

A nemi kromoszóma rendellenességek kimutatása fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízissel



Nagy Bálint dr., Lázár Levente dr., Nagy Gyula Richard dr., Schönléber Julianna dr., Papp Csaba dr., Rigó János Jr. dr.

Semmelweis Egyetem, I.Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Budapest (Igazgató: Dr. Rigó János Jr. egyetemi tanár)

ÖSSZEFOGLALÁS

Célkitűzés: Az autoszómális és a nemi kromoszómák rendellenességei kb. 0,6%-ban fordulnak elő az élveszületettek között. A nemi kromoszómák eltérései enyhébb klinikai tünetekkel járnak, általában csak a nemi differenciálódásban okoznak zavarokat. A számbeli és szerkezeti kromoszóma rendellenességek kimutatására még napjainkban is a kariotipizálás az „arany standard” módszer, annak ellenére, hogy nagyon hosszadalmas az eljárás, akár 2–4 hét is szükséges a lelet kiadásáig. Ezért vezették be a gyorsabb molekuláris biológiai alapú módszereket, így a fluoreszcens in situ hibridizációt (FISH) és a kvantitatív fluoreszcens PCR-t (QF-PCR). Egy a kereskedelmi forgalomban lévő QF-PCR kittel szerzett tapasztalatainkat mutatjuk be.

Anyag és módszer: Előzőleg kariotipizált mintákon QF-PCR-t végeztünk. A klinikánkon az utóbbi 9 év alatt vizsgált 20.982 mintából 58 mutatott nemi kromoszóma rendellenességet. Közülük 21 minta 46, XO, 18 minta 46, XXY, 13 minta 47, XXX és 6 minta 47, XYY kariotípusú volt.

Eredmények: QF-PCR módszerrel sikerült az összes nemi kromoszóma rendellenességet mutató mintát sikeresen diagnosztizálni, azaz a 20.982-ből 58 mutatott nemi kromoszóma rendellenességet. Közülük 21 minta 46, XO, 18 minta 46, XXY, 13 minta 47, XXX és 6 minta 47, XYY volt.

Következtetések: A felhasznált kittel rövid idő alatt eredményt kapunk. A kimutatott nemi kromoszóma rendellenességek előfordulási gyakorisága megegyezik a nemzetközi irodalmi adatokkal.

KULCSSZAVAK

kvantitatív fluoreszcens PCR, nemi kromoszómák, számbeli rendellenesség, prenatális diagnosztika

Bálint Nagy, MD, Levente Lázár, MD, Richard Gyula Nagy, MD, Julianna Schönléber, MD, Csaba Papp, MD, János Rigó Jr., MD:

Detection of sex chromosome aneuploidies using quantitative fluorescent PCR

ABSTRACT

Objectives: Autosomal and sex chromosome aneuploidies are the most frequent chromosomal abnormalities at birth. Sex chromosome aneuploidies cause less severe syndromes. For the detection of chromosomal abnormalities, cytogenetic analysis of fetal cells is considered to be the “gold standard” method, karyograms show all numerical and structural abnormalities, but it takes 2–4 weeks to obtain the results. Molecular biological methods do not need the long culture time, e.g., FISH and quantitative fluorescent PCR (QF-PCR) are fast methods. We share our experience using a commercial kit available for the detection of chromosome aneuploidies.

Methods: We analyzed 20,982 amniotic fluid samples collected in the period between January 2006 and November 2014 in our department. A conventional cytogenetic analysis was performed on the samples. We checked the reliability of the QF-PCR on samples in which sex chromosomal aneuploidy was diagnosed.

Results: From the 20,982 amniotic fluid samples, we found 58 samples with sex chromosome aneuploidy. There were 21 samples showing 46, XO, 18 samples with 46, XXY, 13 samples with 47, XXX and 6 samples with 47, XYY karyotypes.

The applied QF-PCR method showed the same results as the conventional karyotyping. According to our opinion, it is suitable to detect all sex chromosome aneuploidies.

Conclusions: QF-PCR is a fast and reliable method for the detection of sex chromosome aneuploidies.

