

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2010

Marie Drlíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Studium chromozomu X u pacientek
s Turnerovým syndromem**

Bakalářská práce

Marie Drlíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2010

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Radek Vrtěl, Ph.D.

Souhrn

Práce pojednává o problematice Turnerova syndromu, který je diagnostikován pouze u ženské populace s četností výskytu 1:2000 až 1:2500 narozených dětí. Mezi hlavní projevy patří poruchy růstu, skeletu, lymfatické a neurologické.

Část práce popisuje klinické projevy tohoto onemocnění, genetické aspekty vzniku choroby a současné způsoby léčby. V dalších kapitolách jsou popsány molekulární markery se zaměřením na STR markery, pomocí nichž je možné původ X chromozomu identifikovat.

V rámci bakalářské práce byla provedena studie původu chromozomu X u dvanácti pacientek. K analýze byla použita DNA vyizolována Millerovou metodou z periferní krve.

Experimentální část zahrnuje aplikaci v 8% denaturačním a nativním PAGu pro stanovení původu chromozomu X.

Summary

This thesis deals with the Turner's syndrome, which is diagnosed only in female population with the frequency of 1:2000 to 1:2500 among born children. The main manifestation of this syndrome is disturbed growth and body structure, mainly lymphatic and neurological.

A part of this thesis describes clinical manifestation of this illness, genetical aspects of the disease's occurrence and nowadays treatment. Next chapters include molecular markers with the focus on STR markers. Thanks to these markers it is possible to identify the origin of the X chromosome.

In this bachelor's work a study of the origin of the X chromosome was done in twelve female patients. For the analysis a DNA was isolated by the Miller's periphery blood method.

The experimental part of the work contains the application in 8% of denaturated and native PAG for defining the origin of the X chromosome.

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci zpracovala samostatně a s použitím uvedené literatury.

Olomouc 2.5.2010

.....

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu Doc.RNDr. Radku Vrtělovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a umožnění práce na zajímavém tématu. Za nezištnou pomoc paní Evě Krejčířkové. Své rodině a přátelům děkuji za trvalou podporu během studia.

Obsah

1	ÚVOD	8
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	9
2.1	TURNERŮV SYNDROM.....	9
2.2	DIAGNOSTIKA ONEMOCNĚNÍ.....	9
2.3	OBECNÁ PATOGENEZE	10
2.3.1	<i>Cytogenetika.....</i>	<i>10</i>
2.4	KLINICKÉ PROJEVY A JEJICH PŘÍČINY	12
2.4.1	<i>Poruchy růstu a skeletu.....</i>	<i>12</i>
2.4.2	<i>Gonády.....</i>	<i>14</i>
2.4.3	<i>Lymfatický systém.....</i>	<i>16</i>
2.4.4	<i>Neurokognitivní poruchy.....</i>	<i>16</i>
2.5	MOLEKULÁRNÍ MARKERY	17
2.5.1	<i>Využití DNA markerů</i>	<i>17</i>
2.5.2	<i>Charakteristika DNA markerů</i>	<i>18</i>
2.5.3	<i>STR marker.....</i>	<i>19</i>
3	CÍL PRÁCE	21
4	MATERIÁL A METODIKA.....	22
4.1	LABORATORNÍ VYBAVENÍ.....	22
4.2	SOUBOR VYŠETŘOVANÝCH PACIENTŮ	23
4.3	IZOLACE DNA MILLEROVOU METODOU	23
4.4	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)	25
4.5	ELEKTROFORÉZA NA AGARÓZOVÉM GELU	28
4.6	ELEKTROFORÉZA NA POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU (PAG).....	29
5	VÝSLEDKY	32
6	DISKUZE	34
7	ZÁVĚR.....	35
8	LITERATURA	36
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	39
10	PŘÍLOHY	41

1 Úvod

Historie rozpoznání zdravotní poruchy, označované dnes jako Turnerův syndrom, začíná roku 1768. První zmínku nacházíme v díle Giovanni Battisty Morgagniho. Morgagni popsal u pitvané ženy malou postavu, tvarovou anomálii ledvin a chybějící ovariální tkáň. Ve většině zemí se však spojuje výlučně se jménem oklahomského internisty a endokrinologa Henryho Turnera, jehož pozorování sice nebylo první, bylo však nejúplnější a pojednávalo poprvé o větší skupině pacientek. V roce 1949 učinili významný objev Murray Llewellyn Barr a Edward George Bertram. Zjistili, že pro genetické pohlaví jedince je typická přítomnost nebo nepřítomnost Barrova tělíška v interfázi. U žen se Barrovo tělíško v buňkách nachází, u mužů nikoliv. V roce 1954 prokázal Polani, že pacientkám s Turnerovým syndromem Barrovo tělíško chybí (Polani P. *et al.*, 1954). Tím byl položen základ pro rozpoznání chromozomální aberace jako příčiny Turnerova syndromu.

Turnerův syndrom je chromozomální aberace. Jedná se o monozomii na chromozomu X (45,X) s četností výskytu 1:2000 až 1:2500 narozených dětí (Zapletalová J. *et al.*, 2005). Mezi příznaky, které postihují pacientky s Turnerovým syndromem patří růstová porucha a kostní abnormality, odchylky v utváření měkkých tkání a vnitřních orgánů, gonadální dysgeneze a neurokognitivní dysfunkce.

2 Současný stav řešené problematiky

V této kapitole je nastíněna problematika Turnerova syndromu a metody jeho diagnostiky. Dále je pozornost zaměřena na cytogenetické vyšetření a vliv genů v rámci chromozomu X. Jsou zde popsány klinické projevy a jejich příčiny. Další část práce popisuje molekulární markery se zaměřením na STR markery.

2.1 Turnerův syndrom

Turnerův syndrom je jedním ze syndromů způsobených numerickou chromozomální aberací. Představuje zřejmě jedinou kompletní monozomii, jejíž nositelé jsou schopni dlouhodobě žít. Vyskytuje se pouze u žen, je zapisován karyotypem 45,X. U pacientek s Turnerovým syndromem se může vyskytovat řada tělesných příznaků. Jejich stupeň vyjádření je však velmi variabilní. Fenotyp do určité míry koreluje s karyotypem, respektive s genotypem, i když rozdílný klinický obraz někdy pozorujeme i u dívek a žen se stejnou chromosomální abnormalitou (Zapletalová J. *et al.*, 2005).

2.2 Diagnostika onemocnění

Metody pro diagnostiku lze rozdělit na diagnostiku prenatální a diagnostiku postnatální. Z prenatální diagnostiky se uplatňuje především ultrasonografie, kde hlavním markerem je hygroma colli cysticum a stanovení karyotypu po amniocentéze, respektive odběru choriových klků. Nověji se uplatňuje také metoda amnio-PCR, jejíž výsledek je ještě nutné potvrdit karyotypizací (Massa G., Verlinde F., *et al.*, 2005). Podle současné tendence není Turnerův syndrom primární indikací k ukončení těhotenství.

V postnatální diagnostice se uplatňuje vyšetření karyotypu, které je nutné k potvrzení diagnózy. Je indikováno lékařem při přítomnosti některých příznačných projevů syndromu.

2.3 Obecná patogeneze

Při identifikaci patogenetických mechanismů u syndromu způsobeného numerickou chromozomální aberací je soustředěna pozornost zejména na karyotyp a na to, jakým způsobem chybějící nebo přebývající (u jiných syndromů) genetická informace ovlivňuje fyziologické procesy na úrovni buňky, orgánů i organismu. V dalších odstavcích bude rozebrána situace z hlediska cytogenetiky a molekulární genetiky.

2.3.1 Cytogenetika

Jak již bylo řečeno v úvodu, Turnerův syndrom je nejčastěji způsoben monozomií chromozomu X, tedy karyotypem 45,X (starší zápis 45,X0 je podle současné normy ISCN 1995 nepřipustný). Nepřítomnost chromozomu Y (existují výjimky – viz. níže) určuje vývoj směrem k ženskému pohlaví – syndrom je tak charakteristický pro ženy. Okolo 50% případů Turnerova syndromu však je podmíněno jiným karyotypem – nejčastěji to jsou chromozomální mozaiky: 45,X/46,XX; 45,X/47,XXX; případně i 45,X/46,XX/47,XXX, dále strukturální aberace – izochromozom X: 46,X,i(Xq); vzácně i 46,X,i(Xp), delece krátkých nebo dlouhých ramének chromozomu X: 46,X,del(Xp); respektive 46,X,del(Xq), kruhový chromozom X: 46,X,r(X) nebo idiocentrický chromozom X: 46,X,idic(X). Tyto strukturální aberace se mohou vyskytovat i v rámci chromozomální mozaiky – například 45,X/46,X,r(X). Mezi vzácné chromozomální nálezy patří například přítomnost markeru chromozomu: 46,X + nebo různé reciproké translokace chromozomu X. Zvláštní pozornost si zaslouží případy spojené s výskytem chromozomu Y v karyotypu. Ne všechny tyto případy lze považovat za Turnerův syndrom v pravém slova smyslu, dokonce nemusí být vždy spojeny výhradně s ženským fenotypem. Jedná se zejména o mozaiku 45,X/46,XY (spojenou se smíšenou gonadální dysgenezí) nebo o karyotyp 46,XY (spojený s čistou gonadální dysgenezí) (Zapletalová J. *et al.*, 2005). Chromozom Y nemusí být přítomen celý, může se jednat pouze o malý translokovaný úsek, idiocentrický chromozom nebo marker chromozom. Tabulky četnosti jednotlivých karyotypů u pacientek s Turnerovým syndromem najdete v příloze (Tabulky: 11,12).

