Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie

Bc. Anna Cinkajzlová

Molekulárně cytogenetické vyšetření chromozomových aberací v mozaice

Molecular cytogenetic analysis of mosaic chromosomal abnormalities

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Eduard Kočárek, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 6.5.2013

Podpis

Poděkování:

Tímto bych velmi ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Eduardu Kočárkovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, ochotu a pomoc při zpracování mé diplomové práce.

Rovněž bych chtěla poděkovat MUDr. Pavlu Tesnerovi za veškerou spolupráci, přátelský přístup a podnětné rozhovory. Upřímně děkuji Mgr. Janě Drábové za uvedení do problematiky metody array CGH, pomoc a ochotu. Děkuji RNDr. Drahuši Novotné za to, že mi byl umožněn přístup i do klinické části laboratoře a dovolena participace na analýzách. Tamějším pracovníkům děkuji za milé přijetí. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Ing. Ivaně Durdilové za vysvětlení statistického hodnocení.

Práce byla podpořena grantem TAČR číslo TA01010931.

Abstrakt

Diplomová práce se soustředí na numerické a strukturní aberace v mozaice. V teoretické části práce je probírána obecná problematika mozaicismu, jeho dopadu na fenotyp, mechanismy vzniku, související epigenetické modifikace a diagnostické možnosti. Praktická část se soustředí především na metodu fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a její aplikace při diagnostice mozaicismu. Touto metodou bylo provedeno vyšetření 29 pacientů s numerickými nebo strukturními abnormalitami autozomů i gonozomů v suspektní či prokázané mozaice. Na základě analýz byly stanoveny možné příčiny chyb stanovení a získána data pro statistické hodnocení. U tří pacientů bylo provedeno také vyšetření alternativou komparativní genomové hybridizace – technikou array CGH. Metoda FISH, i přestože stojí na náhodném výběru a na lidské zkušenosti, prokázala dostatečnou senzitivitu a specificitu rovněž v oblasti diagnostiky nízkofrekvenčního mozaicismu. Hlavní kritické faktory zodpovědné za možnou desinterpretaci dat vyvstávaly z vlastností biologického materiálu, nevhodného zacílení analýzy, nestability sond, jevu *bleed through* a absence mitóz při diagnostice strukturních aberací.

Klíčová slova:

mozaicismus, numerické aberace, strukturní aberace, Turnerův syndrom, Downův syndrom, marker chromozomy, diagnostika mozaicismu, FISH, array CGH

Abstract

The focus of this diploma thesis is on mosaic numerical and structural chromosomal aberrations. In its theoretical part, general problems of mosaicism, its phenotypic effect, mechanisms of origin, related epigenetic modifications, and diagnostic options are described. The methodical part of the thesis then primarily refers to fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and its application in the diagnostics of mosaicism. This method was used in the examination of 29 patients with numerical as well as structural abnormalities of autosomes or gonosomes with proven or suspected mosaicism. On the basis of this analysis, possible errors of measurement were determined and data for statistic evaluation were retrieved. For the examinations of three patients an alternative of the comparative genomic hybridization, the array CGH technique, was applied. The FISH method, although being based on random selection and human factor, proved sufficient sensitivity as well as specificity in the field of low-frequency mosaicism diagnostics. The main critical factors responsible for potential misinterpretation of the data arose from inherent characteristics of the biological material, incorrect targeting of the analysis, probe instability, bleed through effect and absence of mitosis during the structural aberrations analysis.

Key words:

mosaicism, numerical aberrations, structural aberrations, Turner syndrome, Down syndrome, marker chromosomes, diagnostics of mosaicism, FISH, array CGH

Obsah

1 Úvod 10

2 Přehled literatury 11

2.1 Mozaicismus 11

2.1.1 Mozaicismus, fenotyp a variabilní expresivita 12

2.2 Numerické aberace v mozaice 14

2.3 Mechanismy vzniku aneuploidií v mozaice 15

2.3.1 Meiotické aneuploidie, jejich příčiny, možné následky a oprava 15

2.3.2 Uniparentální dizomie jako možný následek *trisomy* a *monosomy rescue* 18

2.3.3 Mitotické poruchy, nondisjunkce a *anaphase lag* 18

2.3.4 Osud buněk s aneuploidií 20

2.4 Příklady aneuploidií v mozaice 21

2.4.1 Downův syndrom, *maternal age effect* a mozaicismus 21

2.4.2 Turnerův syndrom, jeho diagnostika, genetické podklady, léčba a mozaicismus 23

2.4.3 Klinefelterův syndrom, jeho diagnostika a mozaicismus 26

2.5 Strukturní chromozomové aberace a mozaicismus 27

2.6 Mechanismy vzniku strukturních aberací v mozaice 28

2.6.1 Chromozomální zlomy a jejich reparace 28

2.6.2 Nealelní homologní rekombinace 29

2.6.3 Nehomologní spojení konců 30

2.6.4 FoSTeS (*Fork stalling and template switching model*) 31

2.7 Příklady strukturních aberací v mozaice 32

2.7.1 Downův syndrom, mozaicismus a strukturní odchylky 32

2.7.2 Turnerův syndrom, strukturní aberace a mozaicismus 33

2.7.3 Malé nadpočetné marker chromozomy, jejich vznik a mozaicismus 34

2.8 Metodické možnosti stanovení mozaicismu 36

2.8.1 Základní cytogenetické vyšetření – G-pruhování 36

2.8.2 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) 36

2.8.3 Array CGH 37

2.8.4 Kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce (QF-PCR) 38

2.8.5 *Multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) 38

2.8.6 *BACs-on-Beads*^{TM} (BoBs^{TM}) 39

3 Cíle práce 40

4 Materiál a metody 41
4.1 Soubor pacientů 41
4.2 Metoda FISH 42
4.2.1 Sondy pro analýzu FISH 42
4.2.3 Materiál a pomůcky pro FISH 44
4.2.4 Pracovní postup metody FISH 45
4.3 Metoda array CGH 47
4.3.1 Reagencie, pomůcky a přístrojové vybavení pro array CGH 48
4.3.2 Pracovní postup metody array CGH 49
4.4 Statistické hodnocení výsledků FISH 54
4.4.1 Postup statistické analýzy 54
4.5 Postup zápisu výsledků podle ISCN 2009 59
4.5.1 Zápis výsledků metody FISH 59
4.5.2 Zápis výsledků metody array CGH 60
5 Výsledky 61
5.1 Výsledky metody FISH 61
5.2 Výsledky metody array CGH 68
5.3 Výsledky statistického hodnocení 68
5.4 Hodnocení kvality analýz 69
5.4.1 Hodnocení kvality materiálu použitého pro FISH 69
5.4.2 Hodnocení sond pro analýzu FISH 71
5.4.3 Nejvýznamnější faktory ovlivňující kvalitu výsledků FISH 76
5.4.4 Hodnocení kvality array CGH 81
5.4.5 Hodnocení proměnlivosti zastoupení buněčných linií při FISH 81
5.5 Kazuistiky vybraných pacientů 84
5.5.1 Kazuistika pacienta XVIII 84
5.5.2 Kazuistika pacienta IX 87
5.5.3 Kazuistika pacientky XIX 91
5.5.4 Kazuistika pacienta XXVII 92
5.5.5 Kazuistika pacienta XIV 94
5.5.6 Kazuistika pacientky VIII 95
5.5.7 Kazuistika pacientky XXIII 97
6 Diskuze 99
6.1 Mozaicismus a vybrané aspekty 99

6.1.1 Mechanismy vzniku mozaicismu.....99
6.1.2 Výskyt mozaicismu.....100
6.1.3 Mozaicismus a jeho vliv na fenotyp.....100
6.2 Metoda FISH a její omezení.....102
6.2.1 Časová náročnost, specificita a senzitivita.....102
6.2.2 Výpovědní hodnota metody FISH v diagnostice mozaicismu.....104
6.2.3 Automatizace postupu.....106
6.3 Korelace genotypu a fenotypu u vybraných pacientů.....108
6.3.1 Predikce fenotypu u pacientky VI.....109
6.3.2 Predikce fenotypu u pacienta IX.....109
6.3.3 Vyšetření pacienta XVIII.....110
6.3.4 Vyšetření pacienta XIV.....110
7 Souhrn.....112
8 Seznam použité literatury.....113

Seznam zkratek

AR – *androgen receptor* – androgenní receptor

BAC – *bacterial arteficial chromosome* – umělý bakteriální chromozom

BIR – *break-induced replication* – zlomem indukovaná replikace

BoBs™ – *BACs-on-Beads™*

CCD – *charge-coupled device*

CGH – *comparative genomic hybridization* – komparativní genomová hybridizace

Cy – *cyanine* – cyanin

DAPI – *4',6-diamidino-2-phenylindole* – 4',6-diamidino-2-fenylindol

DEAC – *diethylaminocoumarine* – dietylaminocoumarin

DLR – *derivative log ratio* – derivovaný poměr logaritmů

DNA – *deoxyribonucleic acid* – deoxyribonukleotidová kyselina

EDTA – *ethylenediaminetetraacetic acid* – etylendiaminotetraoctová kyselina

FISH – *fluorescence in situ hybridization* – fluorescenční *in situ* hybridizace

FITC – *fluorescein isothiocyanate* – fluorescein izothiokyanát

FoSTeS – *fork stalling and template switching*

HR – *homologous recombination* – homologní rekombinace

ISCN – *An international system for human cytogenetic nomenclature*

KAL – *Kallmann syndrome gene*

LCR – *low copy repeats* – repetice o nízkém počtu opakování

LDL – *low density lipoprotein* – lipoprotein o nízké hustotě

LSI – *locus specific identifiers* – lokus specifický identifikátor

MLPA – *multiplex ligation-dependent probe apmlification*

NAHR – *non-allelic homologous recombination* – nealelní homologní rekombinace

NF – *neurofibromin*

NHEJ – *non-homologous end-joining* – nehomologní spojování konců

QF-PCR – *quantitative fluorescent polymerase chain reaction* – kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce

RAI – *retinoic acid-induced gene* – gen indukovaný kyselinou retinovou

RNA – *ribonucleic acid* – ribonukleotidová kyselina

SBR – *signal to backround ratio* – poměr signálu k pozadí

SD – *standard deviation* – standardní odchylka

SG – *SpectrumGreen*

SHOX – *short stature homeobox*

SpO – *SpectrumOrange*

SSC – *saline sodium citrate* – solný roztok citrátu sodného

STR – *short tandem repeat* – krátké tandemové repetice

TOP2A – *topoisomerase 2 alfa* – topoizomeráza 2 alfa

TR – *texas red*

ÚBLG – Ústav lékařské biologie a genetiky 2. lékařské fakulty a fakultní nemocnice Motol

XIST – *X-inactive specific transcript* – X-inaktivační specifický transkript

1 Úvod

Strukturní a numerické odchylky chromozomů mají kauzální význam pro vznik mnoha definovaných syndromů, pro které je typický abnormální fenotyp s řadou charakteristických příznaků. U pacientů s mozaicismem tomu tak ale nemusí být. Alterace fenotypu u aberací v mozaice vyplývá z přítomnosti více buněčných linií, obvykle abnormální a fyziologické, jejichž poměr a zastoupení se může v jednotlivých tkáních měnit. Výsledkem je proto možná nepřítomnost symptomů, jejich různá míra či neobvyklý projev onemocnění. Správná detekce a přesná diagnostika mozaicismu není nezbytná pouze pro predikci fenotypu u prenatálně indikovaných vyšetření, ale má svůj význam i v postnatální medicíně, kde umožní nejen včasný záchyt komplikací způsobených příslušnými abnormalitami, ale vede také k zavedení adekvátní symptomatické léčby, popř. k získání vhodného biologického materiálu pro *in vitro* fertilizaci.

Z těchto důvodu se předkládaná práce věnuje několika oblastem. V literárním přehledu převažuje především snaha o obecnou definici mozaicismu, jeho dopadu na fenotyp a zasazení těchto poznatků do širších souvislostí. Podstatná část textu se věnuje procesům vedoucím k aberacím a ke vzniku vlastního mozaicismu. Závěrečná kapitola se pak spíše než o vyčerpávající přehled metodických možností stanovení mozaicismu pokouší na teoretickém podkladě definovat chyby a nedostatky technik, jež představují v současné době vrchol rutinní diagnostiky v této oblasti.

Cílem metodické části je určení limitů molekulárně cytogenetické diagnostiky vyplývající z mozaicismu na základě provedených analýz a načerpaných teoretických poznatků. Vlastní obsah experimentů se soustředí především na metodu FISH, u vybraných pacientů doplněnou o analýzu array CGH. Záměrem je zjištění výpovědní hodnoty techniky FISH, zhodnocení jejího možného omezení a stanovení reprodukovatelnosti měření při diagnostice mozaicismu. K tomuto účelu poslouží výsledky vyšetření souboru pacientů s různými numerickými i strukturními aberacemi v mozaice. Součástí práce je i zhodnocení kvality preparátů s ohledem na zvolený biologický materiál a subjektivní posouzení kvality komerčně dostupných sond. Hlavním výstupem práce bude stanovení kritických faktorů negativně ovlivňujících odečet preparátů a vlastní interpretaci výsledků metody FISH.

2 Přehled literatury

2.1 Mozaicismus

Mozaicismus je definován jako stav, kdy tělo jedince pocházející z jedné zygoty tvoří v různé míře dvě a více buněčných linií s genetickými či karyotypovými odlišnostmi. Chromozomální mozaicismus pak vyvstává z přítomnosti numerických nebo strukturních aberací u části buněk organismu. Mozaicismus se může týkat jak jaderné, tak mitochondriální DNA a může být přítomen buď v tkáních somatických, anebo zárodečných, případně v obou. Rozšíření mozaicismu v organismu podmiňuje především „načasování“ vzniku mutace. Dědičnost odchylky karyotypu pak vyplývá z přítomnosti mozaicismu v germinálních tkáních a u mitochondriálních mutací i z toho, zda je předávajícím jedincem žena (Chial 2008).

Tab. 2.1. Příklady poruch s Mendelovskou dědičností, u nichž byl zaznamenán somatický mozaicismus. Převzato a upraveno podle (Youssoufian a Pyeritz 2002, Chial 2008).

Hlavní postižený systém	**Porucha / syndrom a jeho**
Poruchy metabolismu	Tyrozinémie typu I
	Lesch-Nyhanův syndrom
	Conradi-Hunermann-Happleův syndrom
	Deficience adenosin deaminázy
Dysfunkce imunitního systému	Wiskott-Aldrichův syndrom
Poruchy srážecích faktorů	Hemofilie typu A
	Hemofilie typu B
Porucha skeletu	Marfanův syndrom
	Pseudoachondroplázie
Porucha kosterních svalů	Duchennova muskulární dystrofie
	Kongenitální myotonická dystrofie
Poruchy kůže	Epidermolytická hyperkeratóza
	Incontinentia pigmenti
Endokrinní poruchy	Syndrom rezistence k androgenům
Poruchy nervového systému	Friedreichova ataxie
Poruchy vylučovacího systému	Alportův syndrom
	Loweův syndrom

Fenotyp asociovaný se somatickým mozaicismem vykazuje velkou různorodost. Závisí na typu zasažených tkáních a podílu buněk s danou aberací. V některých případech je mozaicismus dobře patrný ve formě diskrepancí pigmentace kůže, asymetrie těla apod., jindy může být klinicky němý, nebo naopak se může pojit s celou škálou příznaků typických pro daný syndrom či mutaci. Oproti tomu se čistě germinální mozaicismus u svého „nositele“

nikterak neprojevuje (Youssoufian a Pyeritz 2002). Tabulka 2.1.1 podává minimální přehled o možném rozšíření somatického mozaicismu v různých tkáních u monogenních chorob s mendelovskou dědičností. U nich se v posledních letech diskutuje podíl mozaicismu na jejich variabilní expresivitě (Gottlieb *et al.* 2001). Nejvyšší množství případů mozaicismu je spojováno s numerickými aberacemi chromozomů, a to především s aneuploidiemi gonozomů.

V kontextu mozaicismu bývá někdy uváděn i mozaicismus funkční. Ten vzniká u homogametického pohlaví kompenzací genové dávky procesem lyonizace. Na chromozomu X, který má být inaktivován, se v tzv. X inaktivačním centru přepisuje gen XIST (*X-inactive specific transrcript*) a tvoří se metylační RNA. Transkribovaná RNA následně pokryje daný chromozom, čímž reprimuje většinu přítomných genů. K inaktivaci jednoho z X chromozomů (u jedinců se dvěma chromozomy X v karyotypu) dochází většinou náhodně ve stádiu pozdní blastuly. Výjimku představuje například situace, kdy je jeden z X chromozomů strukturně pozměněn. V takovém případě zůstává přednostně aktivní „normální“ chromozom X, zatímco abnormální chromozom X podstupuje inaktivaci (Strachan a Read 1999).

2.1.1 Mozaicismus, fenotyp a variabilní expresivita

V případě mozaicismu, daného už chybou v meiotickém dělení při vzniku jedné z pohlavních buněk, fenotyp postiženého závisí na době a způsobu korekčního procesu v rámci následného mitotického dělení zygoty. Čím dříve korekce nastane, tím lépe. U mozaicismu vyplývajícího z chyby mitotického dělení, při níž „postižená“ buňka záhy neprojde selekcí, například apoptózou, je lepší, pokud mutace nastane v pozdější fázi vývoje. Oba tyto závěry lze logicky odvodit ze skutečnosti, že během vývoje organismu se počet buněk zvyšuje ze dvou na celkové množství 10^{13} / 10^{14} buněk. Proto například dojde-li k „diploidizaci“ u jedné z buněk trizomického embrya, nebo naopak ke vzniku aneuploidní buňky u diploidního embrya, bude počet dceřiných buněk nesoucích stejnou genetickou výbavu exponenciálně narůstat. V prvém případě toto může vést ke zlepšení stavu, zatímco ve druhém případě k manifestaci daného postižení. U dospělého člověka může rovněž jedna buňka s abnormální chromozomovou výbavou, která se nadále dělí, zapříčiňovat řadu patologických stavů. V této fázi života dochází k dělení buněk především za účelem obnovy, a tak se mutace šíří jen v určitém orgánu či tkáni (Frank 2010).

Fenotyp pacientů s mozaicismem do jisté míry koresponduje se zastoupením abnormálních buněk. Rozhodně však neplatí přímá úměra mezi počtem postižených buněk a

množstvím příznaků spojovaných s danou odchylkou. I přesto lze v případě nízkofrekvenčního mozaicismu, například u plodu v rámci prenatální medicíny, predikovat menší míru postižení, než k jaké by došlo v případě vysokofrekvenčního mozaicismu. Pro představu je zde uvedena tabulka 2.2 zachycující důvod indikace cytogenetického vyšetření u postižených s Downovým syndromem. Pacientů s mozaicismem se správnou indikací k vyšetření, která se zakládá čistě na podezření na daný syndrom, je v průměru o 60 % méně než pacientů s klasickou trizomií či translokací (Devlin a Morisson 2004). To vypovídá o variabilitě projevů syndromu přítomných u těchto pacientů. Obtížnější rozpoznání mozaikových forem podtrhují i data o stáří pacientů v době stanovení jejich diagnózy, která jsou publikována ve stejné práci. Dva pacienti byli k vyšetření indikováni v průběhu prvních sedmi dnů života, další tři v průběhu dětství (tj. v šesti měsících, devatenácti měsících, sedmi a půl letech) a zbylí tři pacienti až v dospělosti.

Tab. 2.2. Důvod indikace vyšetření u pacientů s Downovým syndromem. Převzato a upraveno podle (Devlin a Morrisson 2004).