KEY WORDS

quantitative fluorescent-PCR, sex chromosomes, small tandem repeats, aneuploidies, prenatal diagnosis

A karyotipizálás az „arany standard” módszer a prenatális diagnosztikai centrumokban, alkalmas az összes számbeli kromoszóma rendellenesség és a szerkezeti átrendeződések kimutatására. A sejtenyésztes szükségessége miatt azonban az eljárás idő- és munkaigényes, így a gyorsabb molekuláris genetikai módszerek bevezetésére igény merült fel. A karyotipizálás leírása, 1956 óta, kisebb módosításoktól eltekintve az eredeti technika szerint történik. Napjainkban az automata kiértékelő rendszerek jelentenek nagy segítséget a kiértékelést végző humángenetikai szakasszisztenseknek. A fluoreszcens *in situ* hybridization (FISH) az 1970-es években, a fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis (QF-PCR) az 1990-es évek közepétől került alkalmazásra [1-4]. Ezek a módszerek azonban az alkalmazott próbák, illetve primerek szerint csak bizonyos elváltozásokra adnak információt, nem a teljes kromoszóma szerelvényre. Viszont a néhány éve bevezetett arrayCGH (összehasonlító génevizsgálat), nem igényli a sejtek tenyésztését és lerövidíti a vizsgálatok átfutási idejét, az összes kromoszómáról ad információt, és a kisebb deléciókat is kimutatja, egyelőre nem terjedt el még Magyarországon [5]. De nagyon kívánatos lenne a klinikai genetikai gyakorlatba való mielőbbi bevezetése mind a prenatális, mind a postnatalis, vagy egyéb diagnosztikába. Az új generációs szekvenciák alkalmazása az utóbbi néhány évben lehetővé tette a nem-invazív módon történő prenatális diagnosztikát és lehetővé teszi a leggyakoribb számbeli kromoszóma rendellenességek kimutatását. Gyors elterjedése várható, amint a meghatározások árai csökkennek [6-9].

A leggyakoribb autoszómális számbeli kromoszóma rendellenességek gyors diagnózisát lehetővé tevő fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis eljárást már 1997 óta alkalmazzuk a klinika Genetikai Laboratóriumában [10,11]. Az utóbbi időben kerültek forgalomba olyan tesztek, amelyekkel az összes nemi kromoszóma számbeli rendellenesség is kimutatható. Ezek előfordulása viszonylag gyakori érinthetik az X (triple X, XXX; Klinefelter szindróma, XXY), vagy az Y kromoszómát (XYY) (1/1000 azonos nemű születés). Összehasonlítva a leggyakoribb számbeli kromoszóma rendellenességekkel, a Down, a Patau és az Edwards szindrómákkal az extra nemi kromoszóma hatása enyhe, sok esetben nem is kerül diagnosztizálásra.

Kimutatásukra az utóbbi időszakban kifejlesztett speciális QF-PCR markerekkel gyors lehetőség nyílik.

Közleményünkben a nemi kromoszómák számbeli rendellenességeinek kimutatására is alkalmas teszttel szerzett tapasztalatainkról számolunk be.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Az elmúlt 9 évben (2006-2014 novembere) a Semmelweis Egyetem I.Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján 20.982 db magzatvízminta került feldolgozásra. A nemi kromoszómák számbeli rendellenességét mutató magzatvízmintákat, valamint egészséges mintákat választottunk ki a tanulmányunkra (58 minta, valamint 60 kontroll minta, számbeli kromoszóma rendellenességet nem mutató, 30 db-30 db 46,XX és 46,XY).

Citogenetikai vizsgálat

A citogenetikai analízist *in situ* tenyésztési eljárást követően Lucia (Prága, Csehország) automata kiértékelő rendszer segítségével végeztük el [12,13].

DNS izolálás

A DNS-t az amniocentesis során nyert mintákból szilika adszorpciós módszerrel izoláltuk ki High Pure PCR Template Preparation kit segítségével (Roche, Penzberg, Németország).