X chromozom

V rámci Turnerova syndromu z hlediska cytogenetiky existuje určité pojitko - tím je absence celého X chromozomu nebo delece některých jeho částí. Absence určitých genů, které by jinak měly být přítomny, působí patologicky. K tomuto problému je však třeba přistoupit podrobněji, neboť jedinci mužského pohlaví (karyotyp 46,XY) mají rovněž pouze jeden X chromozom a i u žen s úplným karyotypem (46,XX) je jeden z dvojice X chromozomů inaktivován. Inaktivace či lyonizace X chromozomu nastává v časných fázích vývoje (zhruba někdy ve stádiu embrya tvořeného 100 – 200 buňkami) v případě, že karyotyp obsahuje více než 1 X chromozom (nejčastěji v případě úplného ženského karyotypu 46,XX; nicméně dochází k němu i u jedinců mužského pohlaví s Klinefelterovým syndromem – karyotypem 47,XXY a u dalších patologických karyotypů s více než jedním X chromozomem) (Zapletalová J. *et al.*, 2005). Inaktivace X chromozomu je v každé z buněk embrya náhodná, nicméně i trvalá, neboť všechny další buňky vznikající dělením této buňky budou již mít nadále inaktivovaný stejný chromozom ať již maternálního nebo paternálního původu. Takto inaktivovaný X chromozom představuje ložisko vysoce kondenzovaného chromatinu patrné jako tzv. Barrovo tělísko nebo sex chromatin. Jedinci s monozomií 45,X stejně jako muži 46,XY Barrovo tělísko nemají. V procesu inaktivace se uplatňuje X - inaktivační centrum (XIC) a RNA-transkript genu XIST (X Inactivation Specific Transcript; Xq13.2). Regulační úlohu pak má transkript genu TSIX (X Inactivation Specific Transcript Antisense Xq13.2)

Geny

Důležité je, že některé geny na inaktivovaném X chromozomu jsou i nadále transkribovány, proto jsou vzhledem k patogenezi Turnerova syndromu obzvláště zajímavé. Jedná se o tři skupiny genů:

1. Geny lokalizované v tzv. pseudoautozomálních úsecích chromozomu X. Jsou to dva úseky – PAR 1 (větší úsek) na konci krátkého raménka chromozomu X a PAR 2 (menší úsek) na konci dlouhého raménka chromozomu X. Tyto geny mají své homologní kopie ve stejném pořadí na chromozomu Y. Díky těmto oblastem mohou chromozomy X a Y utvořit během meiózy „homologní“ pár. Mezi geny v těchto oblastech může docházet ke crossing-overu.

Příkladem může být gen SHOX (viz. dále) a jeho homologní gen SHOXY (Yp11.2) (Chu C.E., Connor J.M., Donaldson M.D.C., *et al.*, 2005).

2. Geny lokalizované mimo pseudoautozomální úseky chromozomu X, které ovšem nemají své homologní kopie na chromozomu Y. Mezi tyto geny patří například gen pro steroidní sulfatázu SSDD (Steroid Sulfatase Deficiency Disease; Xp22.32) a jeho mutace způsobuje X-vázanou formu kongenitální ichtyózy.

3. Geny nepodléhající X inaktivaci, umístěné také mimo pseudoautozomální oblast na krátkých i dlouhých raménkách chromozomu X, jejichž stejné kopie se nacházejí na chromozomu Y. Například lymfogenní gen má Yp homologii gen v oblasti PABY a DYS255 (Ogata T., Matsuo N., Muroya K., 2001).

2.4 Klinické projevy a jejich příčiny

Jako komplexní syndrom má i Turnerův syndrom celou řadu klinických projevů. Vzhledem k tomu, že u všech těchto projevů není patogeneze zcela známá, jsou následující odstavce soustředěny na ty projevy, u nichž je patogeneze objasněna. Rozsáhlejší přehled klinických příznaků je zobrazen v přílohách (Tabulka: č. 13).

2.4.1 Poruchy růstu a skeletu

Nejčastějším projevem Turnerova syndromu je zřejmě porucha růstu. Nejedná se ovšem o pouhý nízký vzrůst. Vyskytují se i různé skeletální abnormality (např. cubiti valgi) a osteoporóza. Jedná se o komplexní poruchu, jejíž etiologie stále není zcela objasněna. Při diagnostice nemůže být vynechána úloha ani jednoho genu.

Jde již o dříve zmíněný gen SHOX (Short Stature Homeobox; Xp22.32, také známý jako PHOG (Pseudoautosomal Homeobox Containing Osteogenic Gene). Homeoboxový gen lokalizovaný v PAR 1 regionu se uplatňuje během ontogenetického vývoje lidského jedince. Díky alternativnímu sestřihu tvoří gen 2 typy zralé mRNA o délce 1870 nukleotidů (SHOXa – exprese v kosterním svalu, placentě, pankreatu, srdci a ve fibroblastech kostní dřevě) a 1349 nukleotidů (SHOXb – exprese ve fetální ledvině, kosterním svalu a zejména dřevňových fibroblastech) (Day G., Batch J., McPhee I., 2005). Nejvýznamnější je úloha SHOX genu při

vývoji skeletu a to zejména středních a distálních úseků horních i dolních končetin, tedy především předloktí a bérců. Díky absenci jedné kopie SHOX genu je vývoj skeletu u pacientek s Turnerovým syndromem do jisté míry narušen. Nelze na něj však svádět celou patogenezi poruch růstu a skeletu. Podobný (velmi variabilní) fenotypový projev však můžeme pozorovat i u dalších chorob způsobených mutací SHOX (či SHOXY) genu. Léri-Weillův syndrom způsobuje jedna mutovaná (chybějící kopie) genu. Langerův syndrom je těžší forma, způsobená mutací v homozygotním stavu nebo delecí obou kopií genu.

Zvláštní formu pak tvoří idiopatická růstová retardace, která má obecně lehčí fenotypové projevy, a může být způsobena i mutacemi v genu pro růstový hormon (GH) nebo v genech pro jeho membránový (GHR) či volný receptor (GHSR) (Blum W. F., Machinis K., *et. al.*, 2006). Vyšší postavu můžeme naopak najít u jedinců se znásobením SHOX či SHOXY genů – například u syndromu Klinefelterova (47,XXY), syndromu 47,XXX („Superfemale“) či 47,XYY („Supermale“).

Kostní odchylky dále zahrnují projevy jako cubiti valgi, genua vara, Madelungova deformita předloktí, zkrácení metakarpálních kůstek, odlišný tvar horní a dolní čelisti, anomálie zvukových kůstek a zevního zvukovodu. Abnormální sluchové kůstky mohou způsobovat nedoslýchavost převodního typu. Díky neobvyklému tvaru zadní části báze lebni, která je kratší nebo delší, dochází ke zkrácení nebo rozšíření Eustachovy trubice, tak vznikají časté záněty jako např. otitis media.

Pacientky s Turnerovým syndromem mají víceméně normální hladinu růstového hormonu i růstového faktoru podobného inzulínu (IGF-I). Absence ovariální steroidogeneze (viz. dále) rovněž nemá na výslednou výšku nikterak velký vliv, ačkoliv dříve měla „výhradně estrogení“ teorie mnoho zastánců.

Poslední teorie se přiklání k názoru, že jde o poruchu parakrinní a autokrinní sekrece IGF-I na úrovni fibroblastů (zejména v růstových zónách dlouhých kostí), případně může být i přidružena rezistence na růstový hormon nebo IGF-I (Lebl J., Krásničanová H., 2006).

Dnes je již běžná léčba podáváním rekombinantního růstového hormonu, který dokáže konečnou výšku do určité míry pozitivně ovlivnit, obzvláště je-li podáván již od dětského věku. Účinek léčby rekombinantním růstovým hormonem není tak výrazný jak například u léčby deficitu růstového hormonu. Problém nemusí být ve snížené hladině růstového hormonu, ovšem tato léčba může znamenat alespoň psychologický přínos.