	Cytogenetický nález a počet vyšetřených					
Důvod cytogenetického vyšetření	**Trizomie**		**Translokace**		**Mozaicismus**	
		[%]		[%]		[%]
Podezření na Downův syndrom	177	90	3	100	3	37,5
Dysmorfické rysy a abnormality	14	7	0	0	1	12,5
Vývojové opoždění	0	0	0	0	1	12,5
Opakované vyšetření	2	1	0	0	1	12,5
Chromozomální abnormality v rodině	1	0,5	0	0	0	0
Hypotonie	1	0,5	0	0	0	0
Podezření na jiný syndrom	1	0	0	0	1	12,5
Mentální retardace	0	0	0	0	1	12,5
Intrauterinní růstová retardace	0	1	0	0	0	0
Celkem z 208 vyšetřených	**197**		**3**		**8**	

U monogenních chorob s mendelovskou dědičností se v posledních letech diskutuje přítomnost mozaicismu jako jednoho z možných faktorů zapříčiňujícího jejich variabilní expresivitu (Gottlieb *et al.* 2001). Příkladem takovéto choroby je i gonozomálně recesivní porucha tzv. syndrom necitlivosti k androgenům, který vyplývá z mutace androgenního receptoru (AR). Toto onemocnění se vyskytuje v kompletní, parciální a slabě se exprimující formě. Jednotlivé formy se liší především tím, zda se utvořil vnější genitál ženský, ambivalentní nebo mužský. U tohoto syndromu bylo popsáno přes 300 různých mutací, které se v 70 % přenáší „klasicky“ skrze ženy – přenašečky. U zbylých 30 % pacientů dochází k mutacím *de novo*, a to buď už v mateřské zárodečné buňce, anebo u daného jedince během

raných stádií vývoje v průběhu některého z mitotických dělení, čímž vzniká somatický mozaicismus. Ten může být zodpovědný za kompletní i parciální formu syndromu, což závisí na dané mutaci a množství buněk jí nesoucích. Variabilní expresivita tak závisí na více faktorech, mimo jiné i na načasování vzniku somatické mutace vzhledem k zakládání a rozrůznění gonád. Navíc pacienti se somatickým mozaicismem mohou mít určité množství funkčních receptorů, takže v průběhu dospívání u nich může nastat virilizace daná nárůstem produkce androgenů (Köhler *et al.* 2005).

2.2 Numerické aberace v mozaice

Mozaicismus zahrnující numerické aberace, jakožto nejvíce zastoupený mozaicismus vůbec, bývá často spojován pouze s patologickými stavy, i když se přirozeně vyskytuje během procesu vývoje či stárnutí také u zdravých jedinců (viz tabulka 2.3), u nichž zpravidla není příčinou fenotypových změn (Iourov *et al.* 2008).

Tab. 2.3. Nález aneuploidií v jednotlivých tkání u zdravých jedinců. Převzato a upraveno podle (Iourov *et al.* 2008).

Tkáň / Orgán	**Nález aneuploidních buněk**
Ovariální tkáň	15 – 20 % lidských oocytů
Sperma	2 – 10 % spermatozoí
Choriové klky	přibližně 24 %
Mozek - fetální	přibližně 30 %
Mozek - adultní	0,1 – 0,7 % (autozomy a chromozom Y), 2 % (chromozom X)
Placenta	objeven u 2 % plodů
Kůže	2,2 % a 4,4 %
Játra	3%
Krev	1 – 2 % (náhodně vybrané autozomy), 3 % (chromozom X)

Význam vzniku i zániku aneuploidií pro prenatální vývoj podtrhuje například práce Yurova a jeho kolegů. Ti na základě porovnání přítomnosti chromozomálního mozaicismu u vzorků z fetálních tkání centrálního nervového systému a odběru choriových klků dospěli k následujícímu závěru: „*Lidský mozek během svého vývoje vykazuje zvýšení náhodných aneuploidií a mozaicismus specificky omezený pouze na tkáň mozku.*“ (Yurov *et al.* 2007). Samotný mozaicismus považují zároveň za nezbytný pro vývoj centrálního nervového systému. Stejní autoři ve své následující práci pak na podkladech obdobných výzkumů uvažovali nad konceptem dvou protichůdných procesů, aneuploidizace a "antianeuploidizace". Vznik aneuploidie s jejími fenotypovými následky by odrážel selhání

mechanismů "antianeuploidizace, a toto postupné zhoršování "antianeuploidizace" během stárnutí by se pak projevovalo výskytem rakoviny (Iourov *et al.* 2008).

Dnes již klasickým příkladem přirozeně se vyskytujícího mozaicismu v průběhu stárnutí je spontánní ztráta pohlavních chromozomů vyvstávající se s různou frekvencí u mužů (chromozom Y) i žen (chromozom X). K aneuploidiím chromozomu X u žen, jak vyplývá z tabulky 2.4 sestavené na základě práce Guttenbacha a jeho kolegů (Guttenbach *et al.* 1995), dochází s vyšší frekvencí než ke ztrátě chromozomu Y u mužů.

Tab. 2.4. Spontánní ztráta pohlavních chromozomů v průběhu stárnutí jedinců. Převzato a upraveno podle (Guttenbach *et al.* 1995).

Věk vyšetřovaných	**Muži**	**Ženy**
	Ztráta chromozomu Y [%]	**Ztráta chromozomu X [%]**
0 – 15	0,43	2,3
16 – 30	0,26	2,27
31 – 45	0,52	1,93
46 – 60	0,72	3,56
61 – 75	0,96	4,26
76 a více	1,21	4,8

2.3 Mechanismy vzniku aneuploidií v mozaice

Aneuploidie v mozaice může vycházet z poruchy meiózy či mitózy. U meiotických příčin nejprve nalézáme pohlavní buňku s abnormálním počtem chromozomů, tj. dizomickou, respektive nulizomickou gametu, která po splynutí s druhou haploidní gametou dává vzniknout zygotě se změněným počtem chromozomů (2n +/-1). U ní následně dochází k nedokonalé nápravě trizomie či monozomie opravnými mechanismy během mitotického dělení. Mitotické příčiny mozaicismu vycházejí z poruchy postzygotického dělení u plodu s diploidní výbavou (Conlin *et al.* 2010).

2.3.1 Meiotické aneuploidie, jejich příčiny, možné následky a oprava

Nondisjunkce, nejčastější příčina aneuploidie, je obecně porucha rozchodu chromozomů. Ta vyplývá z chybného pohybu chromozomů, z jejich nepřesného či nesprávného párování nebo selhání funkce centromery (Snustad a Simmons 2009). Může k ní docházet v rámci meiotického dělení I i II. V meióze I lze rozlišit více příčin. Nemusí dojít k rozvolnění chiasmat během anafáze I s následnou společnou segregací homologních

chromozomů nebo naopak se chiasmata předčasně rozvolní. Dále může selhat rekombinace a homologní chromozomy pak nezávisle přejdou ke stejnému pólu dělícího vřeténka, respektive do stejné dceřinné buňky. Nakonec může dojít i k předčasnému oddělení sesterských chromatid před separací homologních chromozomů. Poruchy rozchodu chromozomů v meióze II jsou obvykle vyústěním předčasné separace sesterských chromatid (Hassold a Hunt 2001).

Nondisjunkce tedy zodpovídá za vznik aneuploidní gamety, potažmo zygoty. Z výzkumů etiologie aneuploidií, především trizomií (u monozomií není většina plodů životaschopná) byl učiněn závěr, že aneuploidie mají nejčastěji původ v maternální meióze I, přičemž rozhodující faktor představuje věk matky. Tento závěr nelze aplikovat všeobecně, což dokazuje například Klinefelterův syndrom vycházející častěji z poruch paternální než maternální meiózy, a trizomie chromozomu 18 jako následek především maternální nondisjunkce v meióze II vznikající bez ohledu na věk matky (Hassold *et al.* 2007, Lamb *et al.* 2005).

Tab. 2.5. Původ trizomií. Použité zkratky: MI – Meióza I, MII – Meióza II. Převzato a upraveno z (Hassold *et al.* 2007).

Trizomie	**Meiotické příčiny**				**Mitotické příčiny [%]**	**Počet vyšetřených**
	Maternální		**Paternální**			
	M I [%]	**M II [%]**	**M I [%]**	**M II [%]**		
2	53,4	13,3	27,8	0	5,6	18
7	17,2	25,7	0	0	57,1	14
13	56,6	33,9	2,7	5,4	1,4	74
14	36,5	36,5	0	19,2	7,7	26
15	76,3	9,0	0	14,7	0	34
16	100	0	0	0	0	18
18	33,3	58,7	0	0	8,0	14
21	69,6	23,6	1,7	2,3	2,7	782
22	86,4	10,0	1,8	0	1,8	130
XXX	63,0	17,4	0	0	19,6	46
XXY	25,4	15,2	50,9	0	8,5	224

Důležitou roli ve vzniku trizomií tedy často hraje vyšší věk matky, v jehož důsledku dochází k rekombinačním změnám během meiózy. Ty pak dávají podklad pro proces nondisjunkce. Toto studoval například Lamb se svým týmem (Lamb *et al.* 2005) u chromozomu 21 v práci, která popisuje lokalizaci rekombinací u žen rozdělených do tří věkových kategorií. V průběhu stárnutí docházelo k přesunu rekombinačních výměn z oblasti telomer k oblastem bližším centromerám. Z výsledků studie vyplývá, že rekombinační změny, případně zapříčiňující nondisjunkce, jsou patrné již u mladších žen, nicméně s rostoucím

věkem dochází k akumulaci účinků dalších nepříznivých vlivů. To se odráží ve výskytu nezvyklých lokalizací rekombinačních výměn a zároveň na samotném segregačním aparátu, což ohrožuje i správně zrekombinované bivalenty.

Dále jsou známy i poruchy nezávislé na věku. U jedné této varianty nedochází k rekombinaci mezi homologními chromozomy a jejich nezávislé segregaci během prvního meiotického dělení, čímž lze vysvětlit přítomnost tzv. achiasmatických chromozomů. Achiasmatické chromozomy mohou, ale nemusí být, příčinou nondisjunkce, jak dokazují nálezy u zdravé populace. V každém případě se považují za jeden z rizikových faktorů (Hassold *et al.* 2007, Lamb *et al.* 2005). Ve stejné fázi meiózy může také docházet i k nondisjunkcím zapříčiněným předčasnou separací sesterských chromatid (Hassold a Hunt 2001), které se proto podle některých autorů rovněž řadí mezi achiasmatické chromozomy (např. Delhanty 2005).

Některé nedávné studie stojí na výsledcích výzkumů zabývajících se asociacemi mezi věkem žen a mechanismy vzniku aneuploidií. Ty tak dokážou vcelku spolehlivě odpovědět, kdy k nondisjunkci u konkrétního případu došlo, a to podle umístění rekombinačních změn či haplotypů na chromozomech. Pokud se tedy nesprávný rozchod chromozomů udál v meióze I, jsou pozměněné úseky v koncových sekvencích ramének a úseky bez rekombinací v oblasti centromery. Nondisjunkce v druhém meiotickém dělení se odráží jak v přítomnosti změn v oblastech centromerických lokusů, tak v přítomnosti haplotypů v telomerických úsecích (Conlin *et al.* 2010, Hassold a Hunt 2009).

Výsledná gameta, u níž došlo k nondisjunkci, nese změněný počet chromozomů – je dizomická (n+1), případně nulizomická (n-1). K nulizomii gamety může vést i proces *anaphase lag* (více viz oddíl 2.3.3).

Když se pohlavní buňka nesoucí aneuploidii spojí s druhou haploidní gametou, vznikne zygota s trizomickým, respektive monozomickým nálezem. V těchto případech může krátce po fertilizaci dojít ke korekčním procesům v rámci mitotického dělení:

- *Trisomy rescue*: zahrnuje především mitotickou nondisjunkci či méně často proces *anaphase lag* se ztrátou „přebývajícího“ trizomického chromozomu. V ilustrujícím příkladu budeme uvažovat o trizomii dané fertilizací dizomického oocytu haploidní spermií, u níž dojde k *trisomy rescue*. Při „ztrátě“ přebývajícího chromozomu mateřského původu ve všech buňkách daného vývojového stádia bude budoucí jedinec bez fenotypových projevů. Pokud se „ztratí“ trizomický chromozom otcovského původu ve všech buňkách, mohou být u jedince přítomny následky vyplývající z uniparentální

heterodizomie. Ve chvíli, kdy korekce neproběhne u všech buněk, ale pouze u části, bude jedinec mozaikou (Conlin *et al.* 2010, Robinson *et al.* 1997).

- *Monosomy rescue*: obnáší duplikaci monozomického chromozomu během mitózy. Zřejmým následkem je uniparentální izodizomie, která v případě, že k *monosomy rescue* nedojde ve všech buňkách daného vývojového stádia, bude přítomna v mozaice (Conlin *et al.* 2010, Robinson *et al.* 1997).

2.3.2 Uniparentální dizomie jako možný následek *trisomy* a *monosomy rescue*

Uniparentální dizomie je stav, při němž oba homologní chromozomy pochází od jednoho z rodičů. Bývá identifikována u některých případů recesivně dědičných chorob, poruch imprintingu a mozaicismu. Za možný rizikový stav, jež může být potenciálně spojen s uniparentální dizomií, je brán i mozaicismus omezený na placentu (*confined placental mosaicism*) uváděný v oddílu 2.3.4 (Shaffer *et al.* 2001). K příčinám vzniku uniparentální dizomie patří splynutí nulizomické gamety s dizomickou a již zmíněné procesy *trisomy* a *monosomy rescue* (Conlin *et al.* 2010). Výskyt heterodizomie v mozaice jako následek neúplné korekce trizomie může mít vážné klinické následky (korelující s počtem dizomických buněk) vyplývající z poruchy imprintingu (tj. odlišné exprese genů v závislosti na pohlaví předávajícího rodiče) určitého lokusu. Mezi takovéto prokázané defekty pojící se s abnormálním fenotypem patří maternální dizomie chromozomů 7, 14 a 15 a paternální dizomie chromozomů 6, 11, 14 a 15 (Shaffer *et al.* 2001). Patologický stav zapříčiněný izodizomií v mozaice, který by vznikl následkem nedokonalé *monosomy rescue*, může být rovněž příčinou poruchy imprintingu a navíc i recesivní choroby v mozaice (Conlin *et al.* 2010, Robinson *et al.* 1997).

2.3.3 Mitotické poruchy, nondisjunkce a *anaphase lag*

Nondisjunkce a proces *anaphase lag* jsou dvě nejčastější příčiny aneuploidií s původem v mitotickém dělení. Oba děje vedou k mozaicismu, u něhož zastoupení buněk nesoucích abnormální chromozomovou výbavu závisí na tom, kdy k nesprávné segregaci chromozomů došlo. Obecně lze říci, že pokud porucha mitózy nastane v době brzkého fetálního vývinu, bude následkem mozaika s vysokým procentem abnormálních buněk, zatímco v pozdější fázi vývoje vzniká mozaika nízkofrekvenční (Wise *et al.* 2009). Podle dostupných údajů z preimplantačních vyšetření vykazují až tři čtvrtiny embryí během prvních

tří dnů po umělé fertilizaci chromozomální mozaicismus, u něhož se postupem času zastoupení aneuploidních buněk snižuje různými procesy. Z tohoto důvodu původně přítomné aneuploidní buňky obvykle nedávají podklad pro patologický stav v mozaice, i když za určitých situací mohou zodpovídat za selhání implantace daného zárodku či za vznik mozaicismu omezeného na placentu (Van Echten-Arends *et al.* 2011). Příkladem takového stavu je již zmiňovaný mozaicimus fetálního mozku.

Mitotické nondisjunkce vyplývají ze stejných příčin jako nondisjunkce meiotické, tj. z chybného pohybu chromozomů, z jejich nepřesného či nesprávného párování nebo selhání funkce centromery (Snustad a Simmons 2009). Následkem mitotických nondisjunkcí jsou trizomie a monozomie v mozaice, jejichž fenotypové projevy vyplývají z počtu a lokalizace postižených buněk.

Při *anaphase lag* není homologní chromozom kvůli nemožnosti připojení na dělící vřeténko či zpomalení pohybu během anafáze začleněn do jádra dceřiné buňky. Při mitóze původně diploidních buněk proto dochází k úplné ztrátě chromozomu, a tudíž k monozomii jedné z dceřiných buněk. Pokud tedy porovnáme *anaphase lag* s nondisjunkcí, výsledkem *anaphase lag* bude jedna dceřiná buňka s monozomií a jedna diploidní, kdežto u nondisjunkce jsou výsledkem dvě aneuploidní buňky (Mantikou *et al.* 2012).

Mezi další procesy vedoucím k aneuploidiím patří: předčasné buněčné dělení, chybná cytokineze, buněčná fúze a demolice chromozomů.

Demolice chromozomů zahrnuje úplnou destrukci a fragmentaci jednoho z chromozomů, což vede k jeho úplné ztrátě. Tento mechanismus může být součástí procesu *trisomy rescue*, během něhož vzniká diploidní buňka s možnou poruchou imprintingu. V případě postižení diploidní buňky je následkem monozomie. Předčasné dělení buněk bez předchozí duplikace dává vzniknout dvěma haploidním dceřiným buňkám. Opačný výsledek, tedy buňky nesoucí polyploidní sadu chromozomů, vykazuje endoreduplikace či několikanásobná endoreduplikace bez následné cytokineze. Proces endoreduplikace byl u člověka popsán u zygoty i trofoblastu v prvním trimestru těhotenství, u dospělého pak v buňkách jater a ledvin. Poruchy cytokineze mohou vyústit v selhání buněčného dělení nebo jeho asymetrii. Následkem může být tetraploidie, chaotická chromozomální výbava nebo přítomnost dvou jader v buňce. Příkladem může být nález multijaderných blastomer. Ty vznikají v důsledku deficience mateřských molekul zajišťujících polarizaci, buněčné dělení a kompaktaci nebo v důsledku defektu povrchových struktur zajišťujících vzájemné buněčné interakce. U blastomer je rovněž popsán jev buněčné fúze. Tento děj ale musí být indukován působením vnějšího prostředí, tj. nevhodným zmrazováním i rozmrazováním embryí,

změnami pH a osmotického tlaku, jenž ve výsledku vede k embryím nesoucím čistě či částečně polyploidní chromozomovou sadu (Mantikou *et al.* 2012).

2.3.4 Osud buněk s aneuploidií

Buňky s aneuploidií mohou podstoupit proces aktivní korekce (*monosomy* nebo *trisomy rescue*) pomocí *anaphase lag*, nondisjunkce či demolice chromozomu (Mantikou *et al.* 2012). Nondisjunkce specifického chromozomu u buněk s ojedinělou monozomií nebo trizomií má za následek vznik jedné diploidní a druhé nulizomické, respektive tetrazomické buňky, přičemž svou roli zde hraje i uniparentální dizomie. Výsledkem *anaphase lag*, uplatňující se během *trisomy rescue*, jsou dvě diploidní buňky (Los *et al.* 2004).

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt probíhá v adultních i vyvíjejících se tkáních jako odpověď na vnitřní nebo vnější podněty. Apoptóza může být iniciována i při aneuploidii, čímž dojde ke změně poměru aneuploidních a diploidních buněk u embrya s mozaicismem (Mantikou *et al.* 2012).