Kvantitatív fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis (QF-PCR)

QF-PCR-t végeztünk a Chromoquant QF-PCR STAr kitjével a gyártó útmutatása szerint (CyberGene AB, Stockholm, Svédország). Ezzel lehetséges a három leggyakoribb számbeli autoszómális aneuploidiák mellett (21-es, 18-as és 13-as kromoszóma triszómiái), a nemi kromoszómák számbeli eltéréseinek a kimutatása is. A PCR során úgynevezett small tandem repeats (STR) szekvenciák kerülnek felhasználásra, az X kromoszómára 4 db, az Y kromoszómára 3 db, a 21-es kromoszómára 6 db, a 18-as kromoszómára 5 db és a 13-as kromoszómára 5 db STR markert tartalmaz a kit. Ezekon kívül lehetséges extra STR markerek felhasználása is az egyes kromoszómákra szükség esetén. A PCR-t Applied Biosystems 9800 (Perkin Elmer,

USA) thermál cycler készüléken az előírt paraméterekkel végeztük el [14].

DNS fragmens analízis

A PCR során keletkezett fragmentumokat Applied Biosystems Genetic Analyzer 3130 (ABI, USA) készüléken kapilláris elektroforézissel választottuk el. Egy mikroliter PCR terméket adtunk 19 mikroliter formamidhoz, amely tartalmazott 0,25 mikroliter molekulásúly standardot. Molekulásúly markerként az ABI LIZ 500 (ABI, USA) standardot használtuk. A fragmentumokat a kiértékelő program segítségével azonosítottuk be, a normál euploid magzatok esetében az elektroforetogramon a csúcsok arányai $> 0,8 < 1,4$, míg a triploid esetekben $> 1,8$; vagy $< 0,65$ között váltakoznak.

EREDMÉNYEK

Az elmúlt 9 év során 20.982 magzati mintát analizáltunk ki, ezek közül autoszómális számbeli kromoszóma rendellenességet mutatott 363 eset, a nemi kromoszómák számbeli rendellenességét mutatta 58. Közülük 21 minta 46, XO, 18 minta 46, XXY, 13 minta 47, XXX és 6 minta 47, XYY kariotípusú volt. Az utóbbiakból a QF-PCR alkalmazhatóságát és megbízhatóságát vizsgáltuk meg. Az eredmények megegyeztek a kariotipizálás során kapott adatokkal, a normál és az eltérést mutató magzati minták esetén is.

Az 1. ábrán a 45,XO kariotípusú magzatra jellemző elektroforetogram figyelhető meg. Az X kromoszóma

markerei 1-1 csúccsal jelentkeznek, a TAF9B marker viszont 2:1 aránnyal mutatkozik.

A 2. ábra a 47,XXY kariotípusú magzat elektroforetogramját mutatja. Az X kromoszómára alkalmazott markerek az X kromoszóma két példányban való meglétét jelzik.

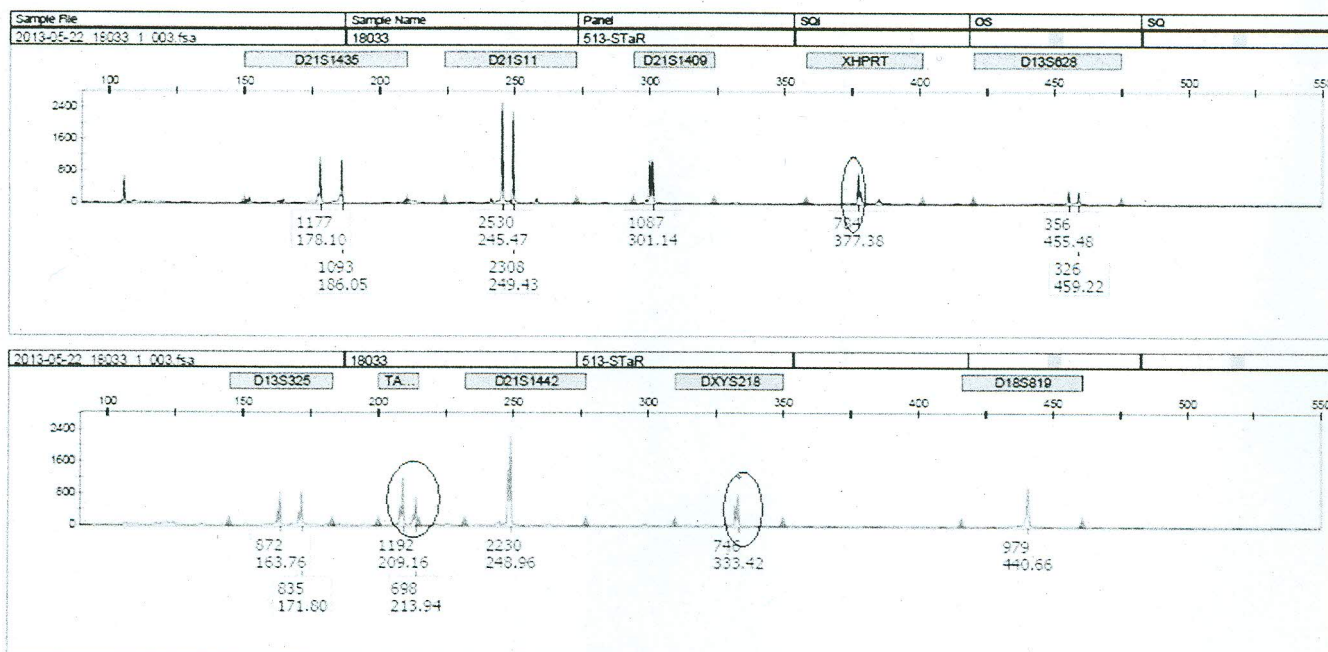
A 3. ábra a 47,XYY karyogrammal (kettős Y szindróma) rendelkező magzati minta elektroforetogramját mutatja. Az Amel génre specifikus marker 1:2 aránnyal jelzi, hogy az Y kromoszóma két példányban van jelen.