Na tomto místě je rovněž vhodné vzpomenout inzulinorezistenci, která se podle starších studií vyskytuje u značného (některé údaje hovoří až o polovině) množství pacientek s Turnerovým syndromem, často již v dětském věku (Zapletalová J., *et al.*, 2005). Toto však prokazatelně nesouvisí s terapií růstovým hormonem (růstový hormon zvyšuje plazmatickou hladinu glukózy), neboť nedávné studie dokázaly, že pacientky dokáží na zvýšenou hladinu glukózy dobře reagovat zvýšením produkce inzulínu, který pokrývá i případnou rezistenci. Dřívější studie, že u pacientek s Turnerovým syndromem se postupem času často vyvíjí diabetes mellitus II. typu, hypertenze nebo hyperlipidémie, byly některými novějšími studii zmírněny. Uvažuje se i o vlivech spojených se získanou obezitou (vliv psychiky, izolace, nedostatek pohybu). Jelikož růstový hormon dokáže zadržovat Na⁺ a vodu, může u pacientek s Turnerovým syndromem vést léčba pomocí růstového hormonu k recidivám lymfedémů (zejména díky nízkým schopnostem lymfatické drenáže – viz. dále).

2.4.2 Gonády

Dalším základním projevem Turnerova syndromu je gonadální dysgeneze se všemi somatosexuálními a endokrinologickými důsledky, které z toho plynou. Mezi nejtěžší formu patří fibrózní ovariální lišty bez zárodečných buněk. Tato forma se nachází u pacientek s karyotypem 45,X. Naopak u některých strukturních aberací a mozaikových forem může být postižení ovarií jen malé (pokud vůbec je) nebo nastupuje později.

Stále není zcela jasné, které geny jsou za vývojovou chybu zodpovědné. Existuje několik „kritických regionů“ (Xp11, Xq13-25, Xq26-28) a kandidátních genů: ZFX (Zinc Finger Protein X-linked; Xp22.2-21.3), DIAPH2 (Homolog of *Drosophila* Diaphanous 2; Xq22) a DFFRX (*Drosophila* Fat Facets Related X-linked; Xp11.4). Gen ZFX kóduje transkripční faktor typu “zinkového prstu”, gen DFFRX kóduje ubiquitin specifickou proteázu. Všechny 3 geny jsou nějakým způsobem spojeny s vývojem gonád. Některé z těchto genů byly objeveny na základě komparativně genomických metod a jejich funkce byla hlavně prozkoumána na modelovém organizmu (např. na *Drosophila melanogaster*), u genu ZFX se uvažuje i o úloze při poruchách růstu (Werner F., Machinis K., 2006).

V případě čisté monozomie chromozomu X a u buněčných linií mozaikové formy s karyotypem 45,X se projevuje další faktor, který gonadální dysgenezi ještě zhoršuje a urychluje. Vzniká nespecifický chromozomální efekt, neboť buňky s nepárovým pohlavním

chromozomem nemohou vstoupit do meiózy, což vede k atrézii oocytů (Gregor V., Šípek A., Mašátová D., 2003).

Gonadální dysgeneze vede k absenci ovariálních steroidních hormonů pod obrazem hypergonadotropního hypogonadismu. Estrogenová insuficience je doprovázena několikanásobně vyššími hladinami gonadotropních hormonů (především FSH), jejichž sekrece si ovšem zachovává bifázický průběh. Nedostatek estrogenů pak vede k nedostatečnému vývoji ženských pohlavních orgánů a prsních žláz. Pouze 11-22% pacientek má dostatek ovariálních hormonů k vyvolání menstruace (ovariální insuficience však má tendenci vyvíjet se postupně). Minimální množství pacientek (2-5%) má dlouhodobě pravidelný menstruační cyklus a jsou fertillní. Morfologický obraz ovaríí je závislý na karyotypu. Děloha zůstává dlouhou dobu málo vyvinutá (tzv. infantilní typ). Právě primární amenorrhoea a nedostatečný vývoj sekundárních pohlavních znaků jsou spolu s malým vzrůstem nejčastější důvody, které dovedou pacientky s Turnerovým syndromem k lékaři (Zapletalová J., *et al.*, 2005).

Dnes existuje možnost substituční hormonální terapie, která má za úkol zlepšit vývoj sekundárních pohlavních znaků a (v závislosti na závažnosti postižení ovaríí) pokusit se zajistit pravidelný menstruační cyklus, případně i ovulaci. Jisté zlepšení se dá očekávat i u osteoporózy, která však u pacientek s Turnerovým syndromem není primárním důsledkem nedostatku estrogenů. Je třeba zhodnotit biologický věk pacientky (ten bývá opožděn) před podáním substituční léčby estrogeny, které způsobí uzávěr epifyzárních štěrbin a znemožní další růst. Prvních 21-23 dnů cyklu se podává estrogen, dalších 10-14 dní se přidává i vestaven, následujících 5 dní se ponechává bez medikace a mělo by se dostavit menstruační krvácení (Pomahačová R., 2007).

Moderní medicína již umí částečně řešit i problém infertility u pacientek s Turnerovým syndromem. I u pacientek s úplnou gonadální dysgenézí je možné otěhotnění díky darovanému oocytu a metodě IVF. Implantuje se do dělohy, která musí být pod substituční hormonální stimulací. Těhotenství takovéto pacientky je třeba podpořit příslušnou hormonální léčbou a je třeba pohlížet na něj jako na vysoce rizikové (Mardešič T., 2007).

U pacientek s Turnerovým syndromem, které mají část nebo celý chromozom Y v karyotypu, existuje zvýšené riziko vzniku gonadoblastomu. Uplatňuje se zde především oblast chromozomu Y známá jako GBY (Gonadoblastoma Locus on the Y Chromosome), jejíž geny plní u muže fyziologické funkce, ovšem v dysgenetických gonádách mohou působit

onkogenně. Mezi nejvýznamnější geny z této skupiny patří gen TSPY (Testis Specific Protein Y-linked; Yp11.2). Předpokládá se, že hraje významnou roli při indukci meiózy u spermatogonií, ovšem jeho chybná či nepatřičná exprese může být onkogenní. Další „podezřelé“ geny jsou RBMY (RNA Binding Motif Protein Y Chromosome; Yq11), PRKY (Protein Kinase Y-linked; Yp11.2), PRY (PTBL Related Gene on Y; Y), a AMELY (Amelogenin Y Chromosomal; Yp11) (Zapletalová J. *et al.*, 2005).

2.4.3 Lymfatický systém

Abnormální vývoj lymfatického systému se podílí na řadě poruch a obtíží u Turnerova syndromu, ovšem zodpovědné geny na chromozomu X stále unikají přesné identifikaci. Tzv. „lymfogenní gen“ je lokalizován na krátkém raménku X chromozomu. Jeho absence je příčinou vývojové poruchy lymfatického systému, která se projeví poruchou lymfatické drenáže spojenou s dilatací lymfatických cév a městnáním lymfy. Vznikají rozsáhlé otoky – lymfedémy, které postihují horní část hrudníku, krk, nártý a další struktury. Tyto otoky deformují sousední měkké tkáně a jsou zodpovědné za řadu poruch měkkých tkání u Turnerova syndromu. Tímto způsobem vzniká štítovitý hrudník, nízká vlasová hranice, abnormality ušních boltců a nehtů. I postranní kožní řasy – pterygia (pterygium colli), typické pro Turnerův syndrom, vznikají na tomto podkladě. (Henry H., 2005).

Rovněž patogeneze typických kardiovaskulárních anomálií (koarktace aorty, arteriální aneuryzma, abnormality levého srdce) je spojována s poruchou lymfatické drenáže v prenatálním věku. Existují i domněnky, že i defekty močového ústrojí (např. podkovovitá ledvina) vznikají na podkladu blokování lymfatické drenáže.

2.4.4 Neurokognitivní poruchy

Často se uvádí, že Turnerův syndrom není spojen s poruchami intelektu. Ve skutečnosti to není tak docela pravda, ačkoliv k takovým poruchám jako u jiných chromosomálních abnormalit (Downův syndrom, Cri-du-chat syndrom) rozhodně nedochází. Chromozom X má zvláštní postavení, neboť je na něm lokalizována asi čtvrtina všech genů, které v případě mutace mohou vést k mentální retardaci.

Hodnoty IQ jsou u pacientek s Turnerovým syndromem téměř shodné jako v běžné populaci. Poněkud snížené však mohou být hodnoty neverbálního (percepčního) IQ (PIQ).

Pacientky s Turnerovým syndromem mohou mít problémy s krátkodobou pamětí, koncentrací a mohou být nerozhodné při plnění jednoduchých úloh (Skuse D. H., 2005).