Další osud, který může potkat embryonální buňky s abnormální chromozomovou výbavou v rámci *aneuploidy rescue*, je jejich nahrazení diploidními buňkami a přemístění do extraembryonálních tkání, kde jsou lépe tolerovány. Vzniká tak mozaicismus omezený na placentu, který však může být rovněž vyústěním mitotické chyby v placentě. Podle lokalizace aneuploidních buněk rozlišujeme tři typy. První typ, u něhož lze vyloučit riziko postižení embrya, se omezuje na cytotrofoblast a má nejčastěji původ v mitóze. Druhý typ, pocházející opět především z mitotických poruch, zasahuje tkáň chorionu. Třetí typ rozšířený jednak v cytotrofoblastu, jednak i v chorionu, vychází z poruch meiózy. Výsledný obraz mozaicismu závisí na počtu a načasování vzniku blastomer s abnormální chromozomovou výbavou, zasaženém buněčném typu, životaschopnosti a selekci postižených buněk. Mozaicismus omezený na placentu bývá nalézán u přibližně 2 % vzorků pocházejících z odběrů choriových klků, přičemž přibližně 16 – 20 % těchto případů se pojí s komplikacemi, tj. intrauterinní růstovou retardací, spontánním potratem či perinatálním úmrtím plodu. U mozaicismu omezeného na placentu mohou být přítomné i následky vyvstávající z uniparentální dizomie, a to hlavně u třetího typu, kde se teoretické riziko vzniku uniparentální dizomie u fétu odhaduje až na 33 %. Nejméně často jsou v extraembryonálních tkáních zaznamenány buňky nesoucí monozomie autozomů (Kalousek a Vekemans 1996, Toutain *et al.* 2010).

2.4 Příklady aneuploidií v mozaice

Aneuploidie postnatálně slučitelné se životem jsou, až na určité výjimky, zastoupené pouze v mozaice. Jejich případný fenotypový projev u referovaných případů obvykle vykazuje celou řadu změn odrážejících se v těžkém psychomotorickém postižení a přítomnosti vývojových vad (např. Choi *et al.* 2012). Celkový populační výskyt živě narozených jedinců s těmito numerickými odchylkami se odhaduje na 1/ 34 000. Zmiňované výjimky, které nespadají do uvedené incidence v populaci, představují tři aneuploidie autozomů (trizomie chromozomů 21, 13 a 18) a čtyři aneuploidie gonozomů (monozomie chromozomu X, trizomie 47,XXY, 47,XXX a 47,XYY) (Nussbaum *et al.* 2004). Pro nízký výskyt mozaicismu trizomií chromozomů 13 a 18 a pro minimální fenotypový projev odchylek 47,XXX a 47,XYY (v této karyotypové konstituci) jsou nadále jako příklady numerických aneuploidií probírány pouze trizomie chromozomu 21 (Downův syndrom), monozomie X (Turnerův syndrom) a trizomie 47,XXY (Klinefelterův syndrom).

2.4.1 Downův syndrom, *maternal age effect* a mozaicismus

Projevy Downova syndromu byly poprvé popsány v roce 1866 Johnem Langdonem Downem. Zatímco jeho příčina, trizomie chromozomu 21, byla odhalena až téměř o sto let později (Jeromem Lejeunem a Patricií Jacobsovou v roce 1959). Vzhledem k typickému vzhledu obličeje postiženého se dříve nezřídka užíval termín „mongolismus“, jež se od roku 1965, díky intervenci zástupců tehdejší Mongolské lidové republiky, už neužívá (Girirajan 2009). Není zcela bez zajímavosti, že již v roce 1933 byl poprvé navržen koncept asociace vyššího věku matky s výskytem Downova syndromu u jejího potomka, nazývaný také jako *maternal age effect*, který je v současnosti s tímto syndromem neodmyslitelně spjat. První, kdo dal do souvislosti vliv věku rodičů a trizomie chromozomu 21, byl lékař Lionel S. Penrose. Na základě statistické analýzy výsledků vyšetření 150 rodin s nejméně jedním postiženým dítětem Penrose zjistil, že signifikantní údaj je věk matky při narození dítěte s Downovým syndromem (Penrose 1933). Zvláště v současnosti, kdy se hranice rodičovství neustále posouvá (podle údajů získaných mezi lety 1983 a 1997 v USA, narostla porodnost u žen starších 35 let o 9 % a u žen starších 40 let o 178 %), se tento koncept stal nedílnou součástí prenatální péče a genetického poradenství. Podle Fische a jeho kolegů se *maternal age effect* u Downova syndromu projevuje hlavně u matek starších 35 let. Navíc s přibývajícími lety nabývá většího významu, což potvrzuje až šestinásobně vyšší výskyt

Downova syndromu u potomků matek starších 40 let (Fisch *et al.* 2003). A i když jsou v dnešní době dobře známy podrobnosti ohledně vzniku trizomie chromozomu 21, stále chybí spolehlivá odpověď na otázku, v čem spočívá pravý důvod asociace vyššího věku matky a nálezu Downova syndromu u jejího potomka. Některé teorie se zakládají na tezi, že změny závislé na věku jsou dány snížením zásobního *poolu* oocytů a proměnou hladiny hormonů (Warburton 2004), jiné hovoří o větším počtu změn závislých i nezávislých na věku, které v souhrnu vedou k meiotickým nondisjunkcím (Lamb *et al.* 2005). Méně diskutován bývá i možný vznik mitotických aneuploidií během časného vývoje embrya v důsledku vyššího věku matky, jež se odráží v deficienci maternální mRNA a proteinů zajišťujících průchod a kontrolu buněčného dělení, přičemž svou roli hraje i akumulace cizorodých chemických látek, volných radikálů či nedostatečná vaskularizace antrálních folikulů během zrání oocytů. Původ aneuploidií během mitózy může být rovněž od otce, jehož spermie při fertilizaci oocytu přináší dělící aparát. V případě většího či menšího počtu centriol dochází tak k chybné segregaci chromozomů, která je s vyšší frekvencí nepřekvapivě zaznamenána u dispermie (Mantikou *et al.* 2012).

První studie významněji se zabývající mozaicismem u Downova syndromu pocházejí především z počátku 60. let minulého století. Příkladem jedné studie z této doby je i práce z roku 1962 popisující případ jednatřicetileté ženy, matky dítěte postiženého Downovým syndromem, u níž díky jejím rysům a příznakům specifickým pro trizomii chromozomu 21 (lehké mentální retardaci, Brushfieldovým skvrnám, rozbrázděnému jazyku a palmárním rýhám), byl diagnostikován mozaicismus, vzhledem k postižení jejího potomka zjevně rozšířený i v zárodečných tkáních. Za pravděpodobný mechanismus vzniku pak autoři považovali mitotickou nondisjunkci u původně trizomického embrya (Blank *et al.* 1962). Podle některých současných studií se množství případů mozaicismu trizomie chromozomu 21 odhaduje na 1 % z celkového počtu postižených s Downovým syndromem (Sherman *et al.* 2007), zatímco jiné studie udávají hodnoty 2 – 4 % (Papavassiliou *et al.* 2009). Právě na tyto vyšší hodnoty odkazují i Devlin s Morrisonem (Devlin a Morrison 2004) s ohledem na svou pětiletou retrospektivní studii, v níž podíl mozaikových forem odpovídal 3,85 %. Tato nesourodost zřejmě vychází z problematiky správného rozpoznání pacientů s mozaicismem od pacientů s „kompletní“ formou Downova syndromu. Například podle práce z roku 2010 (Hultén *et al.* 2010) se považuje za všeobecně předpokládaný závěr, že 1 – 5 % postižených s Downovým syndromem nemají „kompletní“ formu této poruchy, i když jsou takto diagnostikováni, ale vysokofrekvenční mozaicismus. Největší rozdíl mezi oběma fenotypy byl nalezen v přítomnosti či nepřítomnosti epikantů, brachycefalie, hyperextenzibility kloubů

a v inteligenčním kvocientu. Při rozdělení pacientů s mozaicismem do dvou skupin, podle podílu buněk s trizomií a podle počtu klinických příznaků, bylo nalezeno nejvíce rozdílů v přítomnosti nebo nepřítomnosti kongenitálních defektů srdce a umbilikálních hernií. Zvláštním odhalením byl nález korelace mezi určitými klinickými příznaky a typem vyšetřované tkáně – bukálního stěru nebo periferní krve. V prvém případě zastoupení trizomických buněk korelovalo s hodnotou inteligenčního kvocientu, ve druhém s vrozenými poruchami srdce. Autoři tyto výsledky vysvětlují na základě stejného embryonálního původu tkání. Epitelové buňky bukálního stěru a buňky mozku jsou odvozeny od ektodermu, zatímco lymfocyty a srdeční tkáň pocházejí z mezodermu (Papavassiliou *et al*. 2009).

2.4.2 Turnerův syndrom, jeho diagnostika, genetické podklady, léčba a mozaicismus

Turnerův syndrom byl poprvé popsán ve čtyřicátých letech minulého století lékařem Henrym Turnerem u šestnáctileté dívky vykazující typické znaky této poruchy, jimž dominuje malý vzrůst, nevyvinutí druhotných pohlavních znaků a infertilita (Chu a Connor 1995). Fenotyp postižených žen vykazuje velkou variabilitu zrcadlící variabilitu karyotypu nalézaného u pacientek s touto abnormalitou. Příčinou tohoto syndromu je strukturní aberace či úplná absence jednoho z X chromozomů. Karyotyp postižené může tedy zahrnovat pouze jeden pohlavní chromozom nebo i druhý strukturně pozměněný chromozom (více viz oddíl 2.7.2). Nezřídka tomu tak bývá v mozaikové formě zahrnující další buněčnou linii s druhým gonozomem (Ranke 1999).

Z těchto důvodů bývají nositelky Turnerova syndromu diagnostikovány v různých stádiích vývoje či života. První příznaky mohou být zaznamenány již v prenatálním období, kdy dochází k odhalení postižených plodů pomocí neinvazivních vyšetření (např. nálezy edémů a růstové retardace plodu ultrazvukem). Výjimkou není ani náhodný záchyt při analýze tkání získaných invazivními zákroky indikovanými například na základě vyššího věku matky. Další pacientky bývají diagnostikovány těsně po porodu na podkladě přítomnosti specifických vnějších znaků zahrnující především rozsáhlé edémy a jejich následky, případně srdeční vadu nebo koarktaci aorty. Až třetina případů je diagnostikována v dětství na základě malého vzrůstu, který nekoreluje s výškou rodičů. Pozdější odhalení nositelek Turnerova syndromu bývá na podkladě amenorei a opoždění puberty. Poslední skupinu tvoří pacientky diagnostikované na základě infertility a z důvodu opakovaných potratů. Tuto skupinu často tvoří pacientky s nízkofrekvenčním mozaicismem (Sybert a McCauley 2004).

Stále se rozvíjí snaha o určení genů zodpovídajících za tuto širokou škálu příznaků. Podle autorů Chu a Cornera (Chu a Connor 1995) by kandidátní geny neměly být inaktivovány lyonizací a měly by mít homolog na chromozomu Y. Jedním z genů dávaných do souvislosti s Turnerovým syndromem a splňujícím tyto podmínky je *short stature homeobox* (SHOX) gen umístěný v pseudoautozomální oblasti, jehož delece (respektive ztráta v rámci celého chromozomu) byla popsána jako jedna z příčin malé postavy a defektů skeletu. Gen SHOX se během vývoje transkribuje především v končetinách a faryngeálních obloucích. U končetin se přepisuje v distálních oblastech a v místech kloubů, tj. kolene a lokte, což v případě jeho delece, vysvětluje zkrácení a deformity končetin, jaké představují *cubitus valgus*, *genu valgum* a Madelungovu deformitu. Druhé místo exprese genu SHOX je ve faryngeálních obloucích tvořících základ čelistí a středoušních kůstek, čímž se vysvětlují další příznaky zahrnující vysoce klenuté patro, mikrognacii, hluchotu a náchylnost k zánětům středouší (Clement-Jones *et al.* 2000). Variabilita v přítomnosti jednotlivých symptomů odráží pravděpodobně funkci dalších modifikujících genů, náhodných interakcí a epigenetických modifikací (Rappold *et al.* 2002). Epigenetické modifikace mohou být navíc vrozené ve formě genomického imprintingu.

S fenoménem genomického imprintingu přímo souvisí i poznatek, vyplývající ze studií Hassolda a jeho kolegů (Hassold *et al.* 1988, Hassold *et al.* 1992), že až 79 % případů Turnerova syndromu vykazuje ztrátu paternálního X (X^{pat}) chromozomu a pouze 21 % maternálního X (X^{mat}) chromozomu. V souvislosti s imprintingem byly učiněny tyto obecnější závěry:

a) pacientky s X^{pat} chromozomem mají lepší verbální schopnosti a menší problémy se sociálními interakcemi (Nijhuis-van der Sanden *et al.* 2003);

b) u pacientek s X^{mat} chromozomem byla zaznamenána vyšší hladina LDL (*low density lipoprotein*) cholesterolu a triacylglycerolů oproti pacientkám s X^{pat} chromozomem, přičemž obě skupiny měly odpovídající věk a hladinu *body mass indexu*, s čímž může souviset i vyšší náchylnost k ateroskleróze (Van *et al.* 2006);

c) výška pacientek s X^{mat} chromozomem koreluje s výškou matky, přičemž tyto dívky mají lepší odpověď na léčbu růstovým hormonem, jenž je indikován jako odpověď na růstovou retardaci (Hamelin *et al.* 2006).

Růstová retardace se u Turnerova syndromu projevuje především v pubertálním období, kdy dochází k progresivnímu snižování sekrece růstového hormonu. Léčba malého vzrůstu zahrnuje užití růstového hormonu, anabolických steroidů nebo jejich kombinaci v dlouhodobých či krátkodobých dávkách. Průměrná výška u neléčených pacientek odpovídá

přibližně 140 cm. V souvislosti s léčbou nízkého vzrůstu musí být vzato do úvahy i podávání estrogenu, jenž má duální funkci, kdy v nízkých dávkách růst podporuje, ve vysokých naopak inhibuje. Estrogen se u mladších pacientek podává kvůli indukci a udržení menstruačního cyklu v období puberty, u starších žen s Turnerovým syndromem k prevenci osteoporózy a aterosklerózy. Pro řízení menstruačního cyklu musí být užití estrogenu cyklicky prokládáno podáváním progesteronu, který vzhledem k nedozrávání pohlavních buněk a absence žlutého tělíska rovněž není produkován. Tento stav vzniká na podkladě atrézie ovarií, k níž u pacientek s Turnerovým syndromem nedochází během menopauzy, ale už v období před dosažením puberty, a to až u 90 % případů (Brook 1986, Frías *et al.* 2003, Rosenfield *et al.* 1998).

Nicméně i tak jsou některé pacientky za určitých okolností schopny otěhotnět a donosit dítě, i když zpravidla pomocí technik *in vitro* fertilizace, přičemž užité oocyty mohou být jejich vlastní, v případě, že by jim byly odebrány v dětství a uchovány pomocí kryoprezervace, nebo dárcovské. Možné komplikace těhotenství vyvstávají ze samotných projevů Turnerova syndromu. Kardiovaskulární poruchy, zaznamenané přibližně u 25 – 50 % případů, mohou být životu ohrožujícím stavem matky především u několikanásobného těhotenství, a to zvláště pokud jsou v kombinaci s vysokým krevním tlakem, jenž se vyskytuje rovněž až u 50 % nositelek Turnerova syndromu. Během těhotenství se musí brát ohled i na autoimunitní zánět štítné žlázy vyskytující se také až u poloviny pacientek, který by v neléčené formě mohl vyvolat kretenismus u dítěte. Další komplikace zahrnují náchylnost k poškozením ledvin, celiakii apod. (Hovatta *et al.* 2006, Karnis 2012). Podle studie z roku 1998 (Tarani *et al.* 1998) 160 těhotenství 74 žen s Turnerovým syndromem skončilo 29 % spontánním potratem, 7 % perinatálním úmrtím plodu, 20 % narozením plodu s postižením (Turnerovým nebo Downovým syndromem atd.) a 38 % zdravými dětmi. Z těchto poznatků vyplývá, že u žen s Turnerovým syndromem, které plánují otěhotnět, je na místě genetická konzultace, a to i ve vzácnějších případech, kdy ženy, obvykle s nízkofrekvenční mozaikou Turnerova syndromu, otěhotní přirozeně.

Turnerův syndrom je s mozaicismem neodmyslitelně spjat. Vzhledem k vysoké letalitě plodů s „čistě“ 45, X buněčnou linií (odhadované až na 99 %), byla vyslovena hypotéza, že všechny přeživší pacientky s tímto onemocněním jsou ve skutečnosti mozaikami, přičemž přítomnost mozaicismu zvyšuje jejich šanci na přežití. Teorie se vztahuje i na případy, kdy během rutinního vyšetření není nalezena druhá buněčná linie zahrnující druhý gonozom, přičemž se předpokládá kryptický mozaicismus v jiné (nevyšetřované) tkáni (Hook a Warburton 1983). I přes četné studie (např. Held *et al.* 1992, Araújo *et al.* 2008) nebyla

hypotéza doposud přesvědčivě potvrzena ani vyvrácena, například podle Hassolda a jeho kolegů (Hassold *et al.* 1992) druhou buněčnou linii má přibližně 60 – 80 % živě narozených pacientek s Turnerovým syndromem. Nicméně mozaicismus zahrnující druhou buněčnou linii s karyotypem obsahujícím chromozom Y má i svou stinnou stránku. U více než 30 % pacientek s přítomností Y chromozomu hrozí vyvinutí gonadoblastomu, jenž může potenciálně malignizovat. Tyto pacientky musí být pravidelně kontrolovány ultrazvukem, případně je u nich indikováno vyjmutí ovarií (Gravholt *et al.* 2000).

2.4.3 Klinefelterův syndrom, jeho diagnostika a mozaicismus

Klinefelterův syndrom byl poprvé zaznamenán v roce 1942 Harry F. Klinefelterem a jeho spolupracovníky u devíti mužů s typickými projevy tohoto onemocnění. Hlavní příčina, nadpočetný X chromozom v karyotypu (47,XXY), byla objevena v roce 1959. Dodatečně byly popsány další abnormality karyotypu postižených zahrnující více nadpočetných chromozomů (tj. 48, XXXY, 49,XXXXY apod.) a mozaicismus, obvykle dvou buněčných linií, mužské linie 46,XY a linie s variantou Klinefelterova syndromu (Smyth a Bremner 1998, Wikström a Dunkel 2008). V závislosti na karyotypu se u pacientů v různé míře rozvíjí charakteristické znaky, a proto podobně jako u Turnerova syndromu bývají pacienti s Klinefelterovým syndromem diagnostikováni v různých obdobích života.

V rámci prenatálních vyšetření je odhaleno poměrně málo případů, a to především na základě vyššího věku matky (až 10 x vyšší výskyt Klinefelterova syndromu u potomka byl popsán u žen mezi 35 a 40 lety), což může být lehce zavádějící v tom smyslu, že ve větší míře se jako příčina uvádí paternální nondisjunkce, i když celkový rozdíl mezi maternálními a paternálními nondisjunkcemi činí přibližně 10 % (Bojesen *et al.* 2003, Hassold *et al.* 2007). Poměrně nízké procento případů bývá zachyceno i v prepubertálním období, kdy velká část postižených bývá podchycena na základě poruch učení. Nejvíce postižených Klinefelterovým syndromem je rozpoznáno na základě typických příznaků (tj. hypogonadismu, eunuchoidního vzhledu, gynekomastie, špatného vývoje varlat a vyšší postavy) v období puberty. Poslední skupinu tvoří diagnostikovaní na podkladě infertility (Bojesen *et al.* 2004).