A 4. ábra a 47,XXX kariotípusú magzatra jellemző elektroforetogramot mutatja, az X kromoszóma STR markerei 2:1, vagy 1:1:1 arányokkal mutatkoznak.

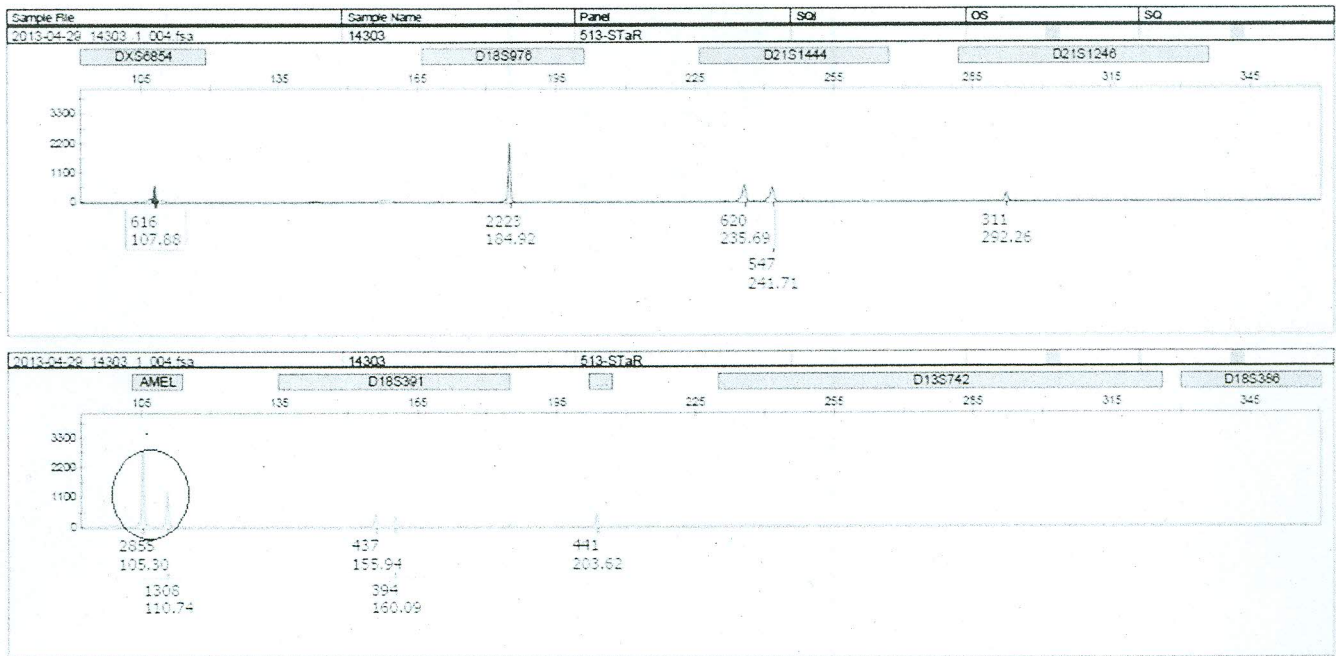
A QF-PCR módszerrel minden esetben igazolni tudtuk a kariotipizálással megállapított nemi kromoszóma rendellenességeket. A nemzetközi adatokhoz hasonló az egyes rendellenességek előfordulási gyakoriság a (45,XO-nak 0.001; a 47,XXY-nak 0.0008; a 47,XXX-nak 0.0004 és a 47,XYY-nak 0.00002).

