyselina octová konc. p.a. : metanol konc. p.a. v poměru 1:3) a po uzrání dobarvit výše uvedeným způsobem.

#### 17.1. Národní číselník laboratorních výkonů

Výkon není zahrnut do národního číselníku

Kódy pojišťoven pro jednotlivé výkony:

94 129 Rutinní vyšetření chromosomů z periferní krve

94 181 Zhotovení karyotypu minimálně ze dvou mitos včetně fotodokumentace