Infertilita postižených se rozvíjí v období puberty, kdy tkáň varlat začíná masivně podstupovat patologické procesy zahrnující hyalinizaci a fibrózu (Foresta *et al.* 1999). Zároveň se mění i koncentrace vybraných biochemických markerů. Oproti normálním hladinám pohlavních hormonů zaznamenaných v prepubertálním období dochází k nárůstu hladin folikulostimulačního a luteinizačního hormonu a ke zvýšení hladin estradiolu, jenž tak

zodpovídá za případný rozvoj gynekomastie. Naopak koncentrace testosteronu se snižuje a obvykle přetrvává pod spodní hranicí normálu. Z tohoto důvodu bývá, za předpokladu včasného stanovení diagnózy, testosteron substitučně dodáván (Wikström a Dunkel 2008). Celková degenerace testikulární tkáně pak vede k azoospermii či, v případech mozaicismu Klinefelterova syndromu, k oligospermii (Foresta *et al.* 1999). Přes tyto nálezy se pacienti s tímto syndromem mohou za určitých okolností stát otci.

Na počátku puberty, tedy ve chvíli, kdy tkáň varlat vykazuje ještě určitou funkci, je možné odebrat sperma pacientů s Klinefelterovým syndromem a uchovat jej pomocí kryoprezervace pro budoucí užití (Wikström a Dunkel 2008). Alternativní přístup spočívá v kombinaci technik testikulární extrakce spermatické tkáně a intracytoplazmatické injekce spermie. Příslušnou technikou lze ze seminálních kanálků se zbytkovými místy spermatogeneze získat nevyzrálé spermie. Ty po kultivaci mohou posloužit k umělému oplodnění (Foresta *et al*. 1999). V každém případě je nutné, aby pacient podstoupil genetickou konzultaci. Výjimky netvoří ani pacienti s mozaicismem, kteří mohou produkovat určité procento zralých a funkčních spermií, a to z důvodu hrozícího přenosu aneuploidií gonozomů do další generace (Foresta *et al*. 1998).

2.5 Strukturní chromozomové aberace a mozaicismus

Strukturní chromozomové aberace jsou zodpovědné za narušení struktury chromozomů. Podobně jako numerické odchylky mohou vznikat v rámci mitózy nebo přenosem od rodičů skrze gamety s danou odchylkou, a tak se nacházet buď ve všech buňkách organismu nebo v mozaice. Obecně se uvádí, že tyto přestavby mohou být vyústěním spontánních i indukovaných dějů způsobující nerovnoměrný *crossing over* nebo chromozomální zlomy. Nerovnoměrný *crossing over* vede k duplikacím a delecím, jednoduchý zlom k terminálním delecím, dva zlomy na jednom chromozomu k intersticiálním delecím, kruhovým (*ring*) chromozomům či inverzím, zatímco dva zlomy na dvou různých chromozomech produkují reciproké a Robertsonské translokace (Moore a Best 2001). Strukturní aberace se klasifikují na balancované a nebalancované. Balancované přestavby se neprojevují ve fenotypu, mají zachované množství genetického materiálu a mohou se na potomky přenášet v nebalancované formě. Nebalancované aberace se projevují patologickým fenotypem, který je odrazem nadbytku nebo absence genetického materiálu. Další možná

klasifikace, na aberace intrachromozomové a interchromozomové, spočívá v určení, zda daná přestavba postihuje jeden nebo více párů chromozomů (Kočárek 2007).

2.6 Mechanismy vzniku strukturních aberací v mozaice

Strukturní aberace obecně mohou mít původ v meiotickém i mitotickém dělení. Přestavby mohou vznikat na podkladě nedostatečné korekce zlomů, během rekombinace chromozomů nebo při replikaci DNA.

2.6.1 Chromozomální zlomy a jejich reparace

Chromozomální zlomy jsou spontánně vznikající či indukovaná místa přerušení DNA. Klasifikují se na jednořetězcové a dvouřetězcové, přičemž dvouřetězcové zlomy se dále dělí na zarovnané a posunuté (Rosypal 2000). Chromozomální zlomy jsou vytvářeny jak během řady fyziologických procesů (meiotická rekombinace, rozrůznění imunoglobulinů), tak i v souvislosti s patologickými změnami (nádory, syndromy chromozomální instability apod.). Strukturní přestavby mohou mít podklad ve vnějších i vnitřních faktorech. Vnější faktory zahrnují radiační, ionizující a ultrafialové záření či chemické látky s klastogenními účinky. Endogenní vlivy nejčastěji představují radikály či restrikční enzymy (Kasparek a Humphrey 2011). Opravy chromozomálních zlomů zajišťují dva hlavní procesy: homologní rekombinace (HR – *homologous recombination*) a nehomologní spojení konců (NHEJ – *non-homologous end-joining*). Výběr reparačního procesu závisí na fázi buněčného cyklu – HR probíhá v S a G2 fázi, NHEJ v G0, G1 a brzké S fázi (Bohgaki *et al.* 2010).

HR, jakožto reparativní proces, závisí na intaktním homologním vlákně DNA, které užívá jako templát. Tímto templátem obvykle bývá sesterská chromatida. Postup opravy započíná iniciací HR přítomností zlomu, přičemž dochází k nukleolytickému štěpení vláken ve směru 5´→3´ a vytvoření jednořetězcových přesahů s 3´OH konci. Následuje invaze řetězce do homologní sekvence DNA a formace D-smyčky. Poté se prodlužuje invadující vlákno od 3´OH pomocí DNA polymerázy. Po opravné syntéze druhého vlákna podle sekvence D-smyčky se zformuje Hollidayova struktura. V závěru dochází ke štěpení struktury za vzniku rekombinovaných a nerekombinovaných produktů (Filippo *et al.* 2008).

HR byla dlouho považována za tzv. „*error free*“ mechanismus, ale v posledních letech byla předložena řada důkazů hovořící o opaku. Jedním příkladem, variantou HR, je zlomem indukovaná replikace (BIR – *Break-induced replication*). V průběhu procesu BIR dochází k invazi jednoho řetězce DNA do homologní sekvence, podle jejíž předlohy se řetězec dále replikuje. Využívané homologní sekvence jsou obvykle lokalizovány na sesterské chromatidě či homologním chromozomu. V některých případech dochází k invazi do sekvencí nehomologního chromozomu vykazující podobnost na základě přítomnosti repetitivních úseků. V takovém případě BIR vede ke vzniku nereciprokých translokací (Filippo *et al.* 2008). Dalším problémem BIR je samotná replikace. Ta pokračuje do té doby, dokud není templátové vlákno samo přerušeno zlomem nebo dokud se replikace nedostane do oblasti telomer, případně centromery. Procesem BIR tak může být zreplikováno i celé raménko homologního chromozomu, což může vyústit ve ztrátu heterozygozity daného úseku (Kasparek a Humphrey 2011).

Druhý ze dvou hlavních mechanismů podílejících se na opravě dvouřetězcových zlomů je nehomologní spojení konců neboli NHEJ. Tento proces se podílí na řadě dalších fyziologických dějů například na V(D)J rekombinaci B a T lymfocytů. Z tohoto důvodu mutace NHEJ komponent zapříčiňují těžké kombinované imunodeficience senzitivní na radiační záření (Schwarz *et al.* 2003).

Proces NHEJ iniciuje tzv. Ku protein asociující s oběma konci dvouřetězcového zlomu, jež následně přitáhne DNA dependentní proteinkinázu, která jednak umožní rozpoznání konců DNA, jednak hraje aktivní roli při formaci synaptického komplexu držícího oba konce ve vzájemné blízkosti a zároveň specificky fosforyluje proteiny účastnící se dalších dějů. Následujícím krokem je vytvoření komplementárních konců pomocí DNA polymeráz, terminálních deoxynukleotidyltransferáz, polynukleotidkináz a nukleáz, zajišťující přidání či odebrání nukleotidů na jednotlivých řetězcích. Poslední krok, ligaci komplementárních konců DNA, katalyzuje specifická ligáza (Weterings a Chen 2007). Schéma tohoto procesu je uvedeno na obrázku 2.1.b.

2.6.2 Nealelní homologní rekombinace

Nealelní homologní rekombinace (NAHR – *Non-allelic homologous recombination*) je nejčastější mechanismus zapříčiňující vznik strukturních přestaveb, a to během meiózy i mitózy (Shaw a Lupski 2004). NAHR v zárodečné buňce, která po oplození dá vzniknout embryu, zodpovídá za manifestaci genetické poruchy. NAHR během mitotického dělení

buňky vede k somatickému mozaicismu. Takový somatický mozaicismus byl popsán u některých typů nádorů, ale i u zdravých lidí v krevních buňkách. Místa vzniku představují segmenty o extrémně vysoké podobnosti představované nejčastěji dvěma regiony *low-copy repeats* neboli LCR (Gu *et al.* 2008).

LCR jsou segmenty DNA o rozsahu 10 – 300 kb sdílející až 97 % své sekvenční identity. Právě tato vysoká podobnost LCR úseků může vyústovat v situaci, tzv. „*misalignment*“, při níž nealelní kopie LCR umístěné ve své těsné blízkosti podstupují *crossing over*, jenž způsobí chromozomální přestavbu, obvykle deleci či duplikaci úseku nacházejícího se mezi nimi (Gu *et al.* 2008). Podle počtu zúčastněných chromozomů a orientace LCR vzniká určitá chromozomální aberace. Interchromatidová a interchromozomální přestavba daná NAHR mezi LCR v přímé orientaci má za následek duplikace a delece, zatímco intrachromatidové přestavby vedou pouze k delecím (Gu *et al.* 2008). Jestliže jsou LCR vzájemně invertované, vznikají inverze a NAHR mezi dvěma chromozomy může vyústit v translokace (Shaw a Lupski 2004). Schéma procesu NAHR je uvedeno na obrázku 2.1.a.

Proces NAHR byl popsán mimo jiné jako příčina somatického mozaicismu delece genu NF 1 (*neurofibromin gene*) u neurofibromatózy typu 1, kdy dochází k NAHR během postzygotického mitotického dělení. U pacientů s mozaikou byly popsány projevy choroby, které se vyjadřovaly v menší míře (Messiaen *et al.* 2011).

2.6.3 Nehomologní spojení konců

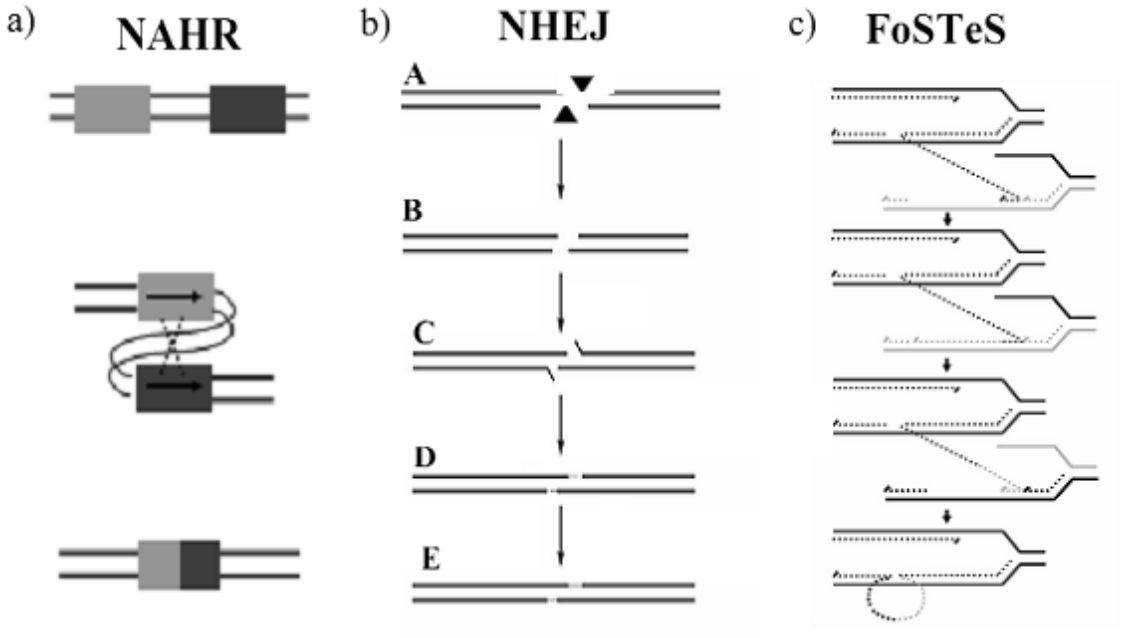
Proces NHEJ je jeden z mechanismů využívaných eukaryotickými buňkami pro opravu dvouřetězcových zlomů, nicméně zároveň se jedná i o druhý nejčastější mechanismus zodpovědný za vznik strukturních aberací (Gu *et al.* 2008). V případě poruchy NHEJ, dochází k náhradě tohoto procesu alternativními mechanismy NHEJ. Tyto procesy byly popsány u hematologických malignit a malignit vyvstávajících z mesenchymálních tkání (Kasparek a Humphrey 2011). Za fyziologických podmínek jsou potlačovány Ku proteinem, jenž hraje roli v počátečních fázích NHEJ, kdy rozpoznává konce dvouřetězcových zlomů, s nimiž následně asociuje (Bennardo *et al.* 2008).

Ačkoli alternativní mechanismy NHEJ nejsou specificky spojeny s určitými motivy DNA, jako je NAHR s LCR úseky, mohou být asociovány například s Alu sekvencemi. Nicméně není bezpodmínečně nutné, aby sekvence vykazovaly vzájemnou identitu, což mimo jiné vyplývá i z publikace českých autorů specifikující chromozomální přestavby zapříčiňující

familiární hypercholesterolemii (Goldmann *et al*. 2010). V této práci byla NHEJ příčinou delece i duplikace genu kódujícího LDL receptor.

2.6.4 FoSTeS (*Fork stalling and template switching model*)

Podle modelu FoSTeS dojde k chromozomální přestavbě při replikaci DNA, jež se pozdrží na základě nestability vyvstávající například z přítomnosti LCR sekvencí. Během této prodlevy dojde k uvolnění opožďujícího řetězce a jeho invazi do vedlejší replikačně aktivní vidličky. Další prodlužování invadujícího řetězce probíhá na základě jeho vzájemné mikrohomologie s odpovídajícím templátovým řetězcem „napadené“ replikační vidličky, z níž se může rovněž během krátké doby opětovně uvolnit. Celý proces se tak může posléze opakovat (Lee *et al.* 2007). Model je znázorněn na obrázku 2.1c. Na rozdíl od procesů NAHR a NHEJ se tak jedná o mechanismus závislý na replikaci a oproti NAHR, obdobně jako NHEJ, není závislý na určitých sekvenčních motivech DNA, i když jej stimulují. V případě, že vlákno invaduje do vidličky orientované za replikačním místem, z kterého pochází, vzniká duplikace, v opačném případě je výsledkem delece. Dané přestavby mohou být v přímé i invertované orientaci (Gu *et al.* 2008).



Obr. 2.1. Schéma procesů nealelní homologní rekombinace (NAHR), nehomologní spojení konců (NHEJ) a *fork stalling and template switching model* (FoSTeS). a) Schéma NAHR představuje rekombinaci mezi lokusy s vysokou homologií, během níž dochází ke ztrátě úseku nacházejícího se mezi nimi. b) Schéma NHEJ naznačuje nejprve tvorbu dvouřetězcových zlomů (A), jež po detekci (B) iniciují NHEJ. Po vytvoření molekulárního přemostění zajišťovaného Ku proteinem (C) dochází k úpravě detekovaných konců zlomů (D). Nakonec jsou upravené konce spojeny ligací (E). c) Model FoSTeS naznačuje způsob opakované invaze vláken do sousední replikačně aktivní vidličky, podle níž dochází k dalšímu prodlužování invadujícího řetězce. V posledním kroku schématu je patrná duplikace v regionu, z něhož se opakovaně uvolňoval opožďující řetězec. Převzato a upraveno z (Gu *et al.* 2008).

2.7 Příklady strukturních aberací v mozaice

Doposud byla odhalena celá řada strukturních abnormalit. I přestože byly některé vrozené odchylky popsány rovněž v mozaikové formě (např. Halder *et al.* 2008), jedná se zpravidla o ojedinělé případy. Strukturní přestavby v mozaice jsou jako celek vzácné (Kouru *et al.* 2011). Z tohoto důvodu budou v následujícím textu podrobněji rozebrány strukturní aberace asociované s již probíranými aneuploidiemi, konkrétně Downovým a Turnerovým syndromem, jakožto zástupci klinických jednotek s vyšší populační frekvencí. Dále zde bude v obecné rovině nastíněna problematika markerů. Tato široká skupina strukturních abnormalit vykazuje mozaicismus až u celé poloviny případů (Liehr *et al.* 2010).

2.7.1 Downův syndrom, mozaicismus a strukturní odchylky

Downův syndrom, jeho fenotyp a obvyklejší příčiny byly nastíněny v kapitole 2.4.1, v této části budou ve stručnosti probírány strukturní aberace v mozaice asociované s tímto syndromem. Jejich výskyt je méně častý. Strukturní abnormality zapříčiňují asi 5 % případů a mozaicismus vykazují pouze 2 – 4 % pacientů z celkového počtu diagnostikovaných (Brisset *et al.* 2003), ale vzhledem k prevalenci tohoto postižení, byly popsány četné kazuistiky. Nalézané strukturní aberace zahrnují nebalancované Robertsonské translokace, izochromozomy, kruhové chromozomy a markery. Tyto abnormality vedou k různému rozsahu parciální trizomie, a tudíž i k variabilitě projevů daného syndromu.

Robertsonské translokace obecně vznikají fúzí dvou akrocentrických chromozomů, u nichž došlo k odtržení krátkých ramének. Nejčastěji nalézané nebalancované Robertsonské translokace u Downova syndromu vznikají mezi dvěma chromozomy 21 a mezi chromozomem 21 a 14, a to přibližně u stejného počtu pacientů. I přes nízkou incidenci translokačních forem v mozaice bylo doposud popsáno několik případů, u nichž bylo zaznamenáno více buněčných linií s odlišnými přestavbami akrocentrů. Část pacientů vykazovala ve svém karyotypu navíc i linii s normální chromozomovou konstitucí. Každý z doposud osmi referovaných pacientů tak nesl minimálně jednu linii s balancovanou Robertsonskou translokací a linii s nadpočetným chromozomem 21 zahrnutým ve strukturní přestavbě (Bandyopadhyay *et al.* 2003). Přestavba druhé buněčné linie musí být, kvůli zjištění, zda se jedná o Robertsonskou translokaci nebo o izochromozom, dourčena molekulární analýzou. Pomocí analýzy DNA polymorfních markerů bylo prokázáno, že větší podíl aberací druhé buněčné linie představují izochromozomy (Brisset *et al.* 2003). Na

podkladě Robertsonské translokace i izochromozomu může vznikat kruhový chromozom, jenž představuje další typ přestavby asociované s Downovým syndromem v mozaice. Takový případ byl popsán například v rámci studie z roku 1992 (McGinniss *et al.* 1992). Daný pacient vykazoval v přibližně 88 % zastoupení přítomnost kruhových chromozomů různého rozsahu, u nichž došlo, zřejmě na podkladě výměny sesterské chromatidy, k duplikaci kritického úseku 21q11.2. Parciální trizomie zapříčinala, že pacient vykazoval specifický fenotyp Downova syndromu, i když ne v plné šíři. Obecná charakteristika markerů bude popsána v dalším textu.

2.7.2 Turnerův syndrom, strukturní aberace a mozaicismus

Základní charakteristika Turnerova syndromu včetně jeho fenotypu byla uvedena v kapitole 2.4.2. Referované strukturní aberace v karyotypu pacientek zahrnují izochromozomy, kruhové chromozomy a markery, které vedou k různému rozsahu parciální trizomie. Tyto strukturní odchylky mající vztah k projevům daného syndromu musí být u přeživších vždy v mozaice, pokud platí hypotéza vyslovená v roce 1983. Daná hypotéza říká, že všechny přeživší pacientky s Turnerovým syndromem jsou ve skutečnosti mozaikami (Hook a Warburton 1983).