MEGBESZÉLÉS

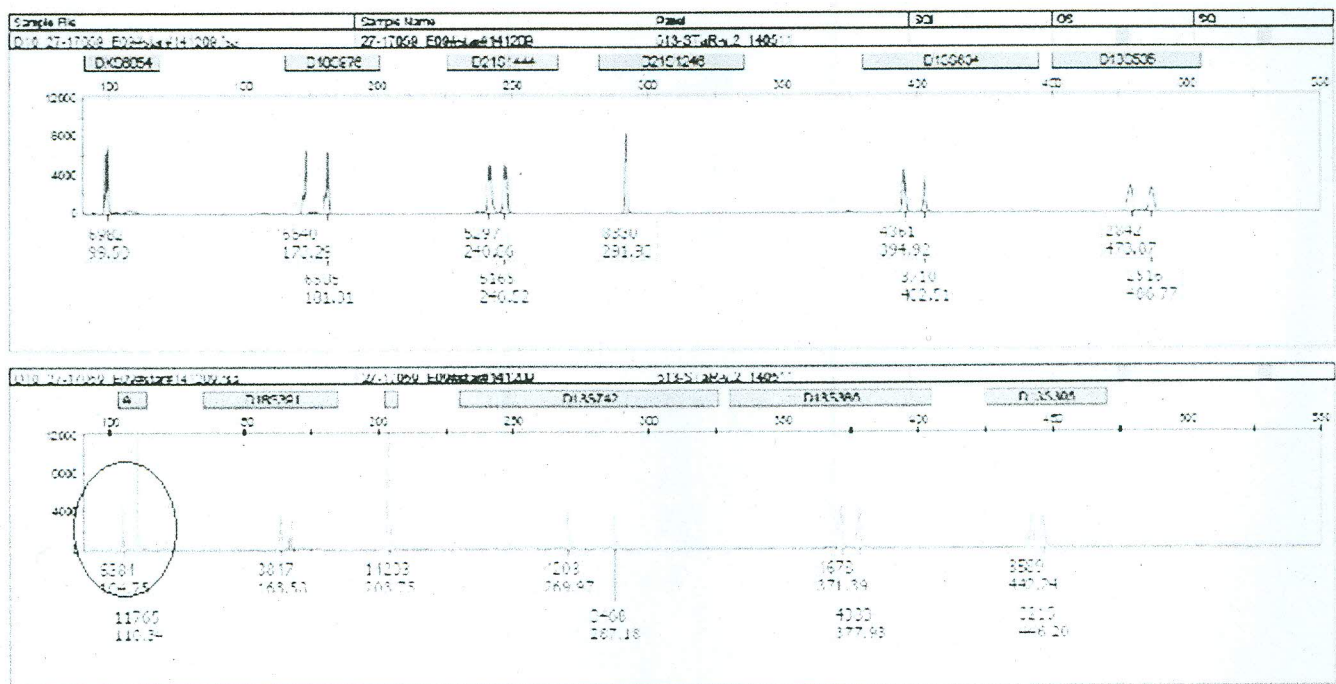
Az újszülötteknél megfigyelhető leggyakoribb kromoszóma rendellenességek a 21-es, a 18-as és a 13-as, valamint a nemi kromoszómákat érintik [16-17]. Ezek kimutatására a legerterjedtebb és legmegbízhatóbb módszer a magzatvíz-sejtek citogenetikai vizsgálata [18], a karyogram megmutatja az összes számbeli és szerkezeti eltérést. Viszont a sejtenyésztés idő-, és munkaigényes eljárás, így az érdeklődés



1. ábra A 45,XO kariotípusú magzatra jellemző elektroforetogram. Az AMEL, DXS6854, DX6803, X22, XHPRT, DXYS218 markerek egy-egy fragmentummal, az SRY szignál nélkül, a TAF9B marker 2:1 aránnyal jelentkeznek, a GT10_STS47 marker szignálja hiányzik.