V etiologii neurokognitivních a psychosociálních poruch u Turnerova syndromu se zřejmě uplatňuje fenomén genomického imprintingu. Ačkoliv nebyly prozatím identifikovány konkrétní geny, ukazuje se, že je fenotyp ovlivněn tím, jestli chromozom X (u karyotypu 45,X) je maternálního nebo paternálního původu. Zúčastněné geny zřejmě nemají homologní kopii na chromozomu Y, přesto nepodléhají lyonizaci a pravděpodobně hrají roli v sexuálním dimorfismu některých psychických projevů. Celý proces je stále zahalen tajemstvím, zkoumají se rovněž anatomické odchylky některých struktur mozku (amygdala, hipokampus). Výsledky dosavadních studií ukazují, že pacientky se zachovalým maternálním X chromozomem mají větší sklon k neurokognitivním poruchám a mají spíše problémy se sociální adaptací. Naopak pacientky s paternálním X chromozomem mají horší vizuální paměť (Skuse D. H., 2005).

Vzhledem k určité fyzické odlišnosti pacientek s Turnerovým syndromem je třeba očekávat psychologické komplikace i z těchto důvodů.

2.5 Molekulární markery

Pomocí DNA markerů lze jednoduše detekovat rozdíly v genetické informaci, kterou sledovaní jedinci nesou. Dříve byly jako molekulární markery používány především bílkoviny a jejich různé varianty, tzv. izoenzymy. V současné době se však využívá nejčastěji DNA markerů, které jsou oproti izoenzymům více variabilní a mohou charakterizovat celý genom. Na rozdíl od proteinových markerů nejsou tak významně ovlivněny prostředím a není tedy narušena jejich selektivní neutrálnost, což v některých případech nebývá splněno u izoenzymových markerů, na které může selekce působit buď přímo nebo skrze geny vystavenými selekci, s nimiž bývají často ve vazbě (Řepková J., Relichová E., 2001).

2.5.1 Využití DNA markerů

DNA markery jsou využívány např. pro DNA fingerprinting, testování otcovství, genetické mapování, populační genetiku, populační genekologii a při studiu evoluce na molekulární úrovni (fylogenetické analýzy, řešení taxonomických otázek).

DNA markery jsou aplikovatelné u všech organismů, kde je zvládnutá technika izolace DNA. Molekulární markery mají díky fyzikálním vlastnostem DNA několik výhod:

1) DNA můžeme získat nejenom ze živých, ale i z mrtvých tkání (v případě rostlin z herbářových položek). Molekula DNA je natolik stabilní, že může být zachována i po dobu několika miliónů let (Cano R.J., *et al.*, 1993).

2) Pro potřebnou analýzu stačí malé množství DNA. DNA markery tedy lze použít i u velmi raných ontogenetických stádií.

3) Použití DNA markerů je nezávislé na podmínkách prostředí, takže jsou selektivně neutrální. Toto nebývá v některých případech splněno, např. u isoenzymových markerů, na které může působit selekce přímo nebo které bývají často ve vazbě se selekci vystavenými geny (Possamai C.O., 2008). Odlišné úseky DNA jsou vystaveny různým selekčním tlakům. Většina sekvencí kódujících životně důležité proteiny podléhá silnému selekčnímu tlaku, a proto jsou nevariabilní a pro analýzy většinou nepoužitelné. Na druhé straně v nekódujících oblastech (introny a mezigenové regiony), u kterých lze předpokládat selekční neutralitu, a jejichž míru polymorfismu může ovlivňovat pouze genetický drift, se snadno hromadí mutace, a proto jsou nekódující sekvence variabilní.

2.5.2 Charakteristika DNA markerů

DNA markery jsou založeny na polymorfizmu, tedy variabilitě v sekvencích DNA. Jako DNA markery mohou být využity jen ty sekvence, které mají následující vlastnosti:

- vysoký polymorfizmus
- častý výskyt v genomu
- snadné a rychlé testování
- vysoká reprodukovatelnost
- snadná výměna údajů mezi laboratořemi

Není snadné najít marker, který by splňoval všechna kritéria. Podle cíle studia je potřeba zvolit nejvhodnější typ markerů. Z hlediska použité metody se DNA markery dělí na markery založené na hybridizaci DNA a markery založené na polymerázové řetězové reakci (PCR). V první skupině markerů se DNA profily vizualizují prostřednictvím hybridizace fragmentů DNA štěpené restriktivním enzymem se značenou sondou. DNA sonda je fragment DNA známého původu a sekvence. Ve druhé skupině jsou markery založené na *in vitro*

amplifikaci určitých sekvencí DNA nebo lokusů prostřednictvím specifických i nespecifických primerů (nukleotidových sekvencí) za účasti termostabilního enzymu DNA polymerázy. Amplifikované fragmenty se separují elektroforeticky a jsou detekovány po obarvení (např. ethidiumbromidem) nebo autoradiograficky.

2.5.3 STR marker

Tato práce je zaměřena na STR markery, proto ostatní typy markerů nebudou podrobně popsány.

STR markery jsou sekvence DNA složené z mnohokrát opakujících se motivů o délce 1 – 9 nukleotidů (např. $(GA)_n$, $(GATA)_n$) (Tautz D., 1989). Jsou součástí kódujících i nekódujících oblastí genomu. Obvykle se však tato polymorfni místa vyskytují v nekódujících oblastech. V kódujících by měnila čtecí rámec odpovídajícího bílkovinného produktu.

Je prokázáno, že v průběhu evoluce dochází k prodlužování mikrosatelitových sekvencí, což lze pozorovat už v průběhu několika stovek generací. Další mikrosatelity se ovšem mohou snadno vyštěpit rekombinací. Zdá se ale, že některé mikrosatelitové sekvence získaly časem určitou funkci, která přispívá k jejich udržení v genomu (Possamai C.O. *et al.*, 2008).

Podle složení lze mikrosatelity rozdělit na dokonalé, nedokonalé a složené. Dokonalý mikrosatelit je tvořen souvislým motivem, např. $(AG)_{24}$, nedokonalý mikrosatelit je tvořen několika různými motivy, např. $(AG)_{14}(AT)_{35}$ (Williams G.K., *et al.*, 1990). Oblasti přilehlé k mikrosatelitům jsou obvykle unikátní. Lze tedy navrhnout primery, které mohou daný mikrosatelitový marker vyhledávat. Díky malé velikosti a délkovému polymorfismu jednotlivých lokusů se screening provádí jednoduše amplifikací lokusů pomocí PCR z okrajových primerů a následnou elektroforézou. Je to metoda časově nenáročná a dají se tak hodnotit různé lokusy a velký počet vzorků najednou. Nevýhodou je náročná izolace mikrosatelitových lokusů z genomu, abychom získali unikátní okolní sekvence. Avšak ne všechny mikrosatelity jsou informativní a snadno identifikovatelné metodou PCR. Obvyklá délka fragmentů je 100 až 250 bp.

Tyto vysoce polymorfni markery se vyskytují ve všech eukaryotních genomech a v některých genomech prokaryot. Mikrosatelity se staly dobrým nástrojem pro konstrukci

genových map a mají také velké využití v oblasti populační genetiky a molekulární evoluce. Mikrosatelitové markery mají však i své nevýhody. Tento marker je potřeba nejprve získat, k tomu je potřeba příprava genomové knihovny, částečné sekvenování a syntéza primerů. Mikrosatelitový marker se nejčastěji získává prohledáváním známých sekvencí obsažených v různých databázích (např. EMBL, GenBank) nebo izolací z různých typů knihoven DNA.

Počty opakování daného STR lokusu se dědí podle Mendelovských pravidel. Protože je vztah mezi alelami kodominantní, získáme od každého jedince dva typy amplifikátů. To dokazuje jejich vysokou informativnost.

Nejčastějším způsobem vzniku nových alel je „sklouznutí“ DNA polymerázy během replikace repetitivního úseku. DNA polymeráza následně nasedne zpět na originální řetězec DNA, avšak v jiném místě mikrosatelitu a pokračuje v syntéze. Nově nasyntetizovaný mikrosatelit se od původního liší v počtu opakování repetice a za normálních okolností je opraven mismatch repair systémem. Pokud však nastane situace, že reparační systém nefunguje, hromadí se v genomu mikrosatelitové lokusy s odlišným počtem repetice. Mutované jsou především mononukleotidové a dinukleotidové repetice. Tento stav se nazývá mikrosatelitní nestabilita (Wheeler J.M., Bodmer W., Mortensen N.J., 2000).

Mikrosatelitní sekvence jsou v nekódující oblasti DNA, a proto jejich mutace neovlivní expresi genů. Repetitivní sekvence se ale mohou také vyskytovat v místech kódujících geny. Změna velikosti repetitivního úseku může způsobit posun čtecího rámce během translace a zapříčinit vznik nefunkčního proteinu nebo změnit jeho funkci (např. Huntingtonova choroba).

3 Cíl práce

- 1) Cílem mé bakalářské práce je rešerše problematiky Turnerova syndromu.
- 2) Rešerše molekulárních markerů se zaměřením na STR markery.
- 3) Cílem experimentální části je původ chromozomu X u pacientek s Turnerovým syndromem.