Kruhové chromozomy představují strukturní odchylky nalézané přibližně u 2 – 11 % případů Turnerova syndromu. Tyto aberace, zvláště pokud jsou v mozaice, mohou vést k menšímu rozvoji patologického fenotypu, přčemž některé pacientky vykazují normální vývoj pohlavních orgánů a fertilitu. V takovém případě je možné, aby pacientka otěhotněla a porodila dítě, případně přenesla danou odchylku do další generace (Uehara *et al.* 1997). Fenotyp asociovaný s kruhovými chromozomy vyplývá z jejich zastoupení, velikosti a obsahu transkripčně aktivního genu XIST. Dostatečně velký kruhový chromozom, který podstupuje proces lyonizace, bývá asociován s typickým fenotypem Turnerova syndromu, zatímco malý kruhový chromozom či kruhový chromozom, který neobsahuje aktivní gen XIST, bývá sdružován s těžším fenotypem. Tento fenotyp je zcela netypický – pacientky vykazují mentální retardaci, syndaktylii, polydaktylii či dysmorfické faciální rysy (Matsuo *et al.* 2000, Leppig *et al.* 2004). U některých pacientek hrozí vznik nádorů v souvislosti s přítomností kruhového chromozomu odvozeného z chromozomu Y (Shchelochkov *et al.* 2008).

Izochromozomy Xq tvoří až 15 % cytogenetických nálezů u Turnerova syndromu, přičemž většina izochromozomů nese dvě centromery. Na základě těchto poznatků se všeobecně usuzuje, že nejčastější mechanismus vzniku zahrnuje vytvoření zlomů s následným sloučením chromatid a pozdější inaktivací jedné z centromer. Opačný případ, aktivita obou

centromer, by vedla k mitotické nestabilitě izochromozomu a vzniku fragmentů chromozomu X (James *et al.* 1997, Wolff *et al.* 1996). Podle novějších poznatků se na formaci izochromozomů Xq může podílet i proces NAHR, a to na podkladě palindromů či repetitivních sekvencí, nebo mechanismy závislé na replikaci FoSTeS a BIR, které jsou iniciovány na základě přítomnosti regionů vykazující mikrohomologii (více viz Koumbaris *et al.* 2011). Izochromozomy Xq byly popsány i u některých pacientů s Klinefelterovým syndromem, a to rovněž i v mozaice (Arps *et al.* 1996).

2.7.3 Malé nadpočetné marker chromozomy, jejich vznik a mozaicismus

Malé nadpočetné marker chromozomy jsou definovány jako strukturně abnormální chromozomy menší než chromozom číslo 20 stejné chromozomové sady, jež zpravidla nemohou být identifikovány konvenčními pruhovacími technikami. Obvykle jsou nadpočetné vůči normální karyotypové sadě, méně často pak vůči sadě nesoucí numerickou či strukturní balancovanou aberaci. Mohou být dědičné nebo naopak vyvstávat *de novo*, a to z gonozomů i autozomů, přičemž jejich velikost a fenotypový projev se značně různí. Markery se rozlišují celkem do pěti tříd podle obsahu organizátorů jadérka, centromerických oblastí a strukturních přestaveb. Dále se užívá hrubší dělení na markery derivované z akrocentrických a non-akrocentrických chromozomů (Liehr a Weise 2007, Liehr *et al.* 2004).

Při utváření marker chromozomů se jednak uplatňují mechanismy, jež už byly popsány (tj. *aneuploidy rescue*, postfertilizační chyby apod.) a jednak mechanismy, které jsou typické pro jednotlivé třídy. Markery s invertovanou duplikací vznikají na pozadí chybného *crossing overu*, tzv. U-typu výměny mezi homologními chromozomy. Neocentrické chromozomy vychází rovněž z U-typu výměny, nicméně na rozdíl od markerů s invertovanou duplikací neobsahují detekovatelnou alfa-satelitní DNA, namísto níž vzniká struktura tzv. neocentromery. Tato struktura plní funkci centromery a umožňuje jejich přechod v rámci mitózy. Malé nadpočetné kruhové chromozomy se formují třemi způsoby. Za prvé, na základě delece nebo komplexní přestavby chromozomu, díky níž se vytváří dicentrický chromozom. Z tohoto dicentrického chromozomu se po excizi jedné centromery vytváří fragment, který se následně zacyklí v *ring*. Druhá cesta vzniku opět využívá U-typ výměny. Třetí způsob pak zahrnuje degradaci obou ramen chromozomu až na malý fragment nesoucí centromeru, jenž po zacyklení vytváří malý kruhový chromozom nebo (bez zacyklení) další typ markeru tzv. *minute*. Markery s komplexní přestavbou jsou derivované z většího počtů

chromozomů na základě balancovaných reciprokých či Robertsonkých translokací, které navozují poruchy segregace chromozomů a genezi markerů během meiózy (Liehr *et al.* 2004).

Jak zřejmě vyplývá z výše uvedeného textu, markery mohou mít původ v rámci mitotického dělení v různé fázi vývoje a jsou tak zodpovědné za somatický mozaicismus nebo jsou přenášeny skrze gamety, u nichž jejich přítomnost vyplývá z ojedinělé chyby meiotického dělení či z mozaicismu zasahující zárodečné tkáně. Podobně jako u mozaicismu čítajícího numerické aberace může dojít u embrya původně nesoucího marker ve všech svých buňkách například k mitotické nondisjunkci a utvoření dvou buněčných linií – linie s markerem a bez něho. Podle Liehra a jeho kolegů (Liehr *et al.* 2010) vykazuje mozaicismus až 52 % pacientů s tím, že poměr zastoupení kolísá v závislosti na tom, zda se jedná o markery odvozené z akrocentrických nebo non-akrocentrických chromozomů – z 28 % na 82 %. Přítomnost mozaicismu v jednotlivých tkáních se podílí na fenotypovém projevu.

Podmíněný fenotyp je velmi různorodý, pohybuje se od zcela normálního až po těžké postižení (např. Pallister – Killianův syndrom). Velmi hrubou představu o míře postižení pacientů poskytují data ze studie zahrnující 137 pozitivních případů, z nichž u 47 % byla stanovena diagnóza již prenatálně, u 37 % postnatálně na základě abnormálního fenotypu a u 7 % pacientů v dospělosti kvůli poruchám reprodukce (zbývajících 9 % z jiných důvodů) (Crolla *et al.* 2005). Obecně to, jak se markery promítají do výsledného fenotypu a jestli se vůbec promítají, závisí na přítomnosti genů v jeho struktuře, již zmiňovaném mozaicismu a dědičnosti, respektive *de novo* vzniku (Bartsch *et al.* 2005). Poslední faktor, dědičnost, souvisí s dvěma aspekty – s vyšším věkem matky a uniparentální dizomií. Prokázaný *maternal age effect* se opět projevuje asociací vyššího věku matky a nálezu markeru u jejího potomka, přičemž některé studie tuto spojitost považují za všeobecnou (Hook a Cross 1987), zatímco jiné za specifickou pouze pro určitý marker. Konkrétně Crolla se svým týmem (Crolla *et al.* 2005) tuto spojitost nalezl pouze pro marker derivovaný *de novo* z chromozomu 15, jenž bez ohledu na načasování vzniku tvoří 30 – 50 % podíl ze všech diagnostikovaných markerů (Kotzot 2002). Nicméně, kvůli časté přítomnosti samotného heterochromatinu, jeho nositelé obvykle nevykazují abnormální fenotyp, i když u části případů existuje reálné riziko uniparentální dizomie projevující se Prader – Williho či Angelmanovým syndromem (Robinson *et al.* 1993). Existenci tohoto rizika potvrzuje i studie (Kotzot 2002), která uvádí, že do roku 2002 bylo publikováno celkem 19 případů markerů asociovaných s uniparentální dizomií. Z nich 8 pacientů mělo Prader – Williho syndrom a 3 pacienti měli Angelmanův syndrom, právě jako následek přítomnosti nadbytečného markeru derivovaného z chromozomu 15 obsahující daný kritický region. Abnormální fenotyp, zapříčiněný

uniparentální dizomií nalézaný i u markerů odvozených od jiných chromozomů (např. z chromozomů 6, 7, 14, 16 a 20), je dán duplikací genů, poruchami imprintingu nebo výskytem recesivních alel (Robinson *et al.* 1993).

2.8 Metodické možnosti stanovení mozaicismu

Tato kapitola přináší přehled o metodách užívaných v diagnostice numerických i strukturních aberací. Spíše než na popis jednotlivých metod se text zaměřuje na praktické využití analýz a problémy s nimi spojenými, a to se zřetelem k oblasti diagnostiky mozaicismu.

2.8.1 Základní cytogenetické vyšetření – G-pruhování

Základní cytogenetické vyšetření metodou G-pruhování je v současné době stále považováno za jeden ze "zlatých standardů" diagnostiky. Tato metoda přes svou jednoduchost umožňuje získat celkový pohled na karyotyp, což má význam pro určení numerických a strukturních aberací v balancované i nebalancované formě (Vialard *et al.* 2011). Na druhou stranu G-pruhování má i své limity. Velký problém představuje potřeba předchozí kultivace materiálu, která zvláště u prenatálních vyšetření zabere příliš mnoho času (např. vzorky získané amniocentézou vyžadují minimálně dvoutýdenní kultivaci). U vzorků s aberacemi v mozaice může během kultivace dojít k preferenci či ke ztrátě jedné buněčné linie projevující se ve výsledku změnou poměrů zastoupení buněčných linií. Rozlišovací schopnost je rovněž limitována. V závislosti na počtu zhodnocených mitóz nemusí být nízkofrekvenční mozaiky vůbec zachyceny (Cheung *et al.* 2007, Ballif *et al.* 2006). Stejně tak nemusí být zachyceny strukturní aberace o rozsahu menším než 5 – 10 Mb. Tato metoda také neumožňuje rozeznat například kryptické subtelomerické aberace či některé malé markery, zejména ty, které nesou malé množství euchromatinu (Shaffer a Bui 2007).

2.8.2 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

FISH je molekulárně cytogenetická metoda založená na aplikaci krátkých jednořetězcových fragmentů nukleových kyselin (sond) přímo na vyšetřovaný materiál. Podle způsobu detekce se rozlišují přímo a nepřímo značené fluorescenční sondy. Přímo značené

sondy jsou konjugovány s fluorochromem, nepřímo značené sondy s haptenem, který musí být následně detekován protilátkou s navázaným fluorochromem. Sondy na základě sekvenční homologie specificky hybridizují s hledanou sekvencí a tím umožňují její vizualizaci. Chybějící signál sondy představuje deleci konkrétního regionu či struktury, amplifikovaný signál pak vypovídá o duplikaci regionu, respektive výskytu nadpočetné struktury (Kočárek 2007).

V dnešní době existuje mnoho modifikací této metody, které pokrývají široké spektrum nejrůznějších aplikací (Volpi a Bridger 2008), přičemž FISH lze, na rozdíl od základního cytogenetického vyšetření, využít i k vyšetření nekultivovaného materiálu, alespoň v případě, že nejsou užity malovací sondy. FISH umožňuje i diagnostiku balancovaných strukturních aberací a identifikaci markerů, přičemž minimální rozlišovací schopnost odpovídá přibližně 80 – 200 kb (Shaffer a Bui 2007).

2.8.3 Array CGH

Alternativa komparativní genomové hybridizace, technika array CGH, stojí na principu kompetice dvou rozdílně značených řetězců DNA, tj. vyšetřované a referenční DNA, o vazbu na řetězce sond o známých sekvencích uchycených na pevný povrch. Sondy mohou být představovány oligonukleotidovými řetězci o rozsahu 25 – 85 pb či umělými bakteriálními chromozomy (BAC) o rozsahu 80 – 200 kb (Shaffer a Bui 2007).

Tato metoda umožňuje zachycení numerických i strukturních abnormalit v celé šíři genomu, a to i v mozaice. Podle Scotta a jeho kolegů je tato metoda za určitých podmínek schopna zachytit nízkofrekvenční mozaicismus odpovídající 10 % zastoupení aneuploidních buněk a 20 – 30 % zastoupení buněk se strukturními aberacemi (více viz Scott *et al.* 2010). Velkou výhodou array CGH je velmi přesná analýza nebalancovaných strukturních odchylek a jejich rozsahu (Shaffer a Bui 2007). Oproti cytogenetickým metodám, G-pruhování a případně i FISH, představuje výhodu přímá analýza ze vzorku izolované DNA (Cheung *et al.* 2007). Array CGH má rovněž své limity. Nerozliší balancované přestavby typu reciprokých translokací či inverzí a polyploidii (Scott *et al.* 2010). Některé práce vyzdvihují jako nevýhodu vysokou senzitivitu array CGH, a to zvláště pro oblast prenatální diagnostiky (Vialard *et al.* 2011).

2.8.4 Kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce (QF-PCR)

Metoda QF-PCR umožňuje stanovení aneuploidií na základě detekce vybraných sekvencí STR (*short tandem repeat* – STR). Sekvence STR jsou amplifikovány a fluorescenčně značeny pomocí PCR, přičemž výsledný produkt je nakonec rozdělen pomocí kapilární elektroforézy. Dva píky se stejnou plochou představují dvě alely STR vybraného regionu. Tři píky se stejným poměrem ploch 1:1:1 či dva píky s poměrem ploch 2:1 značí parciální trizomii lokusu. V případě, že všechny STR jednoho chromozomu, respektive všech chromozomů vykazují parciální trizomii, svědčí to o trizomii chromozomu, respektive o triploidii (Cirigliano *et al.* 2004).

Analýza pomocí QF-PCR se v dnešní době užívá pro detekci aneuploidií chromozomů 13, 18, 21 a obou gonozomů. Mezi její výhody patří malá časová náročnost, nízká cena, zjištění meiotického/mitotického původu trizomie (poměr ploch píků 1:1:1, resp. 2:1) a možnost rozlišení maternální kontaminace v prenatálních vzorcích získaných invazivními odběry. QF-PCR umožňuje rovněž zachytit aneuploidie v mozaice, pokud se vyskytují s frekvencí vyšší než 15 % (Mann *et al.* 2012a). Tato metoda má omezenou výpovědní hodnotu v závislosti na množství a umístění vyšetřovaných STR. Nevýhodou je i nízká výpovědní hodnota v oblasti strukturních abnormalit (Shaffer a Bui 2007).

2.8.5 *Multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA)

Metoda MLPA umožňuje vyšetření většího počtu regionů pomocí unikátních párů sond, přičemž každý z těchto párů je specifický pro konkrétní lokus. Obě sondy z páru se skládají z komplementární sekvence k vyšetřovanému regionu a univerzální sekvence pro primer. Jedna sonda navíc obsahuje specifickou sekvenci o definované délce. Tento pár sond je, po nasednutí na vyšetřovanou DNA do své těsné blízkosti, propojen ligací a následně amplifikován pomocí PCR. Poslední fázi analýzy zahrnuje dělení PCR produktů kapilární elektroforézou.

V dnešní době má MLPA široké uplatnění v detekci aneuploidií a delecí či duplikací konkrétních genů, které představují minimální kritické regiony mikrodelečních syndromů nebo subtelomerických aberací. Výhody této metody jsou hlavně nízká cena a automatizace. Nevýhody odráží omezení v oblasti diagnostiky strukturních aberací a neodlišení mozaicismu s frekvencí nižší než 40 % (Shaffer a Bui 2007, Van Veghel-Plandsoen *et al.* 2011). Na rozdíl od QF-PCR neodliší triploidii (Mann *et al.* 2012b).

2.8.6 *BACs-on-Beads™* (BoBs™)

Tato analýza využívá několik desítek rozdílně značených polystyrénových kuliček. Každá kulička má na svém povrchu navázanou specifickou část DNA získanou z umělého bakteriálního chromozomu, jenž odpovídá konkrétnímu vyšetřovanému regionu. Současně obsahuje určitý poměr koncentrací dvou fluorochromů (červeného a infračerveného). Po provedení značení vyšetřované DNA pomocí streptavidinu následuje smíchání suspenzí a hybridizace vyšetřované DNA s DNA na kuličkách. Poté se přidá fykoerytrin. Nakonec se snímají signály jednotlivých fluorochromů. Jednak se tím identifikuje kulička a jednak množství navázané DNA se systémem streptavidin-fykoerytrin. Výsledek pak představují poměry mezi změřenými a referenčními hodnotami (Vialard *et al.* 2011, Cheng *et al.* 2013).

Pomocí BoBs™ lze podobně jako v případě metody MLPA analyzovat numerické aberace a delece či duplikace konkrétních lokusů, přičemž časová náročnost BoBs™ by měla být menší. Tato metoda nedetekuje triploidii. Diagnostika mozaicismu je možná pouze u mozaicismu s frekvencí aneuploidních buněk vyšší než 20 – 30 %, respektive frekvencí vyšší než 20 – 40 % u mikrodelečních syndromů (Vialard *et al.* 2011, Cheng *et al.* 2013). Cena samotného vyšetření by měla odpovídat metodám MLPA a QF-PCR. Podobně jako MLPA i BoBs™ má problém s maternální kontaminací prenatálních vzorků (Mann *et al*. 2012a).

3 Cíle práce

1) Posoudit možná omezení molekulárně cytogenetické diagnostiky vyplývající z mozaicismu na základě teoretických i praktických poznatků z této oblasti.

2) Určit relevanci, popř. upřesnit výpovědní hodnotu metody FISH při diagnostice mozaicismu.

3) Analyzovat možné výhody a nevýhody metody FISH.

4) Určit případné kritické faktory negativně ovlivňující vlastní odečet preparátů a následně také interpretaci výsledků. Posoudit konkrétní možnosti jejich minimalizace.

4 Materiál a metody

4.1 Soubor pacientů

Soubor vyšetřovaných (tabulka 4.1) zahrnuje celkem 29 pacientů s numerickými nebo strukturními aberacemi autozomů či gonozomů v prokázané nebo suspektní mozaice. Všichni pacienti byli indikováni k molekulárně cytogenetické analýze metodou FISH na Ústavu lékařské biologie a genetiky 2. lékařské fakulty a fakultní nemocnice Motol (ÚBLG). Zpravidla této indikaci předcházelo vyšetření karyotypu metodou G-pruhování. Tři pacienti s označením VIII, IX a XIV byli indikováni i k analýze pomocí array CGH.

Tab. 4.1. Soubor pacientů. Použité zkratky: Ž – žena, M – muž. Věk je uveden v letech.