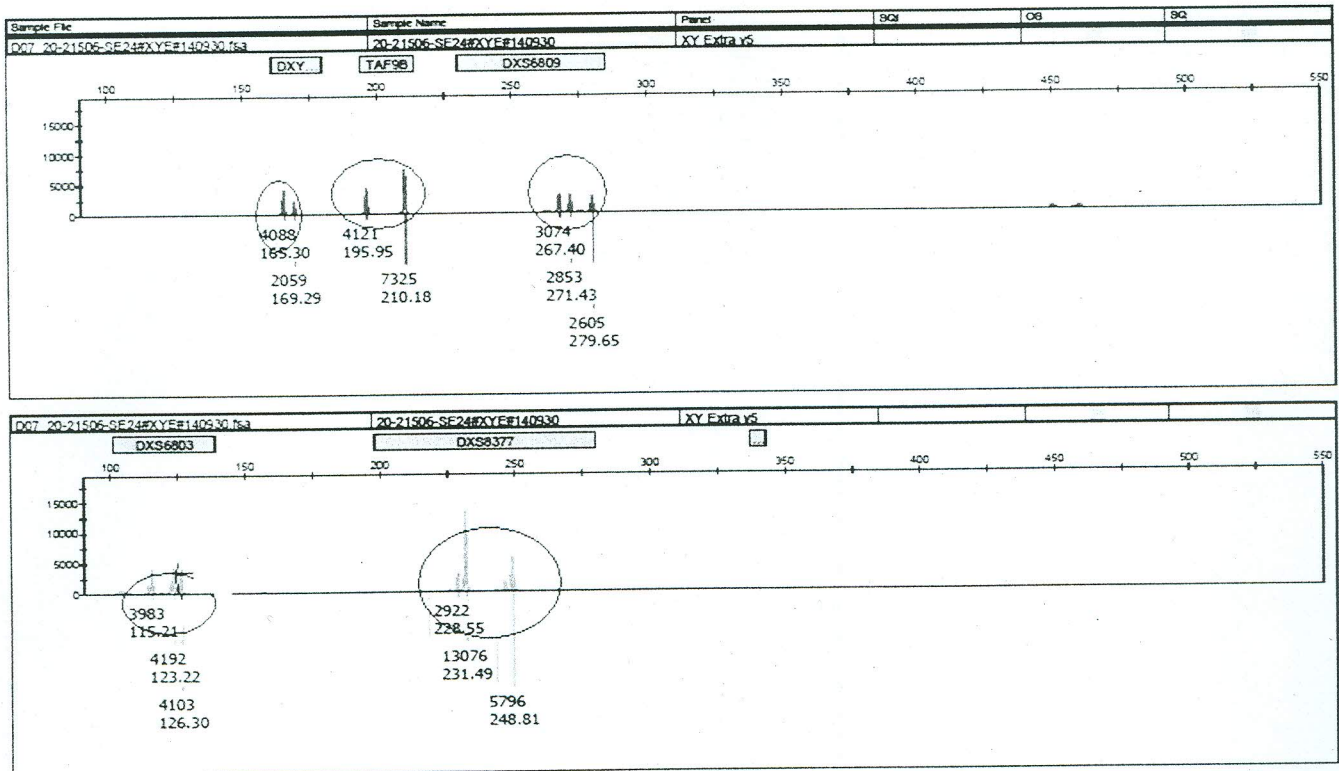
2. ábra A 47,XXY kariótípusú magzat elektroforetogramja. Az X kromoszóma specifikus markerek eltérő (2:1) arányokkal mutatják az extra X kromoszóma jelenlétét.



3. ábra A 47,YYY kariogrammal (kettős Y szindróma) rendelkező magzat elektroforetogramja. Az Y kromoszómára alkalmazott marker dupla mennyiségben mutatkozik (Amel gén)

a molekuláris genetikai módszerek felé irányult, ezek lehetővé teszik a gyorsabb és egyszerűbb kimutatást. A FISH és a QF-PCR alkalmasak a leggyakoribb számbeli kromoszóma rendellenességek egy napon belüli kimutatására. Irodalmi adatok és saját megfigyeléseink alapján a QF-PCR megbízhatóan alkalmas a gyakori magzati aneuploidiák kimutatására chorionbolyó-, és magzatvízmintákból [19-26].