4 Materiál a metodika

4.1 Laboratorní vybavení

- *Termocykléry:* Life Expres, BIOER PTC-200, MJ RESEARCH
- *Pipety:* Labmate (2 μ l, 20 μ l, 200 μ l)
Pipetman Gilson (1 000 μ l)
EppendorfResearch (2,5 μ l)
- *Analytická váha:* BBC 32, BOECO Germany
- *Centrifugy:* Spectrafuge 7M,
Pagnet (max. 10 00 rpm)
Janetzki S70 (max. 6 000 rpm)
- *Třepačka:* Multi Bio RS-24, BIOSAN EAST PORT
- *Míchací souprava:* FISHER SCIENTIFIC
- *Elektroforetická komora:* BIO-RAD
- *Soustava skel pro gelovou elektroforézu:* BIO-RAD
- *Svorky ("clamp") pro elektroforetická skla:* BIO-RAD
- *Stojan pro upevnění skel:* BIO-RAD
- *Spacery:* 1,5mm; BIO-RAD
- *Hřebeny:* 14 jamek, BIO-RAD
- *Soustava pro nalévání gelů:* BIO-RAD
- *Mikrovlnná trouba:* Elektrolux
- *Chladnička:* Samsung
- *Mrazničky:* Elektrolux (-26°C), Zanussi (-18°C),
PMA 315 BL (-18°C), Liebher Comfort (-32°C)
- *Digitální fotoaparát:* LUMIX DMC-LX1, PANASONIC

4.2 Soubor vyšetřovaných pacientů

Na Turnerův syndrom bylo vyšetřeno 12 pacientek společně s jejich rodiči. Do vyšetřované skupiny patří pacienti z České republiky. Použitým materiálem pro vyšetření byla DNA izolovaná z periferní krve.

4.3 Izolace DNA Millerovou metodou

- 1) 10 ml periferní krve promíchat s 300 μ l 0,5 mol/l EDTA (pH = 8)
- 2) Krev přelit do kyvety (50 ml zkumavka), přidat 30 ml LB pufru a nechat lyzovat na ledu po dobu 45 min
- 3) Krev centrifugovat při 2000 rpm 30 min.
- 4) Slít supernatant do zkumavky
- 5) Přidat 10 ml LB pufru, sediment s LB pufrem důkladně protřepat a centrifugovat při 2000 rpm 10 min
- 6) Supernatant slít
- 7) K sedimentu přidat 3 ml NLB, promíchat a kvantitativně přenést do 10 ml zkumavky
- 8) Přidat 50 μ l proteinasy K (20 μ g/ μ l), 150 μ l 20 % SDS a důkladně vše protřepat
- 9) Inkubace přes noc v termostatu při 37°C
- 10) Přidat 1000 μ l NaCl (6 mol/l), protřepat po dobu 15 s
- 11) Centrifugovat při 4000 rpm 15 min
- 12) Supernatant slít do 10 ml zkumavky a centrifugovat při 4000 rpm 15 min
- 13) Provádět opakování dle bodu 12, až je supernatant čirý

- 14) Supernatant slít do 15 ml zkumavky, zalít 100% etanolem a DNA nechat volně vysrážet
- 15) DNA přenést do mikrozukavky (typu eppendorf) s 70 % etanolem, protřepat a centrifugovat při 8000 rpm 5 min
- 16) Etanol opatrně slít a nechat volně vyschnout
- 17) DNA rozpustit v 500 µl TE pufru

Složení roztoků:

Tabulka č.1: Složení LB: Lysisbuffer

Chemikálie	Množství
155 mM NH ₄ Cl	8,825 g
10 mM KHCO ₃	1,001 g
0,5 mM EDTA	1 ml

pH 7,3 -7,4 upravené přidáním cca 800 µl konc. NaOH

Doplnění destilovanou vodou do 1 l.

Tabulka č.2: Složení NLB: Nuclei lysis buffer

Chemikálie	Množství [g]
10 mM Tris-HCl	1,211
400 mM NaCl	23,376
2 mM EDTA	0,745

pH 7,3 -7,4

Doplnění destilovanou vodou do 1 l.

Tabulka č.3: Složení TE: tris-EDTA buffer

Chemikálie	Množství
Tris 7,5 M	2,5 ml
0,5 M EDTA	0,5 ml

Doplnění destilovanou vodou do 250 ml.

4.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je metoda, která slouží k amplifikaci definovaného úseku DNA *in vitro*. Reakční směs obsahuje templátovou DNA, 2 oligonukleotidové primery (komplementární ke 3'konci templátu, ohraničující daný segment), deoxyribonukleotidtrifosfáty (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), termostabilní DNA polymerázu, stabilizující reakční pufr obsahující hořčičnaté ionty (nezbytné pro funkci DNA polymerázy).

Reakce probíhá opakovaně v cyklech (30-40 cyklů) zahrnujících 3 kroky:

- 1) denaturaci ds DNA templátu (92-98 °C)
- 2) nasednutí primerů ("annealing") (45-65 °C)
- 3) syntézu komplementárního řetězce ve směru od 5' k 3' konci ukotvených primerů ("extension phase"). Poslední fáze probíhá při teplotě 68-75 °C.

PCR směs pro amplifikaci DNA pacientů obsahuje (pro jednoho pacienta):

Tabulka č.4: Směs DMSO +

Chemikálie	Množství [μl]
PCR vody	4,5
Combi ppp Master Mix (75 mmol/l Tris-HCl, pH 8,8; 20 mmol/l (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,01 % Tween 20, 2,5 mM MgCl ₂ , 200 μM dATP, 200 μM dCTP, 200 μM dGTP, 200 μM dTTP, 50 U/ml Taq Purple DNA polymerázy, monoklonální protilátka anti-Taq (19 nM), stabilizátory a aditiva).	7,5
DMSO	1,5
primer F (10 pmol/ μl)	0,25
primer R (10 pmol/ μl)	0,25
DNA (50 ng)	1

Tabulka č.5: Směs DMSO -

Chemikálie	Množství [μl]
PCR vody	6
Combi ppp Master Mix (75 mmol/l Tris-HCl, pH 8,8; 20 mmol/l (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,01 % Tween 20, 2,5 mM MgCl ₂ , 200 μM dATP, 200 μM dCTP, 200 μM dGTP, 200 μM dTTP, 50 U/ml Taq Purple DNA polymerázy, monoklonální protilátka anti-Taq (19 nM), stabilizátory a aditiva).	7,5
primer F (10 pmol/ μl)	0,25

primer R (10 pmol/ μ l)	0,25
DNA (50 ng)	1

Tabulka č.6: Podmínky amplifikace

Teplota (°C)	Čas (min)	Počet cyklů
95	5	10x
94	0:30	
55	1	
72	1:30	
94	0:30	25x
55	1	
72	1:30	
90	0:30	
10	neomezeně	

Tabulka č.7: Sekvence primerů pro PCR

Exon	Označení oligonukleotidového primeru	Oligonukleotidová sekvence
1	AR.PCR1.1	TCCAGAATCTGTTCCAGAGCG
1	AR.PCR1.2	GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCT
2	DXS101.AAT	AAATCACTCCATGGCACATGT

2	DXS101.ATT	ACTCTAAATCAGTCCAAATATC
3	DXS8377f	CACTTCATGGCTTACCACAG
3	DXS8377r	GACCTTTGGAAAGCTAGTGT
4	HSCP2f	TGATCAGAGGTATGCTGGAGA
4	HSCP2r	CCAGGGCAACAAGAGTGAA
7	STRX1f	TCAGAGGAAAAGAAGTAGACA
7	STRX1r	TTCTCTCCACTTTTCAGAGTCA
8	DKW O2f	GCTTTCCTCCTAAGACCCACTT
8	DKW Or	TCTGCCAATGGAGATAGTTTC

4.5 Elektroforéza na agarózovém gelu

Tento typ elektroforézy se používá ke zjištění účinnosti PCR a k orientačnímu zjištění délky DNA fragmentů. Agarózovým gelem prochází stejnosměrný elektrický proud, díky němuž se separují jednotlivé naamplifikované fragmenty DNA. Pro vizualizaci se používají barviva interkalující s DNA, jako je např. ethidium bromid (emituje purpurové světlo) nebo SYBR®-Green (září světlem zeleně).

Po PCR probíhala elektroforéza na 1,5% agarózovém gelu, který pro snadnou detekci ampliconů obsahuje ethidium bromid (EthBr). Gel obsahuje 3 µl EthBr (10 mg/ml) na 60 ml gelu. Gel se umístí do vaničky s TBE pufrem, který zajistí optimální průběh el. proudu. Combi PPP Master Mix umožňuje přímé nanášení PCR produktu do jamek bez přidání nanášecího barviva (Bromfenolová modř). Do jamek se nanáší přímo 5 µl PCR produktu. Vlastní separace probíhá při 80 V 30 minut. Získané výsledky se zdokumentují pomocí digitálního fotoaparátu.