Pacient	Pohlaví	Věk	Důvod indikace	Výsledky G-pruhování
I	Ž	6	Suspektní Turnerův syndrom	45,X/47,XXX
II	Ž	26	Suspektní Turnerův syndrom	45,X
III	Ž	14	Suspektní Turnerův syndrom	45,X/46,XX
IV	Ž	10	Potvrzení nálezu G-pruhování	46,XX
V	Ž	16	Virilizace, zvýšené hladiny testosteronu	46,XX
VI	Ž	Plod	Vysoký věk matky v době těhotenství	46,X,der(X)(p?11.22q?12)[9] /45,X[3]/46,XX[38]
VII	Ž	63	Stenóza aorty, gravidita dcery	45,X[14]/46,XX[6]
VIII	Ž	37	Infertilita, poruchy reprodukce	45,X[10]/46,XX[10]
IX	Ž	Plod	Vysoký věk matky v době těhotenství	47,XX,+mar/46,XX
X	Ž	38	Indikována v souvislosti s pac. IX – matka	46,XX
XI	M	38	Indikován v souvislosti s pac. IX – otec	46,XY
XII	Ž	10	Malý vzrůst, podezření na Turnerův syndrom	Prenatálně stanovený karyotyp 45,X[5]/46,XX[32]
XIII	Ž	13	Malý vzrůst, suspektní Turnerův syndrom	45,X[4]/46,XX[16]
XIV	M	6	Deformita předloktí	46,XY
XV	Ž	33	Indikována v souvislosti s pac. XIV – matka, podruhé gravidní	46,XX
XVI	M	31	Indikován v souvislosti s pac. XIV – otec	46,XY
XVII	M	13	Lehká mozková dysfunkce, hyperaktivita	46,XY
XVIII	M	3	Předešlý záchyt mozaicismu, potvrzení nálezu	47,XY,+21[31]/45,X[69](krev) 47,XY,+21[13]/45,X[52](kůže)
XIX	Ž	45	Neplodnost, poruchy reprodukce	47,XXX[2]/46,XX[18]
XX	Ž	5	Projevy autismu	47,XX,+mar[16]/46,XX[24]
XXI	Ž	4	U dcery zachycena blíže nespecifikovaná Robertsonská translokace	46,XX
XXII	Ž	52	Prekoncepce dcery, samovolný potrat, hluchota v rodině	45,X[3]/47,XXX[1]/46,XX[32]
XXIII	Ž	27	Suspektní Turnerův syndrom	Karyotyp není dostupný
XXIV	Ž	31	Poruchy reprodukce	46,XX

XXV	Ž	6	Malý vzrůst, podezření na Turnerův syndrom	45,X[12]/47,XXX[9]
XXVI	Ž	4	Suspektní Turnerův syndrom	45,X[16]/46,X,i(X)(q10)[4]
XXVII	M	33	Indikace z jiného pracoviště	Karyotyp není dostupný
XXVIII	Ž	15	Suspektní Turnerův syndrom	Karyotyp není dostupný
XXIX	Ž	43	Poruchy reprodukce	45,X[8]/46,XX[12]

U každého postnatálně indikovaného pacienta se připravil a odečetl nejméně jeden preparát ze vzorku periferní krve s kombinací většího počtu sond. Dva pacienti byli indikováni k vyšetření v prenatálním období. U pacienta VI byl analyzován vzorek získaný odběrem amniové tekutiny a u pacienta IX proběhla analýza ze vzorku pupečníkové krve.

Pro získání dat ke statistickému porovnání výsledků byly u většiny pacientů (podrobněji viz tabulka 5.1) připraveny preparáty dva. Jeden s příslušnou centromerickou sondou a druhý s kombinací lokus specifické a centromerické sondy. U pacientů s označením XVIII, XIX a XX byly vyšetřeny i vzorky z jiných tkání – bukálního stěru či kožní biopsie, což má především význam pro verifikaci nálezu daných buněčných linií.

4.2 Metoda FISH

K vyšetření metodou FISH byli indikováni všichni pacienti v souboru zpravidla po vyšetření karyotypu metodou G-pruhování na základě rozličných důvodů indikace (bližší údaje viz tabulka 4.1). K analýze byly užity lokus specifické a centromerické sondy, a to samostatně či v kombinaci. Hodnocení sond u konkrétních analýz je uvedeno v tabulce 5.7. Souhrnné hodnocení sond na základě užitého fluorochromu prezentuje tabulka 5.8, respektive tabulka 5.9. K provedení vlastního pokusu jsem měla k dispozici suspenzi buněk ve fixačním roztoku získanou podle standardního operačního postupu ÚBLG, jehož základní princip je shrnut v oddíle 4.2.4. Uvedený pracovní protokol je obecně platný, některé firmy (např. firma MetaSystems) postup zjednodušují.

4.2.1 Sondy pro analýzu FISH

K jednotlivým vyšetřením byly využívány lokus specifické a centromerické sondy. Základní přehled o použitých sondách podává tabulka 4.3. Region u subtelomerických sond je specifikován vzdáleností od telomery. Bližší informace jsou přístupné v katalozích jednotlivých výrobců. Kromě těchto sond byla u pacienta IX užita i směs sond pro

centromerickou mFISH od firmy MetaSystems. Specifikace značení sond je uvedena v tabulce 4.2.

Tab. 4.2. Fluorochromy a jejich emisní a excitační spektra.

Fluorochrom	**Zkratka**	**Excitační spektrum**	**Emisní spektrum**
Diethylaminocoumarin	DEAC	445 nm	482 nm
Fluorescein izothiokyanát	FITC	488 nm	520 nm
Texas red	TR	595 nm	620 nm
SpectrumOrange	SpO	559 nm	588 nm
SpectrumGreen	SG	497 nm	524 nm
PlatinumBright495	---	495 nm	525 nm
PlatinumBright550	---	546 nm	580 nm

Tab. 4.3. Specifikace užitých sond. Použité zkratky: Cent. – Centromera, ch. – chromozom, LSI – locus specific identifiers (lokus specifický identifikátor), DEAC – Diethylaminocoumarin, FITC – Fluorescein izothiokyanát, TR – Texas red, SpO – SpectrumOrange, SG – SpectrumGreen.

Zobrazovaný úsek	**Lokus**	**Region**	**Fluorochrom**	**Výrobce**	**Pacient**
Cent. ch. X	DXZ1	Xp11.1-q11.1	FITC	Cytocell	I, II, III, IV,
Cen. ch. Y	DYZ3	Yp11.1-q11.1	TR		IV,V,VIII
Cent. ch. X	DXZ1	Xp11.1-q11.1	FITC	Cytocell	XXIII, XXIV,
Cent. ch. Y	DYZ3	Yp11.1-q11.1	TR		XXV,XXVI,
Cent. ch. 18	D18Z1	18p11.1-q11.1	DEAC		XXVIII,XXIX
Cent. ch. X	DXZ1	Xp11.1-q11.1	DEAC	Cytocell	XII,XIII,XIX,
Yq	DYZ1	Yq12	FITC		XXI,XXII
SHOX	SHOX	Xp22.33/Yp11.2	TR		
Cent. ch. 17	D17Z1	17p11.1-q11.1	TR	Cytocell	IX
Cent. ch. 3	D3Z1	3p11.1-q11.1	TR	Cytocell	XX
Cent. ch. 13 Cent. ch. 21	D13Z1/ D21Z1	13p11.1-q11.1/ 21p11.1-q11.1	TR	Cytocell	XXVII
TUPLE1	TUPLE1	22q11.21	TR	Cytocell	XVII
N85A3	N85A3	22q13.3	FITC		
RAI1	RAI1	17p11.2	FITC	Cytocell	IX
LIS1	LIS1	17p13.3	TR		
NF1	NF1	17q11.2	TR	Cytocell	IX
17ptel	D17S2199	60 kb	FITC		
18ptel	D18S552	220 kb	FITC	Cytocell	XIV, XV, XVI
18qtel	D18S1390	290 kb	TR		
Xptel/Yptel	DXYS129	270 kb	TR	Cytocell	XXIII
Xqtel/Yqtel	DXYS61	<90 kb	FITC		
Cent. ch. X	DXZ1	Xp11.1-q11.1	SG	Abbott	I,II,III,IV,V,VII,
LSI KAL	KAL	Xp22.31	SpO		VIII,XXVIII, XXIX
LSI AR	AR	Xp12	SpO	Abbott	VII,VIII

LSI 21	D21S259 D21S341 D21S342	21q22.13-q22.2	SpO	Abbott	XVIII,XXVIII
Cent. ch. X	DXZ1	Xp11.1-q11.1	SpO	Abbott	XXIII
Cent. ch. X	DXZ1	Xp11.1-q11.1	PlatinumBright495	Kreatech	VI,VII,XXIII,
XIST	XIST	Xp13.2	PlatinumBright550		XXVI
Cent. ch. X	DXZ1	Xp11.1-q11.1	PlatinumBright495	Kreatech	VI,VII,
SHOX	SHOX	Xp22.33/Yp11.2	PlatinumBright547		XXIV,XXV
Cent. ch. 17	D17Z1	17p11.1-q11.1	PlatinumBright495	Kreatech	X
TOP2A	TOP2A	17q21.2	PlatinumBright547		
Cent. ch. 17	D17Z1	17p11.1-q11.1	FITC/SpO	MetaSystems	XI

4.2.3 Materiál a pomůcky pro FISH

Přístrojové vybavení, pomůcky a reagencie (vyjma sond) jsou přehledně uvedeny v tabulkách 4.4, 4.5 a 4.6.

Tab. 4.4. Reagencie.

Reagencie
Destilovaná voda
20x SSC (*saline sodium citrate buffer*)
Tween^{TM} 20
Ethanol 100 %
Ethanol 96 %
Ethanol 80 %
DAPI/antifade (4',6-diamidino-2-fenylindol)

Tab. 4.5. Přístrojové vybavení.

Přístrojové vybavení	**Výrobce**
NB Nüve vodní lázeň	Biotechlab, Bulharsko
Ohřívací ploténka SD 160	Stuart, Velká Británie
Vortex SA 8	Stuart, Velká Británie
Micra 18 termostat	ISCO, USA
Mikroskop BX51	Olympus, Japonsko

Tab. 4.6. Pomůcky.

Pomůcky
Automatické pipety
Gumové rukavice
Kádinky
Krycí skla
Mikrozkumavky Eppendorf
Odměrný válec
Pinzety
Podložní skla
Skleněné Hellendahlovy kyvety

4.2.4 Pracovní postup metody FISH

Zpracování vzorku

1) Preparáty lymfocytů se získávají po třídenní kultivaci periferní krve s přídavkem fytohemaglutininu. Periferní krev se pro tento účel odebírá předepsaným způsobem do zkumavky s heparinem lithným. Amniocentéza, odběr amniové tekutiny, se provádí během prvního trimestru těhotenství, konkrétně od 16. týdne. K odběru je přistupováno pouze s informovaným souhlasem. Plodová voda se kultivuje v příslušném kultivačním médiu po dobu 14 – 21 dní. Zpracování pupečníkové krve je shodné jako v případě krve periferní. Odběr se provádí od 20. týdne těhotenství opět po podepsání informovaného souhlasu. Vzorek bukálního stěru se po odběru natře na podložní sklo a zakápne fixačním roztokem (roztok methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 3:1) či se odběrová štětička promyje přímo ve fixačním roztoku, který poslouží k přípravě preparátu. Vzorek kožního štepu se po odběru vloží na Petriho misku s preparačním médiem, kde se očistí od krevních sraženin a tuku. Po preparaci se vzorek v kultivačním médiu jemně fragmentuje. Poté (po přidání většího objemu média) se tkáň ve vhodných podmínkách kultivuje.

2) Ke konci kultivace se přidá kolcemid, díky němuž dochází k zástavě buněčného cyklu v metafázi. Suspenze buněk se slije, odcentrifuguje a po vylití supernatantu se hypotonizuje 0,075 M roztokem chloridu draselného. Následně, po další centrifugaci, se buňky fixují roztokem methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 3:1.

Vlastní pracovní postup

A) Příprava preparátu

1) Suspenzi fixovaných buněk o objemu 10 µl nakapeme pipetou na střed čistého a namraženého podložního skla. Pro lepší rozprostření struktur je možné kapat vzorek z výšky. Fixační směs se poté nechá odpařit.

2) Zaschnutý preparát se zkontroluje mikroskopem ve fázovém kontrastu. Pokud má vhodnou hustotu, místo s největším počtem dobře rozvolněných mitóz a rozprostřenými jádry se ze spodní strany podložního skla označí křížem pomocí diamantového popisovače. Připravené preparáty se uchovávají v chladničce, při potřebě pozdějšího vyšetření v mrazáku při –25 °C až –20 °C.

B) Odvodnění

1) Připravíme si 50 ml čerstvého roztoku 2x SSC o pH 7 – 7,5 ze zásobního roztoku 20x SSC tak, že smícháme 5 ml zásobního roztoku s 45 ml destilované vody. Do roztoku napipetujeme 150 µl roztoku Tween^{TM} 20.

2) Preparát 2 minuty promyjeme v roztoku 2x SSC.

3) Následuje odvodnění preparátu pomocí vzestupné alkoholové řady. Preparát postupně promýváme v 80 %, 96 % a 100 % ethanolu, a to po dobu 1 minuty v každém roztoku.

4) Skla se nechají oschnout při laboratorní teplotě nebo se umístí na plotýnku předehřátou na 37 °C na dobu 5 minut.

C) Kapání sondy

V mikrozkumavce si připravíme hybridizační roztok podle pokynů výrobce. Někteří výrobci dodávají již namíchaný hybridizační roztok připravený k okamžitému použití. Poměry reagencií v hybridizačním roztoku se rovněž mohou měnit v závislosti na množství a typech užitých sond. Hybridizační roztok pak aplikujeme pipetou na plochu označenou křížem s největší koncentrací interfázních jader a rozvolněných mitóz.

D) Denaturace a hybridizace

1) Na kapku hybridizačního roztoku přiložíme krycí sklíčko. Případné bubliny jemně vytlačíme pinzetou. Poté sklíčko po stranách orámujeme vulkanizačním roztokem.

2) Preparát umístíme na plotýnku předehřátou na 37 °C na dobu 5 minut. Poté preparát přeneseme na plotýnku předehřátou na 75 °C. Při této teplotě dochází k denaturaci. Denaturační dobu 5 minut musíme dodržet přesně.

3) Preparát vložíme do předem připravené vlhké komůrky a vložíme do termostatu předehřátého na 37 °C. Doba hybridizace se liší dle typu použité sondy, preparát se obvykle ponechává v termostatu do druhého dne.

E) Odmytí nespecifických signálů

1) Nejprve si připravíme čerstvé roztoky 2x SSC o pH 7 – 7,5 a 0,4x SSC o pH 7 – 7,5 v objemech 50 ml. Roztok 2x SSC se připraví smícháním 5 ml zásobního roztoku 20x SSC s 45 ml destilované vody. Pro získání roztoku 0,4x SSC smícháme 1 ml zásobního roztoku 20x SSC a 49 ml destilované vody. Do tohoto roztoku přidáme roztok Tween^{TM} 20 o objemu 150 µl a vložíme ho do lázně předehřáté na 73 °C.

2) Vyjmeme preparát z vlhké komůrky a odstraníme z něho ztuhlý vulkanizační roztok i s krycím sklíčkem.
3) Preparát přesně na 1 minutu umístíme do roztoku 0,4x SSC a následně ho rychle přeneseme do roztoku 2x SSC na dobu 30 vteřin.

F) Nespecifické obarvení struktur preparátu

1) Na ještě vlhký preparát aplikujeme 10 µl DAPI a přiložíme krycí sklíčko. Případné bubliny odstraníme pinzetou.
2) Preparát ponecháme 10 minut v temnu.

G) Hodnocení

Pro hodnocení preparátu slouží fluorescenční mikroskop vybavený příslušnými filtry, který je propojen s počítačem a CCD (*charge coupled device*) kamerou. Pro vlastní snímání obrazu a jeho úpravu byl využit software ISIS verze 5.1 od firmy MetaSystems. Po vytvoření složky pacienta umožňuje tento program automatické snímání obrazu zorného pole a jeho další úpravy. Základní úkony zahrnují úpravu pozadí a zaostření jednotlivých signálů pomocí funkcí *Lower threshold* a *Upper threshold* a vymazání nežádoucích artefaktů pomocí funkce *Region*. Pro standardní analýzu strukturních a numerických aberací v mozaice je na každém preparátu hodnoceno nejméně 500 mitóz či interfázních jader.

4.3 Metoda array CGH

K vyšetření metodou array CGH byli indikováni tři pacienti s označením VIII, IX a XIV (bližší údaje viz tabulka 4.1). K vyšetření byl použit čip BlueGnome ISCA 8x60K verze 2.0 s minimální rozlišovací schopností 150 kb od britské firmy BlueGnome Ltd. Pracovní postup byl převzat z protokolu této firmy, konkrétně byl užit protokol *CytoChip Oligo Reference Manual* verze 1.8 s postupem odpovídající formátu čipu 8x (BlueGnome Ltd. 2012a). Pro analýzu byla použita DNA izolovaná ze vzorku periferní krve podle standardního operačního postupu ÚBLG, jenž je v krátkosti shrnut na počátku oddílu 4.3.2.

4.3.1 Reagencie, pomůcky a přístrojové vybavení pro array CGH

Potřebné reagencie, pomůcky a přístrojové vybavení pro array CGH jsou uvedeny v tabulkách 4.7, 4.8 a 4.9. Všechny uvedené reagencie kromě TE pufru, proteinkinázy K, 100 % a 70 % ethanolu jsou dodávány v kitu od výrobce, tj. od britské firmy BlueGnome Ltd. Názvy přístrojového vybavení i reagencií byly většinou ponechány beze změny, aby nevhodným překladem nedošlo k desinterpretaci.

Tab. 4.7. Reagencie.

Reagencie
TE pufr (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,0-8,0)
Proteinkináza K
3M acetát sodný (pH 5,2)
Ethanol 100 %
Ethanol 70 %
Ultrapure water
Alu I (10 U/μl)
Rsa I (10 U/μl)
10X buffer C
Acetylated BSA (10 μg/μl)
Nuclease free water
Random primers
5X buffer
10X dNTP
Cy3 dUTP
Cy5 dUTP
Exo-Klenow fragment
COT Human DNA
10X blocking agent
2X hybridization buffer (Hi-RPM)
Oligo aCGH Wash buffer 1
Oligo aCGH Wash buffer 2

Tab. 4.8. Přístrojové vybavení.

Přístroj	**Výrobce**
Hybex Microsample Incubator	SciGene, USA
NanoDrop ND 2000 spectrophotometr	Thermo Scientific, USA
PTC 100 - Peltier Thermal Cycler	MJ Research, Canada
Centrifuge 5430 R	Eppendorf, Německo
INCU-Line thermostat	VWR, Irsko
SHEL LAB Hybridization oven	Sheldon Manufacturing, USA
Microstirrer Magnetic stirrer	Velp Scientifica, Itálie
Microarray Scanner G2505C	Agilent Technologies, USA

Tab. 4.9. Pomůcky.

Pomůcky
Automatické pipety
Gumové rukavice
Magnetické míchadélko
Mikrozkumavky Eppendorf
Pinzeta
Skleněné vaničky
Stojánky na mikrozkumavky
Svorka pro čip
Stojánek na čip
Zkumavka o objemu 40 ml

4.3.2 Pracovní postup metody array CGH

Zpracování vzorku

Periferní krev pro účel izolace DNA se odebírá předepsaným způsobem do zkumavky s přídavkem činidla EDTA. Nejprve se provádí lýza erytrocytů roztokem *RBC Lysis Solution*. Následuje inkubace a centrifugace. Po slití části supernatantu se přidá roztok *Cell Lysis Solution*. Vzorek se promíchá a vysráží se proteiny pomocí roztoku *Protein Precipitation Solution*. Následuje centrifugace a odstranění supernatantu. Poté se aplikuje izopropanol, jenž vysráží přítomnou DNA. Ta se přenese do čisté zkumavky a po přečištění ethanolem se rozpustí v roztoku *DNA Hydration Solution*.

Pracovní postup

A) Čištění DNA

1) Vzorek DNA se naředí TE pufrem na celkový objem 49 µl. Následně se přidá 1 µl proteinkinázy K. Vzorky se inkubují po dobu 5 hodin (přes noc) při 56 °C.

2) Po uplynutí doby inkubace se do vzorku napipetuje 5 µl acetátu sodného a po protřepání se přidá 125 µl absolutního alkoholu.

3) Vzorky se ponechají 2 hodiny při –20 °C.

4) Vzorky se vloží do centrifugy nastavené na 13000 ×g. Nechá se proběhnout centrifugace po dobu 15 minut.

5) Po odlití supernatantu se ke vzorku přidá 500 µl 70 % ethanolu. Vzorek se opět stočí po dobu 5 minut při 13000 ×g.

6) Supernatant se opět odlije a zbylý ethanol se nechá odpařit.