A Semmelweis Egyetemen a világon negyedikként kezdtük el alkalmazni a QF-PCR módszert [10,14]. Az általunk alkalmazott multiplex primer rendszer a leggyakoribb autoszómális számbeli kromoszóma rendellenességek, és az egyes nemi kromoszóma számbeli rendellenességek kimutatására alkalmas, de az utóbbiak közül nem mindre. Például a Turner szindróma kimutatására nem volt alkal-



4. ábra A 47,XXX kariogrammal rendelkező magzat elektroforetogramja. Az X kromoszómára alkalmazott STR markerek 2:1, vagy 1:1:1 arányokkal jelentkeznek.

mas. Egy a kereskedelmi forgalomban lévő és CE/IVD jelzéssel ellátott kit alkalmazhatóságát próbáltuk ki, amely minden kromoszóma számbeli eltérés megbízható diagnosztizálására alkalmas.

Az elmúlt 9 év során nyert 20.982 magzatvíz mintából 363 autoszómális és 58 nemi kromoszóma számbeli rendellenességet mutattunk ki. A nemi kromoszóma rendellenességet mutató, valamint egészséges magzatok mintáit is lefuttattuk az egyik kereskedelmi forgalomban lévő QF-PCR-ra kifejlesztett kittal. Megállapítottuk, hogy a kit alkalmas a nemi kromoszómák számbeli rendellenességeinek megbízható kimutatására.

A QF-PCR vizsgálat előnyei a kariotipizálással szembe, hogy gyors eredményt ad, csökkenti a várandós szorongását és pszichés terhelését, előrehaladott terhesség esetén is elvégezhető, mivel a kariotipizálással már túllépnek a terhességmegszakítás törvényileg engedélyezett határát. Továbbá nem igényel a vizsgálat élő sejteket, fertőzött magzatvíz, lefagyasztott minták, post-mortem minták fetopathológiai feldolgozása is lehetséges, kis mennyiségű mintát igényel.

A klinikailag jelentős kromoszóma rendellenességek 99%-át a 21-es, a 18-as és a 13-as és a nemi kromoszómák aneuploidái okozzák. A nemi kromoszómák számbeli rendellenességeinek az előfordulásával is számolni kell a prénatalis diagnosztika során, tehát olyan gyors QF-PCR kimutatási rendszerek bevezetése szükséges, amelyek képesek ennek a jelzésére is. Az általunk vizsgált kit alkalmas

a nemi kromoszómák számbeli rendellenességeinek a kimutatására is. Ezek előfordulási gyakorisága megegyezik hazánkban a külföldi intézetekből közölt adatokkal [27-29].

Érdekltségi nyilatkozat:

A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Casperson T, Zech L, Johansson C. Differential banding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res* 1970; 60: 315-319.
- [2] van Dekken H, Pizzolo JG, Reuter VE, Melamed MR. Cytogenetic analysis of human solid tumors by in situ hybridization with a set of 12 chromosome specific DNA probes. *Cytogenet Cell Genet* 1990; 54: 103-107.
- [3] Klinger K, Landes G, Shook D, et al. Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Am J Hum Genet* 1992; 51: 55-65.
- [4] Mansfield ES. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphism. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 43-50.
- [5] Shinawi M, Cheung SW. The array CGH and its clinical applications. *Drug Discovery Today* 2008; 13: 760-770.