Tabulka č.8: Složení TBE pufrou

Chemikálie	Množství
Tris-(hydroxymetyl)-aminometan	54 g
Kyselina boritá	27,5 g
0,5 M EDTA	1 ml
Destilovaná H ₂ O	5 l

4.6 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (PAG)

Při elektroforéze na polyakrylamidovém gelu se látky dělí nejen na základě elektrického náboje, ale i podle velikosti molekul. V místech zastavení pohybu frakce se vytvoří linie. Rozlišovací schopnost tohoto typu elektroforézy je mnohem vyšší než u předchozího typu nosiče.

Polyakrylamidovým gelem procházejí vzorky DNA o velikosti kolem 100 pb. Působí na ně stejnosměrný elektrický proud. Elektroforetická komůrka je tvořena párem skel oddělených spacery, které jsou stabilizovány pomocí svorek a upevněny do stojanu. Roztok může být denaturační nebo nativní.

Denaturační roztok

Komora je plněna denaturačním roztokem viz. Tab.9. Nalítí roztoku a přidání všech složek musí probíhat v krátkém časovém sledu, protože APS a TEMED spouští polymerizaci v průběhu 5min. Směs je vlita do prostoru mezi skla a opatřena hřebenem pro vytvoření jamek. Polymerizace roztoku trvá asi 60 minut. Poté jsou skla bez hřebenů vsazena do plastového jádra (BIO-RAD) s 0,5 TBE pufrem ve vaně. Než jsou jamky naplněny vzorky, je potřeba je propláchnout 0,5 TBE pufrem, aby se z nich odstranily zbytky denaturačních činidel. Následuje aplikace směsi 6 μ l STR barvy a 6 μ l PCR produktu do jamek. Před nanesením do jamek je směs 3 min. denaturována v termocycleru. V průběhu nanášení je směs chlazená v ledové lázni. Elektroforéza probíhá při 200 V, 5 Wh a 25 mA 4 hodiny. Gel je po uplynutí doby vyjmut, svorky, spacery, a jedno z páru skel jsou odstraněny.

Po rozebrání komory je gel barven roztokem EthBr (0,25 mg v 500 ml TBE pufru) 30 minut, poté je gel opláchnut destilovanou vodou. Pro vizualizaci se použije UV transiluminátor (260 nm). Dokumentace je pořizována digitálním fotoaparátem. Vzhledem k jednořetězcové formě DNA je vhodnější použití barvení dusičnanem stříbrným.

Nativní roztok

Komora je plněna nativním roztokem viz. Tab.10. Příprava roztoku a elektroforéza probíhá stejně jako u denaturačního roztoku. Pouze v nanášecí směsi se použije místo STR nanášecí barvičky Bromfenolová modř. Elektroforéza probíhá při 200 V, 5 Wh a 25 mA 5 hodin. Gel je po uplynutí doby vyjmut. Po rozebrání komory je gel barven roztokem EthBr (0,25 mg v 500 ml TBE pufru) 30 minut, poté je opláchnut destilovanou vodou. Pro vizualizaci se použije UV transiluminátor (260 nm). Dokumentace je pořizována digitálním fotoaparátem.

Tabulka č.9: Složení 8% denaturačního roztoku 45 ml

Chemikálie	Množství
urea	18,9 g
2x TBE	11,25 ml
40% AA-bis	9 ml
H ₂ O	5,85 ml
TEMED	37,5 µl
10% APS	375 µl

Tabulka č.10: Složení 8% nativního roztoku 45 ml

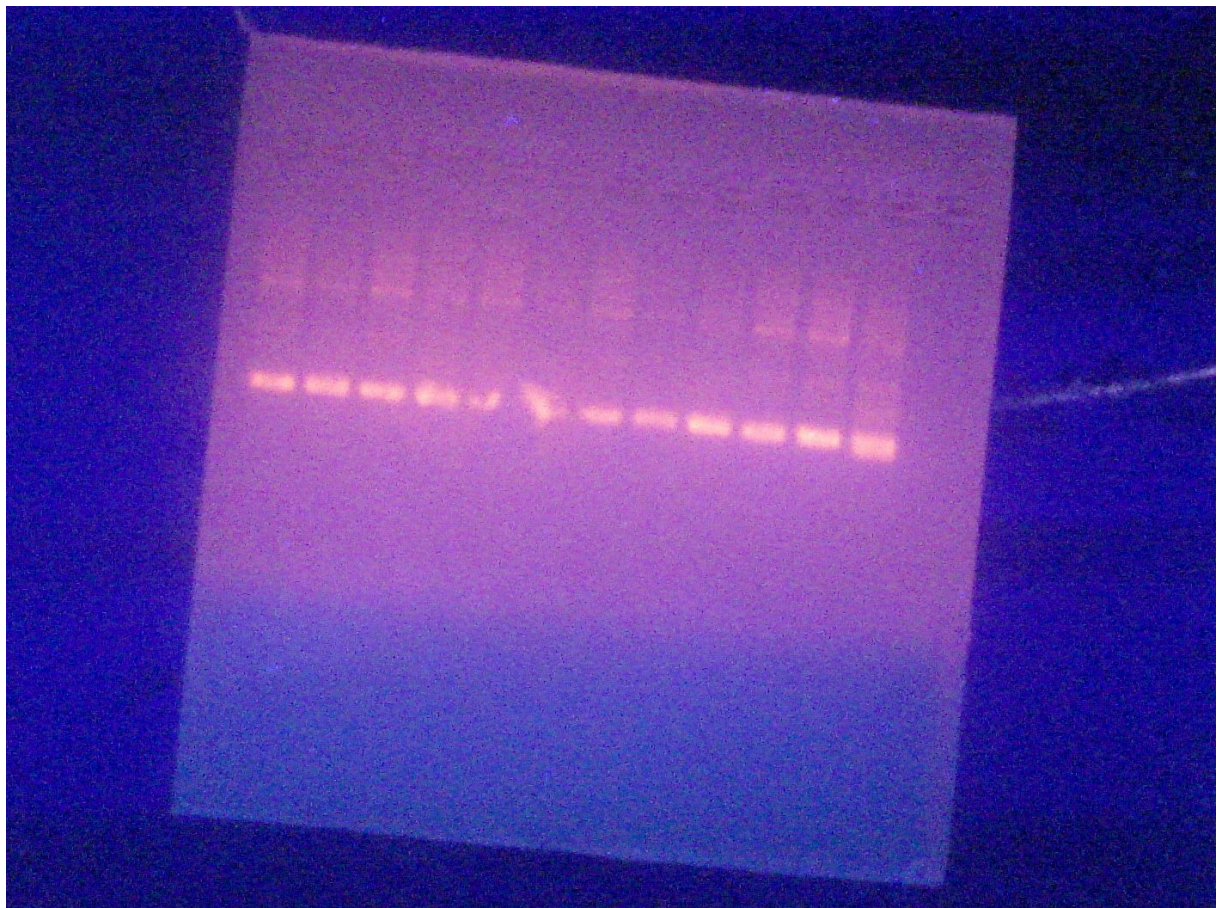
Chemikálie	Množství
glycerol	4,5 ml
2x TBE	11,25 ml
40% AA-bis	9 ml
H ₂ O	20,25 ml
TEMED	37,5 µl
10% APS	375 µl