7) Ke vzorkům se přidá 30 µl ultračisté vody. Vzorky se inkubují po dobu 5 hodin při 37 °C.

8) Po ukončení doby inkubace se měří koncentrace DNA ve vzorku a zaznamenávají se hodnoty optické denzity, které charakterizují poměr koncentrací solí a DNA, respektive poměr koncentrací proteinů a DNA. V případě vyšší koncentrace DNA vzorky ředíme pomocí TE pufru na konečnou koncentraci 40 – 50 ng/µl.

B) Restrikce

1) Příslušné enzymy a pufr *10X buffer C* vyndáme z mrazáku. Během práce je ponecháme na ledu. Mezitím si připravíme podle standardního operačního protokolu ÚBLG roztok kontrolní DNA, a to rozpuštěním 0,4 – 0,5 µg DNA pomocí *nuclease free water* na objem 10,1 µl pro jednu hybridizaci.

2) Připravíme si mikrozkumavky, které řádně popíšeme a do každé napipetujeme 10,1 µl vzorku či kontrolní DNA. Následně si připravíme *Digestion Master Mix* podle tabulky 4.10.

Tab. 4.10. Digestion Master Mix:

Reagencie	Objem
Alu I (10 U/µl)	4,2 µl
Rsa I (10 U/µl)	4,2 µl
10X buffer C	21,8 µl
Acetylated BSA (10 µg/µl)	1,7 µl
Nuclease free water	16,8 µl
Celkový objem	48,7 µl

3) Do každé mikrozkumavky se napipetuje roztok *Digestion Master Mix* o objemu 2,9 µl.

4) Promícháme roztoky a mikrozkumavky vložíme do termocykleru. Následně spustíme program uvedený v tabulce 4.11.

Tab. 4.11. Program termocykleru.

Krok	Teplota	Čas
1	37 °C	2 hodiny
2	65 °C	10 minut
3	4 °C	Udržet

C) Značení

1) Reagencie pro *Fluorescent Labelling System* vyjmeme z mrazáku, promícháme a během práce uchováváme na ledu.

2) Do každé mikrozkumavky přidáme 2,5 µl roztoku primerů a promícháme. Mikrozkumavky necháme inkubovat 5 minut při 95 °C a pak 5 minut při 4 °C.

3) Po inkubaci vzorky stočíme při 6000 ×g po dobu 1 minuty.

4) Připravíme si *Labelling Master Mix* podle tabulky 4.12.

Tab. 4.12. *Labelling Master Mix.*

Reagencie	**Objem**	**Objem**
5X buffer	42,0 µl	42,0 µl
10X dNTP	21,0 µl	21,0 µl
Cy3 dUTP	12,6 µl	---
Cy5 dUTP	---	12,6 µl
exo-Klenow fragment	4,2 µl	4,2 µl
Celkový objem	79,8 µl	79,8 µl

Labelling Master Mix s obsahem Cy3 dUTP se užije pro vzorky, *Labelling Master Mix* obsahující Cy5 dUTP se použije pro značení kontrolní DNA. *Labelling Master Mix* se pipetuje v množství 9,5 µl do každé mikrozkumavky.

5) Promíchané vzorky i roztoky kontrolní DNA se přenesou do termocykleru a spustí se program uvedený v tabulce 4.11.

D) Kombinace

1) Mikrozkumavky stočíme při 6000 ×g po dobu 1 minuty. Vzorky i roztoky kontrolní DNA přeneseme do čistých popsaných mikrozkumavek a přidáme 430 µl TE pufru.

2) Připravíme si a popíšeme si mikrozkumavky s filtrem, do kterých přeneseme objemy vzorků či kontrolní DNA. Ty pak umístíme do centrifugy a stáčíme při 14000 ×g otáčkách po dobu 10 minut. Poté se vyjmou filtry, vylijí se supernatanty a filtry otočené o 180° se umístí zpět. Přidáme 480 µl TE pufru a znovu stočíme za stejných podmínek.

3) Poté filtry vyjmeme a umístíme je "vzhůru nohama" do čistých popsaných mikrozkumavek. Stočíme při 1000 ×g po dobu 1 minuty.

4) Filtry vyjmeme a vyhodíme. Mikrozkumavky umístíme na dobu 35 minut do vakuového koncentrátoru nastaveného na 55 °C.

5) Zůstatky vzorků i roztoků kontrolní DNA v mikrozkumavkách se naředí pomocí 9,5 µl TE pufru. Roztoky se promíchají pipetou.

6) Následně se odebere objem 1,5 µl z každého vzorku a změří se koncentrace DNA. Koncentrace DNA i hodnoty optické denzity se opět zaznamenají.

7) Na závěr se zkombinují roztoky vzorků a kontrolní DNA tak, aby výsledný objem v mikrozkumavkách byl 16 µl.

E) Hybridizace

1) Do každé mikrozkumavky se značenou DNA o objemu 16 µl se přidají reagencie podle tabulky 4.13. Výsledný objem ve zkumavce by měl činit 45 µl.

Tab. 4.13. Reagencie pro hybridizaci.

Reagencie	Objem
COT Human DNA	2 µl
10X blocking agent	4,5 µl
2X hybridization buffer (Hi-RPM)	22,5 µl
Celkový objem	45 µl

2) Následně probíhá inkubace nejprve 3 minuty při 95 °C a následně ve vodní lázni při 37 °C po dobu 30 minut.

3) Připravíme si čip příslušného formátu. Vyjmeme masku čipu a umístíme jí do spodní části svorky. Na masku čipu kapeme vzorky do jednotlivých polí v "zrcadlově obráceném" pořadí tak, aby po přiložení vlastního čipu byly vzorky umístěny v požadovaných polích. Vzorky kapeme následovně: pipetou si nabereme objem 40 µl, který pomalu roztahujeme po poli na masce, v dalším kroku nabereme objem 3 µl, jež jemně vypustíme do středu pole a nakonec nabereme pipetou objem 2 µl, který opět jemně vypustíme do středu kapky pole. Při pipetování by se neměly tvořit bubliny. Poté se přiloží sklo čipu a horní část svorky. Svorka se utáhne šroubem. Svorku několikrát otočíme, aby se případné bubliny uvolnily.

4) Čip se umístí do předehřáté hybridizační pícky, případně se vyváží prázdnou svorkou. Hybridizace probíhá při teplotě 65 °C po dobu 24 hodin.

F) Odmývání

1) Nejprve si připravíme dvě skleněné vaničky, jež naplníme promývacím roztokem *Oligo aCGH Wash buffer 1*. Roztok *Oligo aCGH Wash buffer 2* si ve zkumavce o objemu 40 ml dáme předehřát na teplotu 37 °C.

2) Čip po vytažení z hybridizační pícky vyjmeme ze svorky a umístíme do vaničky s pufrem. Pod hladinou jemně uvolníme masku čipu a necháme ji klesnout na dno nádoby. Čip jemně promyjeme a přeneseme do druhé vaničky, kam umístíme magnetické míchadélko. Zapneme míchání a necháme promývat 5 minut.

3) Mezitím vyjmeme zkumavku s druhým promývacím roztokem z termostatu. Po ukončení promývání v roztoku *Oligo aCGH Wash buffer 1* rychle přeneseme čip do zkumavky s teplým

roztokem *Oligo aCGH Wash buffer 2* na dobu 1 minuty. Poté pomalu a plynule čip vytáhneme, aby se na jednotlivých polích neudělaly přechody.
4) Čip se umístí do stojánku.

G) Skenování

Skenování je založeno na podobném principu jako odečítání metody FISH. V rámci pracovního postupu byla štěpená DNA před aplikací na čip a hybridizací označená pomocí fluorochromu (vzorek byl značen pomocí Cy3, kontrolní DNA pak pomocí Cy5). Při skenování dochází k ozáření jednotlivých polí čipu excitačním světlem o specifické vlnové délce (viz tabulka 4.14), což u užitých fluorochromů vybudí přechod elektronů na vyšší energetické hladiny. Během jejich návratu na základní energetické hladiny pak dochází k vyzáření přebytečné energie ve formě fluorescenčního záření, které je registrováno. Podstatou této metody je kompetice fragmentů vyšetřované a kontrolní DNA o navázání na přítomné oligonukleotidové sondy, přičemž signály obou fluorochromů by měly být vyrovnané. V případě, že v určitém lokusu chromozomu prezentovaného danou sondou chybí signál Cy3, je vyšetřovaná DNA v tomto úseku deletována. Naopak pokud má v určitém regionu signál Cy3 vyšší intenzitu než signál Cy5, vyplývá z toho, že došlo k zvětšení počtu kopií daného regionu. K vlastnímu skenování byl použit automatický analyzátor *Microarray Scanner G2505C* od americké firmy Agilent Technologies. Správně uchované vzorky lze skenovat opakovaně.

Tab. 4.14. Fluorochromy využité pro značení DNA a jejich excitační spektra.

Fluorochrom	**Zkratka**	**Excitační spektrum**
Cyanin 3	Cy3	532 nm
Cyanin 5	Cy5	635 nm

H) Zpracování obrazu a hodnocení

Ke zpracování a zhodnocení obrazu byly využity tři počítačové programy, konkrétně *Agilent Scan Control software* verze A.8.4.1., *Agilent Feature Extraction software* verze 10.7.3.1. (oba od firmy Agilent Technologies) a *BlueFuse Multi software* verze 2.6. (od firmy BlueGenome Ltd.). První software slouží především pro vlastní kontrolu skenovacího zařízení a průběhu skenování. Druhý software umožňuje nahrání získaných obrazů, jejich kontrolu, přiřazení naskenovaných polí k jednotlivým pacientům a zpracování obrazu, včetně jeho ořezání a kontroly pozadí. Třetí software po nahrání dat z předešlého programu provede automatickou analýzu, přičemž výsledkem je numerické i grafické vyjádření poměrů intenzit

signálů fluorochromů a případné označení odchylek od očekávaného průměru, jakožto důsledku delece nebo amplifikace daných úseků. Po "rozkliknutí" úseků lze provádět další úpravy ručně (např. posouvat hranice přestavby apod.). Též je možné rozlišit již popsané polymorfismy od případných patologií pomocí vložené databáze. Konečným výstupem analýzy je zjištění přestavby a určení jejího rozsahu.

4.4 Statistické hodnocení výsledků FISH

Získaná data se vyhodnotila statistickým testem. Hodnocena byla reprodukovatelnost metody měření na třech úrovních. Jako první úroveň bylo zvoleno hodnocení na základě postupného odečtu většího počtu preparátů od jednoho pacienta jedním hodnotitelem. Druhá úroveň zahrnuje odečet stejných preparátů nezávislými hodnotiteli s různým přístrojovým vybavením. Třetí úroveň odráží reprodukovatelnost měření získanou nezávislou analýzou vzorků stejných pacientů různými hodnotiteli ve dvou odlišných laboratořích. Ke statistické analýze byl užit program Microsoft Excel 2003.

4.4.1 Postup statistické analýzy

K následujícímu hodnocení bylo využito procentuální zastoupení jednotlivých linií odrážející se v počtu zaznamenaných signálů (např. u mozaik Turnerova syndromu je buněčná linie 46,XX stanovena na základě přítomnosti dvou signálů DXZ1 sondy v odečítaných figurách, zatímco linie 45,X na základě přítomnosti jednoho signálu stejné sondy). Získaná data byla seřazena v tabulkách tak, že odpovídající hodnoty jsou vždy pod sebou, přičemž mnou získané výsledky budou souhrnně uvedeny v tabulce 5.1. V některých případech, například u pacienta XIV jsou data kvůli tomu, aby mohla být zařazena do statistického zhodnocení, brána pouze z hlediska vyšetřovací sondy. Vřazena byla i data nulové hodnoty, protože i ta mají výpovědní hodnotu. U pacientů s prokázanými či suspektními aberacemi gonozomů byly porovnávány hodnoty od jednoho do pěti signálů. Jednotlivé počty signálů odrážejí případný výskyt kompletní či parciální monozomie, trizomie, tetrazomie a pentazomie pohlavních chromozomů, případně triploidie či tetraploidie v mozaice. Všechny tyto nálezy byly referovány v podobě četných kazuistik. Zatímco u prokázaných nebo suspektních aberací autozomů byl porovnáván maximální výskyt čtyř signálů, který by odrážel nález kompletní nebo parciální tetrazomie, respektive tetraploidie v mozaice.

Pentazomie autozomů jsou popsány pouze u pacientů s malignitami. U dvou pacientů (pacient XV a XVI) byla data přehodnocena podle hodnocení druhého hodnotitele, tj. na 46,XX~100 %, respektive 46,XY~100 %, protože hodnoty aberantních linií nepřesáhly *cut off* hranici 2 %, což odpovídá stejnému hodnocení. U vlastních dat jsem toto přehodnocení neprovedla. Získané zastoupení bylo u všech pacientů zaznamenáno bez ohledu, zda se jednalo o minoritní hodnoty překračující dané meze nebo ne. Naměřená data jsou seřazená v tabulkách 4.15, 4.16 a 4.17. V tabulce 4.15 byla porovnávána vždy data získaná na základě odečtu preparátu s centromerickou sondou proti hodnotám stanoveným na podkladě odečtu preparátu s kombinací centromerické a lokus specifické sondy. Data centromerické sondy jsou označena podtiskem, bližší specifikace užitých sond u jednotlivých pacientů byla uvedena v subkapitole 4.2.1. V tabulkách 4.16 a 4.17 byla porovnávána mnou získaná data (označená podtiskem) s výsledky klinické části laboratoře ÚBLG (bez podtisku).

Tab. 4.15. Odečet většího počtu preparátů od jednoho pacienta jedním hodnotitelem – 1. úroveň hodnocení.

Označení vzorku		**Počet zaznamenaných signálů [%]**				
		5	**4**	**3**	**1**	**2**
I	**a**	0	0,18	42,18	56,18	1,46
	b	0	0,35	47,05	52,26	0,35
II	**a**	0	0	0	99,44	0,56
	b	0	0	0,19	99,04	0,76
III	**a**	0	0	0	52,36	47,64
	b	0	0	0	52,72	47,28
IV	**a**	0	0	0,39	0,2	99,41
	b	0	0	0	0	100
V	**a**	0	0	0,49	3,67	95,84
	b	0	0,46	1,38	2,08	96,07
VIII	**a**	0	0	0	44,9	55,1
	b	0	0	0	45,02	54,98
XXIII	**a**	0	0	0	74,81	25,19
	b	0	0	0	79,05	20,95
XXIV	**a**	0,17	0	1,22	3,67	94,93
	b	0	0,38	1,33	2,48	95,81
XXV	**a**	0	0,54	47,66	47,48	4,32
	b	0	0,18	54,04	44,7	1,08
XXVI	**a**	0	0	0	87,59	12,42
	b	0	0	0	89,69	10,31
XXVIII	**a**	0	0	0,19	48,6	51,21
	b	0	0	0,19	45,87	53,93
XXIX	**a**	0	0,19	0,19	49,04	50,58
	b	0,19	0	0,75	48,5	50,56

Tab. 4.16. Odečet stejných preparátů různými hodnotiteli – 2. úroveň hodnocení.

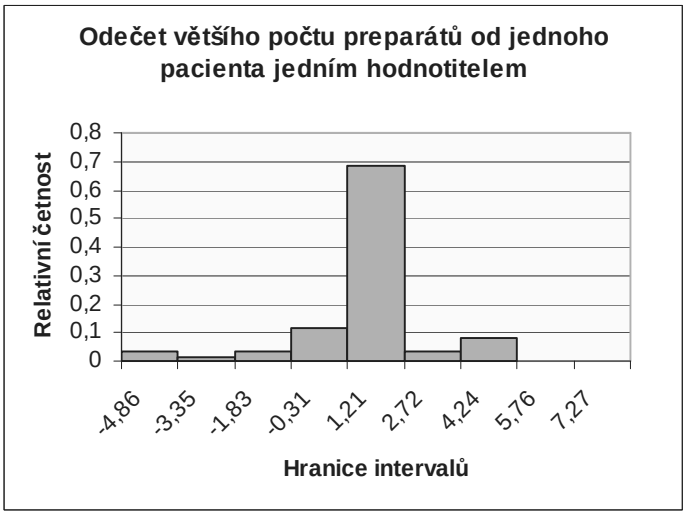
Označení vzorku		Počet zaznamenaných signálů [%]				
		5	**4**	**3**	**1**	**2**
IX		---	0	63,68	0	36,31
		---	0	68,12	0	31,88
XII		0	0,19	0	4,27	95,55
		0	0	0	4,48	95,52
XIII		0	0,19	0	8,74	91,07
		0	0	0	11,48	88,52
XIV		---	0	0	31,92	68,08
		---	0	0	32,77	67,23
XV		---	0	0	0	100
		---	0	0	0	100
XVI		---	0	0	0	100
		---	0	0	0	100
XVII		---	0	0	2,15	97,85
		---	0	1,14	1,91	96,95
XIX	**a**	0,19	0,38	1,72	5,74	91,97
		0	0,2	2,03	5,29	92,07
	b	0	0	0,83	4,96	94,21
		0	0	0	2,5	97,5
XX	**a**	---	0	18,83	0	81,17
		---	0	22,86	0	77,14
	b	---	0	10,61	0	89,39
		---	0	11,02	0	88,98
XXI		0	0,19	1,55	6,77	91,49
		0	0,13	2,92	3,89	93,06
XXII		0	0,39	2,89	8,86	87,86
		0	0	1,19	9,06	89,75

Tab. 4.17. Nezávislá analýza vzorků stejných pacientů různými hodnotiteli – 3. úroveň hodnocení.