- [6] Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM, et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genet Med.* 2012; 14: 296-305.
- [7] Mazloom AR, Džakula Ž, Oeth P, et al. Noninvasive prenatal detection of sex chromosomal aneuploidies by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2013; 33: 591-597.
- [8] Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, et al. MatEternal BLOOD IS Source to Accurately diagnose fetal aneuploidy (MELISSA): Study Group. Genome wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol.* 2012; 119: 890-901.
- [9] Gil MM, Akolekar R, Quezada MS, et al. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: meta-analysis. *Fetal Diagn Ther.* 2014; 35: 156-173.
- [10] Tóth T, Findlay I, Papp C, et al. Prenatal detection of trisomy 21 and 18 from amniotic fluid by quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *J Med Genet* 1998; 35: 126-129.
- [11] Nagy B, Bán Z, Tóth-Pál E, et al. Apolipoprotein E allele distribution in trisomy 13, 18, and 21 conceptuses in a Hungarian population. *Am J Clin Pathol.* 2000; 113: 535-538.
- [12] Chang HC, Jones OW, Masui H. Human amniotic fluid cell grown in a hormone supplemented medium. Suitability for prenatal diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA,* 1982; 79: 4795-4799.
- [13] Wolstolme J, Crocker M, Jonasson J. A study of chromosomal aberrations in amniotic fluid cell cultures. *Prenat Diagn* 1988; 8: 339-353.
- [14] Nagy B, Bán Z, Lázár L, et al. Rapid determination of trisomy 21 from amniotic fluid cells using single-nucleotide polymorphic loci. *Prenat Diagn.* 2005; 25: 1138-1141.
- [15] Egan JF, Benn PA, Zelop CM, et al. Down syndrome births in the United States from 1989 to 2001. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 1044-1048.
- [16] Evans MI, Henry GP, Miller WA, et al. International, collaborative assessment of 146,000 prenatal karyotypes: expected limitations if only chromosome-specific probes and fluorescent in-situ hybridization are used. *Hum Reprod.* 1999; 14: 1213-1216
- [17] Kalter H. Five-decade international trends in the relation of perinatal mortality and congenital malformations: stillbirth and neonatal death compared. *Int J Epidemiol* 1991; 20: 173-179.
- [18] Eiben B, Trawicki W, Hammans W, et al. A prospective comparative study on fluorescence in situ hybridization (FISH) of uncultured amniocytes and standard karyotype analysis. *Prenat Diagn.* 1998; 18: 901-906.
- [19] Adinolfi M, Sherlock J, Pertl B. Rapid detection of selected aneuploidies by quantitative fluorescent PCR. *Bioessays* 1995; 17: 661-664.
- [20] Cirigliano V, Ejarque M, Fuster C, Adinolfi M. X chromosome dosage by quantitative fluorescent PCR and rapid prenatal diagnosis of sex chromosome aneuploidies. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 1042-1045.
- [21] Mann K, Fox SP, Abbs SJ, et al. Development and implementation of a new and rapid aneuploidy diagnostic service with in the UK National Health Service and implications for the future of prenatal diagnosis. *Lancet* 2001; 358: 1057-1061.
- [22] Mann K, Ogilvie MC. QF-PCR: application, overview and review of the literature. *Prenat Diagn* 2012; 32: 309-314.
- [23] Hills A, Donaghue C, Waters J, et al. QF-PCR as a stand-alone test for prenatal samples: the first 2 years' experience in the London region. *Prenat Diagn.* 2010; 30: 509-517.
- [24] Xie X, Liang Q. Establishment of a 10-plex quantitative fluorescent-PCR assay for rapid diagnosis of sex chromosome aneuploidies. *PLOS ONE,* 2014; 9:e106307
- [25] Nagy B, Bán Z, Tóth-Pál E, et al. Apolipoprotein E allele distribution in trisomy 13, 18 and 21 conceptuses. *Am J Clin Pathol* 2000; 113, 572-575.
- [26] QF-PCR for the diagnosis of aneuploidy. *ACC Best Practice Guidelines. Guidelines. Clinical Molecular Genetics Society,* 2012; v. 3.01
- [27] Boyd PA, Loane M, Garne E, et al. Sex chromosome trisomies in Europe: prevalence, prenatal detection and outcome of pregnancy. *Eur J Hum Genet* 2011; 19: 231-234.
- [28] Morris JK, Alberman E, Scott C, Jacobs P. Is the prevalence of Klinefelter syndrome increasing? *Eur J Hum Genet* 2008; 16: 163-170.
- [29] Abramsky L, Chapelle J. 47,XXY (Klinefelter syndrome) and 47,XYY: estimated rates and indication for postnatal diagnosis with implications for prenatal counseling. *Prenat Diagn* 1997; 17: 363-368.

Levelezési cím:

Dr. Nagy Bálint
Simmelweis Egyetem,
I.Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika
1088 Budapest Baross u. 27.
E-mail: nagy.balint@noi1.sote.hu