5 Výsledky

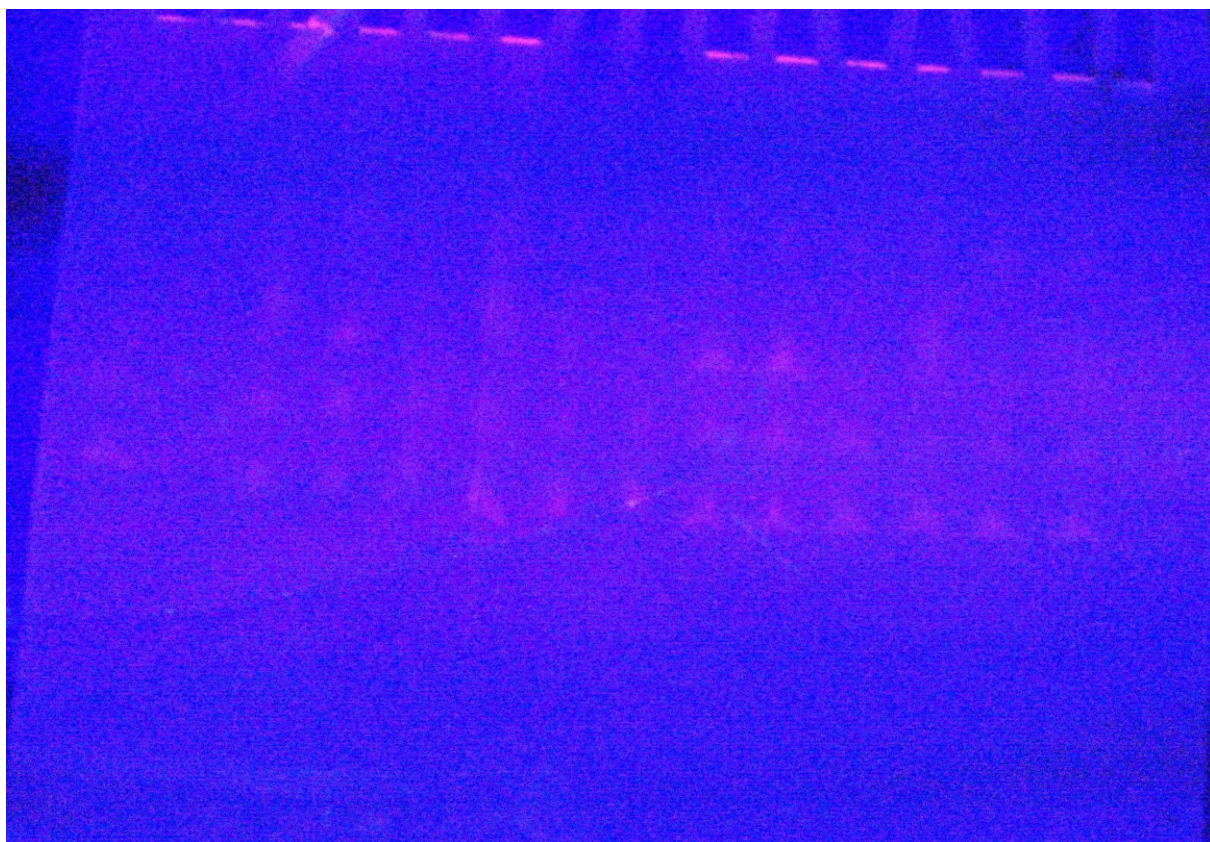
DNA vyizolovaná Millerovou metodou z periferní krve byla použita pro diagnostiku původu X chromozomu u pacientek s Turnerovým syndromem. Metodou PCR byl naamplifikován definovaný úsek DNA. Před samotným nanesením vzorků do 8% polyakrylamidového gelu byly vzorky otestovány v 1,5% agarózovém gelu, kvůli zjištění výskytu produktů (viz. obr.1).

PCR produkty v 8% denuračním i nativním gelu po obarvení roztokem EthBr byly špatně až nulově detekovatelné (viz. obr. 2).

Obrázek č.1: PCR produkty za použití primeru 2 v 1,5% agarózovém gelu (test gel)



Obrázek č.2: PCR produkty za použití primeru 2 v 8% denaturační polyakrylamidovém gelu



6 Diskuze

Nejčastější příčinou ztráty jednoho chromozomu X je nondisjunkce. K poruše separace homologních chromozomů může dojít během anafáze I. nebo II. meiotického dělení. Výsledný patologický karyotyp u plodů počatých z abnormálních gamet závisí na tom, zda k nondisjunkci došlo během mateřské nebo otcovské gametogeneze.

Nemá-li vajíčko žádný chromozom X (nullisomie) a je oplodněno spermií nesoucí chromozom X, bude mít zygota karyotyp 45,X. V dalším případě, kdy vajíčko nesoucí jeden chromozom X je oplodněno spermií, která nemá žádný z chromozomů, zygota bude monosomická (45,X) a vyvíjí se plod s Turnerovým syndromem.

Na podkladě molekulárně-genetických analýz využívajících polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLPs) nebo variability tandemových opakování (VTRs) bylo zjištěno, že přibližně ve dvou třetinách případů je jediný chromozom X mateřského původu (normální vajíčko bylo oplodněno nullisomickou spermií) (Mathur A., Stekol L., 2001).

Podle cytogenetických nálezů byla u stovky pacientek určena monozomie (45,X) u 22%, výskyt mozaiky byl vyšší - 68%, strukturální vady a karyotyp 46,XY byly zastoupeny 10% (Bing J., 2002). Z toho vyplývá, že Turnerův syndrom je nejčastěji způsoben vznikem chromozomální mozaiky.

Výsledky dosavadních studií naznačují, že se klinické projevy Turnerova syndromu liší podle toho, zda je chromozom X mateřského nebo otcovského původu. Dívky s chromozomem X mateřského původu mají vyšší výskyt vrozených srdečních vad, nápadnější kožní řasy na krku a výraznější poruchu abstraktního myšlení (Zapletalová J. *et al.*, 2005). Také je u nich vyšší výskyt neurokognitivních dysfunkcí a byly zaznamenány i problémy se sociální adaptací. (Mazzoco M., Singh B. M., *et al.*, 2008). Zda mateřský nebo otcovský genový imprinting opravdu hraje významnou roli, ukáží až další molekulárně-genetické studie.

Určení původu chromozomu X bylo součástí bakalářské práce. Vzhledem k použitým metodikám nejsou výsledky prokazatelné. V 8% denaturačním gelu, kde byla použita technika barvení pomocí roztoku EthBr byly výsledky velice špatně detekovatelné. To mohlo být způsobeno špatným navázáním EthBr na jednořetězcovou DNA v denaturovaném prostředí. Vzorky byly nanášeny i do 8% nativního gelu, ale ani zde nedošlo k dostatečné detekci.

7 Závěr

Turnerův syndrom je komplexní porucha způsobená monozomií 45,X nebo strukturálními aberacemi chromozomu X, případně mozaikovou formou obojího. Na vzniku projevů Turnerova syndromu se podílí absence genů, které za normálních podmínek nepodléhají lyonizaci (většina těchto genů má homologní kopii na chromozomu Y). Tímto způsobem vznikají základní projevy jako nízký vzrůst a anomálie skeletu, dysgeneze ovarií (a s tím spojené projevy hypergonadotropního hypogonadismu) či poruchy lymfatické drenáže a s tím spojené abnormality (pravděpodobně včetně vad kardiovaskulárního systému a močového ústrojí). U neurokognitivních poruch se zřejmě uplatňuje genomický imprinting. Ovariální dysgenezi může negativně ovlivňovat i absence druhého gonozomu, který brání zahájení meiózy.

Po terapii růstovým hormonem a substituční léčbě estrogeny lze dosáhnout uspokojivé výšky i vzhledu. Fertilitu nelze vždy obnovit, je zde však možnost těhotenství díky darovanému oocytu a metodě IVF.

Ačkoliv dnes není možné v prenatálním vývoji ani v průběhu života postižených dívek vyléčit Turnerův syndrom, díky moderním medicínským postupům, především z oblasti hormonální terapie, lze ženám trpícím touto chorobou nabídnout relativně normální, téměř plnohodnotný, život.

V experimentální části se nepodařilo uvést do praktického použití zvolené STR markery, proto nebylo možno vysledovat původ chromozomu v souboru našich pacientek. Po dohodě s vedoucím práce byla bakalářská práce zpracována pouze na teoretické úrovni.

8 Literatura

1. Bing J., Prenatal diagnosis of 45,X and 45,X mosaicism: the need for thorough cytogenetic and clinical evaluations, *Prenatal Diagnosis*, 2002, vol. 22, s. 105 –110.
2. Cano R.J., Poinar H.N., Pieniazek N.J., Amplification and sequencing of DNA, *Nature*, 1993, vol. 363, s.536-538.
3. Carel J.C., Ecosse E., Bastie-Sigeac I., Cabrol S., Tauber M., Leger J., *etal.*, Coste Quality of Life Determinants in Young Women with Turner's Syndrome after Growth Hormone Treatment, *Journal of Clinical Endokrinology & Metabolism*, 2005, vol. 90, no. 4, s.1992 - 1997.
4. Day G., Batch J., McPhee I., Turner syndrome and SHOX gene, *Journal of Bone and Joint Surgery - British Volume*, 2005, Vol 87, s. 57.
5. Donaldson M.D.C., Gault E.J., Tan K.W., Dunger D.B., Optimising management in Turner syndrome: from infancy to adult transfer, *Archives of Disease in Childhood*, 2006, vol. 91., s. 513-520.
6. Elsheikh M., Dunger D. B., Conway G. S., Wass J. A. H., Turner's Syndrome in Adulthood, *Endocrine Reviews*, 2002, vol. 23, s. 120-140.
7. Eugster E.A., Nathan Z.M., Monozygotic Twins With Turner Syndrome Develop Slipped Capital Femoral Epiphysis on Growth Hormone Therapy, *Pediatrics*, 2006, vol.118, s.1900 - 1903.
8. Gregor V., Šípek A., Mašátová D., Podíl prenatální diagnostiky na snižování výskytu vrozených vad v ČR, *Česká Gynekologie*, 2003, vol. 68, s. 395-400.
9. Henry H., A syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and cubitus valgus., *Endokrinology*, 2005, vol. 23, s.566-574.
10. Imaizumi, K., Kuroki, Y., *et al.*, Prevence of Turner syndrome in Japan, *Amsterdam, Excerpta Medica* 1993, s. 3 – 6.
11. Lebl J., Krásničanová H., *Růst dětí a jeho poruchy*, Praha, Galén, 1996. s. 160.
12. Massa G., Verlinde F., Schepper J., Thomas M., *et al.*, Trends in age at diagnosis of Turner syndrome, *Archives of Disease in Childhood*, 2005, vol. 90, s. 267–268.
13. Mathur A., Stekol L., Schatz D., *et al.*, The origin of the single X chromosome in Turner syndrome, *The American Journal of Human Genetics*, 2001, vol. 48., s.682-686.

14. Mazzoco M., Singh B.M., *et al.*, Visuospatial skills and their association with math performance in girls with fragile X or Turner syndrome, *Child Neuropsychology*, 2008, vol.12, s.87-110.
15. Nathan Z.M., DiMeglio L.A., Perkins R., Conjugated Oral versus Transdermal Estrogen Replacement in Girls with Turner Syndrome, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2009, Vol. 94, No. 6, s. 94 – 110.
16. Nussabau R.L., McInnes R.R., Willard H.F., *Genetics in medicine* (6 edition), W.B. Saunders Company, 2001, s. 173 – 175.
17. Ogata T., Muroya B., Matsuo N., *et al.*, Turner syndrome and Xp deletions: Clinical and molecular studies in 47 patients, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2001, vol. 86, no. 11, s. 5498-5508.
18. Polani P., *et al.*, Chromosomal sex in Turner's. Syndrome with coarctation of the aorta, 1954, s. 89 – 95.
19. Pomahačová R., Léčba růstovým hormonem v dětském věku, *Farmakoterapie*, 2007, vol. 5, s. 501–506.
20. Possamai C.O., *et al.*, STR markers for molecular diagnosis, *Genetics and Molecular Research*, 2008, vol.7, no. 4, s.125-127.
21. Řepková J., Relichová E., *Molekulární markey*, Brno, Atlantis, 2001, s. 64 – 69.
22. Skuse D.H., X-linked genes and mental functioning, *Human Molecular Genetics*, 2005, vol.14, no.1, s. R27-R32.
23. Sybert V.P., McCauley E., Turner's Syndrome, *The New England Journal of Medicine*, 2004, vol. 351, no.12, s. 1227-1238.
24. Šípek A., Gregor V., Horáček J., Krofta L., Mašátová D., *Vrozené vady v České republice*, *Česká Gynekologie*, 2005, vol. 70, s. 37-43.
25. Tautz D., Hypervariable simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers, *Nucleic Acid Research*, 1989, vol. 17, s.6463-6471.
26. Werner F., Machinis K., The Growth Response to Growth Hormone (GH) Treatment in Children with Isolated GH Deficiency Is Independent of the Presence of the Exon 3-Minus Isoform of the GH Receptor, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2006, vol. 91, s. 4171–4174.
27. Wheeler J.M., Bodmer W., Mortensen N.J., DNA mismatch repair genes and colorectal cancer, *Gut*, 2000, vol. 47, no. 1, s. 148–153.

28. Williams G.K., Kubelik A.R., Livak K.L., Rafalski J.A. a Tingey S.V., DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acid Research*, 1998, vol. 18, s. 6531-6535.

29. Zapletalová J., Lebl J., *et al.*, Turnerův syndrom (druhé vydání), Praha, Galén, 2005, s. 19 – 53.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

A	adenin
AA – bis	bis-akrylamid
APS	amonium persulfate – amonium persulfát
C	cytosin
dATP	deoxyadenosintriphosphate – deoxyadenosintrifosfát
dCTP	deoxycytosintriphosphate – deoxycytosintrifosfát
dGTP	deoxyguanosintriphosphate – deoxyguanosintrifosfát
DMSO	dimethylsulfoxide - dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid - deoxyribonukleotidová kyselina
dTTP	deoxytyrosintriphosphate – deoxytyrosintrifosfát
EDTA	etylen diamin tetraacetic acid – etylendiamin tetraoctová kyselina
EthBr	ethidium bromid
g	gram
G	guanin
GH	growth hormon – růstový hormon
GHR	growth hormon receptor – receptor růstového hormonu
GHSR	growth hormone secretagogue receptor – volný receptor růstového hormonu
H ₂ O	voda
HCl	chlorovodíková kyselina
IGF-I	insulin like growth factor 1 - inzulinu podobný růstový faktor 1
IVF	in vitro fertilisation – umělé oplodnění
KHCO ₃	hydrogenuhličitan draselný
l	litr
LB	lysis buffer – lyzační pufr

mA	miliAmper
mg	miligram
min	minuta/ty
ml	mililitr
mRNA	mediatorová RNA
NaCl	chlorid sodný
NaOH	hydroxid sodný
NH ₄ Cl	chlorid amonný
NLB	nuclei lysis buffer – pufr pro lyzaci jader
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
pb	páry bází
PCR	polymerase chain reaction – polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonucleic acid – ribonukleová kyselina
SDS	sodium dodecyl sulfate – dodecyl sulfát sodný
SHOX	Short Stature Homeobox
STR marker	short tandem repeats – krátké opakující se repetice
T	tyroxin
TE	tris-EDTA buffer, EDTA pufr
TEMED	N,N,N',N' – tetramethylendiamine - N,N,N',N' – tetramethylendiamin
V	volt
Wh	watt
μl	mikrolitr

10 Přílohy

Tabulka č.11: Podíl jednotlivých karyotypů u patientek s Turnerovým syndromem

Karyotyp	Frekvence v %
45,X	25 - 60
45,X/46,XX 45,X/47,XXX 45,X/46,XX/47,XXX	30 - 60
46,Xi(Xq) 46,X,del(Xp) 46,X,r(X)	10
45,X/46,Xi(Xq) 45,X/46,X,del(Xp) 45,X/46,X,r(X)	10
45,X/46,XY	0,5 - 3,0
Jiné	5

Zdroj: Zapletalová J., Lebl J., Šnajderová M.; Turnerův syndrom; Galén; Praha; 2003

Tabulka č.12: Podíl jednotlivých karyotypů u 196 patientek s Turnerovým syndromem z Adult Turner clinic v Middlesexu a Oxford Redcliffe hospitals, Spojené Království

Karyotyp	Počet případů	Frekvence v %
45,X	95	48
46,Xi,(Xq)	36	18
45,X/46,XX	21	11
46,Xr,(X)	19	10
45,X/46,XY	11	6
45,X/46,X,idi(Y)	2	1
46,X,del(Xp)	3	1,5
46,X,del(Xq)	6	3
Ostatní	3	1,5

Zdroj: Elsheikh M, Dunger D. B., Conway G. S., Wass J. A. H.; Turner's Syndrome in Adulthood; Endocrine Reviews; 2002; 23(1); pp. 120-140

Online: [<http://www.pubmed.com/> PubMed ID: 11844747]

Tabulka č.13: Klinické příznaky a jejich frekvence u dívek s Turnerovým syndromem

Příznak	Frekvence v %	
Defekt růstu	98 - 100	
Intrauterinní růstová retardace		
Růstové opoždění v dětství a dospívání		
Malá finální tělesná výška		
Gonády	95-98	
Gonadální dysgeneze		
Defekt krku	80	
Pterygia colli		
Krátký krk s nízkou vlasovou hranicí		
Defekt hrudníku	75	
Rozložitý s větší vzdáleností hypoplastických bradavek		
Defekt kůže, podkoží a kožní adnexa	60-79	
Lymfedémy		
Pigmentové névy		
Hypertrichóza		
Miskovité nehty		
Defekt uší	40-59	
Deformované boltce		
Chronický zánět středouší		
Nedoslýchavost		
Defekt očí	20-39	
Ptóza víček		
Epikantus		
Strabismus, myopie		
Defekt skeletu	40-59	
Cubiti valgi		
Zkrácené metakarpy a metatarzy (zvláště IV.)		
Madelungova deformita		
Osteoporóza		
Skolióza		
Hypoplastická dolní čelist		
Gotické patro		
Vadná zubní sklovina		
Defekt srdce a velkých cév		23-26
Koarktace aorty		
Bikuspidální aortální chlopeň		
Aneurysma aorty		
Defekt ledvin	40-59	
Podkovovitá ledvina		
Dystopie ledviny		
Vady ledvinných pánviček a ureterů		
Abnormality renálních cév		

Autoimunitní choroby	
Hashimotova thyreoiditida	35-60
Celiakie	8-10
Nespecifické střevní záněty, vitiligo	2-4
Porucha glukózové tolerance	38

Zdroj: Zapletalová J., Lebl J., Šnajderová M.; Turnerův syndrom; Galén; Praha; 2003