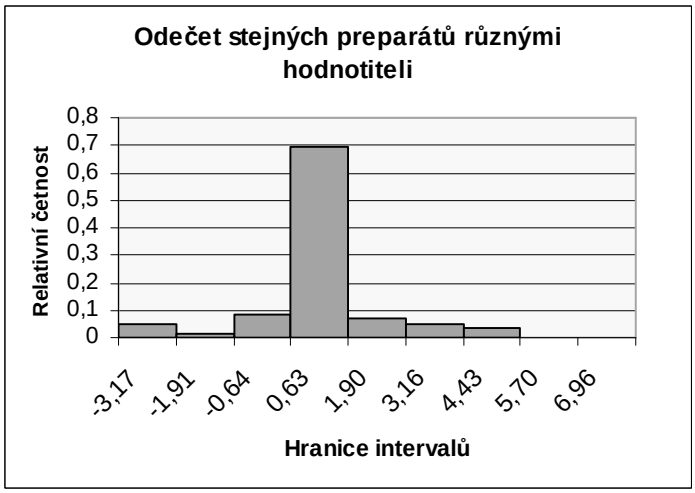
Označení vzorku		Počet zaznamenaných signálů [%]				
		5	**4**	**3**	**1**	**2**
VII	**a/a***	0	0	0	82,4	17,6
		0	0	0	78	22
	b/b*	0	0	0	82,7	17,3
		0	0	0	78	22
	c/c*	0	0	0	80,7	19,3
		0	0	0	78	22
	d	0	0	0	75,37	24,62
		0	0	0	78	22

VIII	**a**	0	0	0,37	44,73	54,9
		0	0	0,6	55	44,4
	b	0	0	0,19	54,88	44,93
		0	0	0,6	55	44,4
	c	0	0	0	58,2	41,8
		0	0	0,6	55	44,4
XXIII	**b**	0	0	0	79,05	20,95
		0	0	0	78	22
	c	0	0	0	78,91	21,09
		0	0	0	78	22
XXIV	**a**	0,17	0	1,22	3,67	94,93
		0	0	1,9	2,6	95,5
	b	0	0,38	1,33	2,48	95,81
		0	0	1,9	2,6	95,5
XXV	**a**	0	0,54	47,66	47,48	4,32
		0	0	47,51	52,49	0
	b	0	0,18	54,04	44,7	1,08
		0	0	47,51	52,49	0
XXVI		0	0	0	89,69	10,31
		0	0	0	87,2	12,8
XXVII		---	0	5,41	7,28	87,31
		---	0	3,45	4,14	92,41
XXVIII	**a**	0	0	0,19	48,6	51,21
		0	0	0	55	45
	b	0	0	0,19	45,87	53,93
		0	0	0	55	45
XXIX	**a**	0	0,19	0,19	49,04	50,58
		0	0	0	57,39	42,61
	b	0,19	0	0,75	48,5	50,56
		0	0	0	57,39	42,61

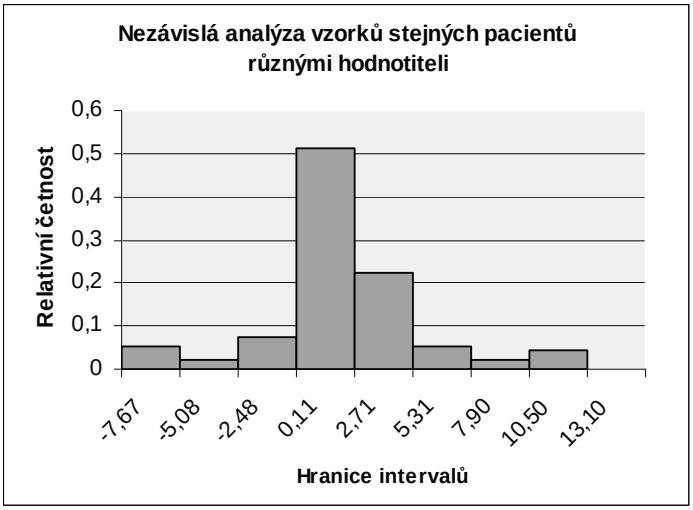
Dalším krokem bylo posouzení normality naměřených dat. Nejprve byly spočteny rozdíly hodnot uvedené v tabulkách 4.15, 4.16 a 4.17. Následně byly stanoveny hranice rozdílů a četnost rozdílů a byly vytvořeny histogramy (obrázky 4.1, 4.2 a 4.3). Současně byla posouzena normalita i na základě výpočtu šikmosti a špičatosti (tabulka 4.18). Na základě průkazu asymetrického rozložení dat, byl vybrán k posouzení hypotéz neparametrický Wilcoxonův párový test.



Obr. 4.1. Graf: Odečet většího počtu preparátů od jednoho pacienta jedním hodnotitelem – 1. úroveň hodnocení.



Obr. 4.2. Graf: Odečet stejných preparátů různými hodnotiteli – 2. úroveň hodnocení.



Obr. 4.3. Graf: Nezávislá analýza vzorků stejných pacientů různými hodnotiteli – 3. úroveň hodnocení.

Tab. 4.18. Výsledky posouzení normality dat.

	Šikmost	Hranice šikmosti ±	Špičatost	Hranice špičatosti ±
1. úroveň	-0,93641	0,632455532	4,90382	1,26491106
2. úroveň	-0,06810	0,637792804	3,43534	1,27558608
3. úroveň	-0,16546	0,505291153	2,81096	1,01058231

Wilcoxonův párový test je obdobou párového t-testu, který umožňuje hodnotit asymetrická data na základě porovnání mediánů (Zvárová 2011). Nejprve byla vytvořena pomocná tabulka, z níž se vynechaly hodnoty s nulovým efektem. Poté bylo určeno kladné a záporné pořadí hodnot pomocí funkcí programu Microsoft Excel 2003. Nakonec byla stanovena S-hodnota, a to na základě porovnání nižší absolutní hodnoty součtu kladného a záporného pořadí.

4.5 Postup zápisu výsledků podle ISCN 2009

4.5.1 Zápis výsledků metody FISH

Zápis výsledků metody FISH je dán mezinárodním systémem ISCN (*An International system for human cytogenetic nomenclature*).

Metafázní *in situ* hybridizace

Pokud jsou dostupné výsledky standardního cytogenetického vyšetření, tak je lze uvést na prvním místě. Následuje mezera, tečka a zkratka ish. Po zkratce následuje opět mezera po ní případná zkratka strukturní aberace (např. del jako delece apod.) s uvedením čísla chromozomu v první závorce, místem zlomu v druhé závorce a sondou užitou k vyšetření (resp. jejím cílovým lokusem) ve třetí závorce. U použité sondy je uvedeno znaménko plus nebo mínus, podle toho, zda je signál přítomen či nepřítomen.

Př. zápisu 1: 46,XX. ish del(17)(p11.2p11.2)(RAI1-) značí, že u ženy s normálním výsledkem cytogenetického vyšetření byla nalezena delece v oblasti 17p11.2 pomocí sondy nasedající na gen RAI1, který je součástí kritického regionu Smith-Magenis syndromu.

Interfázní *in situ* hybridizace

Opět se nejprve píší výsledky standardního cytogenetického vyšetření oddělené tečkou a mezerou, v případě, že byla rovněž provedena i metafázní FISH, uvádějí se poté její výsledky, po nichž následuje tečka a zkratka nuc ish, která uvozuje výsledky interfázní FISH. Po zkratce se zapisuje (bez mezery) závorka s vyšetřovaným lokusem/užitou sondou vynásobeným počtem pozorovaných signálů. Při použití většího počtu sond se lokusy zapisují v pořadí: od konce krátkého raménka do konce dlouhého raménka, gonozomy předchází autozomům a autozomy jsou uvedeny v pořadí 1 – 22. Po kulaté závorce se sondou a počtem signálů se uvádí závorka hranatá s počtem interfázních jader, u kterých byl nález pozorován. V zápisu se uvádí pouze patologické linie, zastoupení buněčné linie 46,XX či 46,XY se dopočítává. Větší počet linií se odděluje lomítkem.

Př. zápisu: mos 45,X/46,XX.nuc ish(DXZ1×1)[15/400]/(DXZ1×3)[5/400] značí, že základním cytogenetickým vyšetřením byly nalezeny buněčné linie 45,X a 46,XX. Při odečtu metafázní FISH prezentovalo 15 interfázních jader jeden signál centromerické sondy DXZ1 a 5 interfázních jader neslo tři signály stejné sondy. Celkem 380 interfázních jader představovalo normální buněčnou linii 46,XX se dvěma signály DXZ1.

4.5.2 Zápis výsledků metody array CGH

Nejprve se píše zkratka arr, mezera, číslo chromozomu a chybějící pruhy. Bez mezery následuje závorka, v níž je umístění poslední sondy, u níž byl zaznamenán předpokládaný poměr intenzit obou fluorochromů se symbolem × a dvojkou, pak se zapisuje čárka, mezera, umístění sondy, od které došlo ke ztrátě či amplifikaci počtu kopií (převaze jednoho či druhého signálu fluorochromu) a umístění sondy, u níž přestavba končí. Za koncem přestavby se píše symbol × s číselným vyjádřením míry amplifikace – u mozaicismu prezentovaným v různé četnosti, například 1~2 pro delece nacházející se u jedné buněčné linie ze dvou možných. Za tímto vyjádřením se dále, pokud se nejedná o přestavbu v terminálním úseku chromozomu, zapisuje čárka, mezera a umístění sondy, u níž je opět zaznamenán předpokládaný poměr intenzit obou fluorochromů se symbolem × a dvojkou.

Př. zápisu: zápis arr 18q22.1q23(59,753,365×2, 59,806,894-76,113,788×1~2) říká, že byla nalezena přestavba v terminální oblasti chromozomu odpovídající cytogenetickým pruhům 18q22.1 a 18q23. Poslední sonda, u níž byl vyrovnaný poměr intenzit obou signálů, měla umístění 59,753,365. Mezi sondami s umístěním 59,806,894 a 76,113,788 se pak nalézala delece v mozaice.

5 Výsledky

Výsledky metod FISH i array CGH jsou zapsány podle pravidel vycházejících z mezinárodního systému ISCN, jež jsou uvedena v oddíle 4.5.

5.1 Výsledky metody FISH

Výsledky kvantitativních i kvalitativních analýz FISH jsou uvedeny v tabulce 5.1. V případě, že u pacienta bylo připraveno a vyšetřeno více preparátů, nese vzorek další označení v podobě malých písmen. Informace o použité sondě u konkrétních pacientů jsou uvedeny v oddíle 4.2.1, přičemž vyšetřovaný lokus je uveden v zápisu. Informace o typu analyzovaného biologického materiálu jsou uvedeny v dalším textu v tabulce 5.5, která blíže specifikuje kvalitu preparátu s ohledem na analyzovaný biologický materiál. Pro lepší orientaci byly výsledky kvantitativních analýz metody FISH zapsány i v podobě procentuálního zastoupení prokázaných buněčných linií.

Tab. 5.1. Výsledky metody FISH

Označení vzorku		Výsledky odečtu
		Procentuální zastoupení jednotlivých linií
I	**a**	**mos 45,X/47,XXX.nuc ish(DXZ1×1)[309/550]/(DXZ1×3)[232/550]/(DXZ1×4)[1/550]**
		45,X~56,18 % / 47,XXX~42,18 % / 48,XXXX~0,18 % / 46,XX~1,46 %
	b	**mos 45,X/47,XXX.nuc ish(DXZ1,KAL)×1[301/576]/(DXZ1,KAL)×3[271/576]/(DXZ1,KAL)×4[2/576]**
		45,X~52,26 % / 47,XXX~47,05 % / 48,XXXX~0,35 % / 46,XX~0,35 %
II	**a**	**45,X.nuc ish(DXZ1×1)[528/531]**
		45,X~99,44 % / 46,XX~0,56 %
	b	**45,X.nuc ish(DXZ1,KAL)×1[518/523]/(DXZ1,KAL)×3[1/523]**
		45,X~99,04 % / 47,XXX~0,19 % / 46,XX~0,76 %
III	**a**	**mos 45,X/46,XX.nuc ish(DXZ1×1)[300/573]**
		45,X~52,36 % 46,XX~47,64 %
	b	**mos 45,X/46,XX.nuc ish(DXZ1,KAL)×1[281/533]**
		45,X~52,72 % / 46,XX~47,28 %
IV	**a**	**46,XX.nuc ish(DXZ1×3)[2/510]/(DXZ1×1)[1/510]**
		45,X~0,20 % / 47,XXX~0,39 % / 46,XX~ 99,41%
	b	**46,XX.nuc ish(DXZ1,KAL)×2[530/530] (Normální karyotyp)**
		46,XX~100 %
V	**a**	**46,XX.nuc ish(DXZ1×1)[15/409]/(DXZ1×3)[2/409]**
		45,X~3,67 % / 47,XXX~0,49 % / 46,XX~95,84 %
	b	**mos 46,XX.nuc ish(DXZ1,KAL)×1[9/433]/(DXZ1,KAL)×3[6/433]/(DXZ1,KAL)×4[2/433]**
		45,X~2,08 % / 47,XXX~1,38 % / 48,XXXX~0,46 % / 46,XX~96,07 %

VI	**a**	**mos 46,X,der(X)(p?11.22q?12)/45,X/46,XX.ish der(X)(p11.1p13.2)(DXZ1+,XIST+)[1/13]/ Xp11.1(DXZ1×1),Xp13.2(XIST×1)[7/13].nuc ish(DXZ1×1)[113/504]**
		46,X,der(X)~0,19 % / 45,X~21,86 % / 46,XX~77,95 %
	b	**mos 46,X,der(X)(p?11.22q?12)/45,X/46,XX.ish der(X)(p11.1p13.2)(DXZ1+,XIST+,SHOX-)[1/8]/Xp11.1.(DXZ1×1), Xp13.2(XIST×1),Xp22.3(SHOX×1)[5/8].nuc ish(DXZ1×2,XIST×2,SHOX×1)[29/542]/(DXZ1×1,XIST×1,SHOX×1)[113/542]**
		46,X,der(X)~5,45 % / 45,X~21,45 % / 46,XX~73,09 %
VII	**a**	**mos 45,X/46,XX.ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1),Xp22.3(KAL×1)[13/18].nuc ish(DXZ1,KAL)×1[388/482]**
		45,X~80,20 % / 46,XX~19,80 %
	a*	**mos 45,X/46,XX.ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1)[13/15].nuc ish(DXZ1×1)[410/485]**
		45,X~84,6 % / 46,XX~ 15,4 %
	b	**mos 45,X/46,XX.ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1),Xp22.33(SHOX×1)[10/12].nuc ish(DXZ1,SHOX)×1[394/488]**
		45,X~80,80 % / 46,XX~19,20 %
	b*	**mos 45,X/46,XX.ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1)[19/24].nuc ish(DXZ1×1)[404/476]**
		45,X~84,60 % / 46,XX~15,40 %
	c	**mos 45,X/46,XX.ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1),Xp13.2(XIST×1)[24/29].nuc ish(DXZ1,XIST)×1[378/471]**
		45,X~80,40 % / 46,XX~19,60 %
	c*	**mos 45,X/46,XX.ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1)[16/19].nuc ish(DXZ1×1)[389/92]**
		45,X~81,00 % / 46,XX~19,00 %
	d	**mos 45,X/46,XX.nuc ish(AR×1)[401/532]**
		45,X~75,37 % / 46,XX~24,62 %
VIII	**a**	**mos 45,X/46,XX.ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1)[15/28].nuc ish(DXZ1×1)[282/513]/(DXZ1×3)[2/513]**
		45,X~44,73 % / 47,XXX~0,37 % / 46,XX~54,90 %
	b	**mos 45,X/46,XX.ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1),Xp22.3(KAL×1)[16/26].nuc ish(DXZ1,KAL)×1[271/497]/(DXZ1,KAL)×3[1/497]**
		45,X~54,88 % / 47,XXX~0,19 % / 46,XX~44,93 %
	c	**mos 45,X/46,XX.ish Xp12(AR×1)[7/12].nuc ish(AR×1)[309/531]**
		45,X~58,20 % / 46,XX~41,80 %

IX	**a**	**ish der(17)(D17Z1+)**
	b	**ish der(17)(D17Z1+)[8/11].nuc ish(D17Z1×3)[320/504]**
		47,XX,+der(17)~63,68 % / 46,XX~36,31 %
	c	**ish der(17)17p11.2(RAI1+),17p13.3(LIS1–)**
	d	**ish der(17)17q11.2(NF1–),(D17S2199–)**
X		**46,XX.nuc ish(D17Z1,TOP2A)×1[1/528]/(D17Z1×3,TOP2A×2)[1/528]**
		45,X,–17~0,19 % / 47,XX,+der(17)~0,19 % / 46,XX~99,62 %
XI	**a**	**nuc ish(D17Z1×3)[10/1048]**
		47,XX,+der(17)~0,92 % / 46,XX~ 99,08 %
	b	**nuc ish(D17Z1×3)[8/527]**
		47,XX,+der(17)~1,52 % / 46,XX~ 98,48 %
XII		**ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1),Xp22.33(SHOX×1)[2/26].nuc ish(DXZ1,SHOX)×1[21/513]/(DXZ1,SHOX)×4[1/513]**
		45,X~4,27 % / 48,XXXX~0,19 % / 46,XX~95,55 %
XIII		**ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1),Xp22.33(SHOX×1)[2/26].nuc ish(DXZ1,SHOX)×1[43/488]/(DXZ1,SHOX)×4[1/489]**
		45,X~8,74 % / 48,XXXX~0,19 % / 46,XX~91,07 %
XIV		**46,XX.ish 18ptel(D18S552×2)/18qtel(D18S1390×1)[8/17].nuc ish(D18S552×2,D18S1390×1)[158/503]**
		46,XY,del(18)(18qtel)~31,92 % / 46,XY~68,08 %
XV		**46,XX.nuc ish(D18S552,D18S1390)×1[2/519]/(D18S552×1,D18S1390×2)[1/519]/(D18S552,D18S1390)×3[1/519]**
		45,XX,–18~0,39 % / 46,XX,del(18)(ptel)~0,19 % / 47,XX,+18~0,19 % / 46,XX~99,23 %

XVI		**46,XX.nuc ish(D18S552,D18S1390)×1[2/525]/(D18S552×1,D18S1390×2)[1/525]**
		45,XY,–18~0,38 % / 46,XY,del(18)(ptel)~0,19 % / 46,XY~99,43 %
XVII		**46,XY.ish 22q11.21(TUPLE1×1),22q13.3(N85A3×1)[1/13].nuc ish(TUPLE1,N85A3)×1[10/497]**
		45,X,–22~2,15 % / 46,XY~97,85 %
XVIII	**a**	**mos 47,XY+21/45,X.ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1)[14/19].nuc ish(DXZ1×1)[389/503]/(DXZ1×2)[2/503]**
		45,X~77,20 % / 46,XX~0,38 % / 46,XY~22,41 % (předpoklad při užití této sondy)
	b	**mos 47,XY,+21/45,X.ish 21q22.13-q22.2(LSI21×3)[9/28].nuc ish(LSI21×3)[120/504]/(LSI21×1)[1/504]**
		47,XY,+21~24,25 % / 45,XY,–21~0,19 % / 46,XY~75,56 % (předpoklad při užití této sondy)
	c	**mos 47,XY+21/45,X.ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1),Yp11.1-q11.1(DYZ3×0),21q22.13-q22.2(LSI21×2)[16/20]/Xp11.1-q11.1(DXZ1×1), Yp11.1-q11.1(DYZ3×1),21q22.13-q22.2(LSI21×3)[4/20].nuc ish(DXZ1×1,LSI21×2)[363/501]/(DXZ1×1,DYZ3×1,LSI21×3)[135/501]/ (DXZ1×2,DYZ3×0,LSI21×2)[3/501]**
		45,X~72,74 % / 47,XY,+21~26,68 % / 46,XX~0,58 %
	d	**mos 47,XY+21/45,X.ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1)[11/13].nuc ish(DXZ1×1)[395/513]/(DXZ1×2)[6/513]**
		45,X~77,19 % / 46,XX~1,14 % / 46,XY~21,67 % (předpoklad při užití této sondy)
	e	**mos 47,XY+21/45,X.ish 21q22.13-q22.2(LSI21×3)[4/10].nuc ish(LSI21×3)[109/532]/(LSI21×1)[7/532]**
		47,XY,+21~20,85 % / 45,XY,–21~1,29 % / 46,XY~77,86 % (předpoklad při užití této sondy)
	f	**mos 47,XY+21/45,X.ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1),Yp11.1-q11.1(DYZ3×0),21q22.13-q22.2(LSI21×2)[10/13]/Xp11.1-q11.1(DXZ1×1), Yp11.1-q11.1(DYZ3×1),21q22.13-q22.2(LSI21×3)[3/13].nuc ish(DXZ1×1,LSI21×2)[388/505]/(DXZ1×1,DYZ3×1,LSI21×3)[113/505]/ (DXZ1×2,DYZ3×0,LSI21×2)[4/505]**
		45,X~76,83 % / 47,XY,+21~22,39 % / 46,XX~0,77 %
XIX	**a**	**46,XX.nuc ish(DXZ1,SHOX)×1[30/523]/(DXZ1,SHOX)×3[9/523]/(DXZ1,SHOX)×4[2/523]/(DXZ1,SHOX)×5[1/523]**
		45,X~5,74 % / 47,XXX~1,72 % / 48,XXXX~0,38 % / 49,XXXXX~0,19 % / 46,XX~91,97 %
	b	**46,XX.nuc ish(DXZ1,SHOX)×1[6/121]/(DXZ1,SHOX)×3[1/121]**
		45,X~4,96 % / 47,XXX~0,83 % / 46,XX~94,21 %

XX	**a**	**nuc ish(D3Z1×3)[97/515]**
		47,XX,+der(3)~18,83 % / 46,XX~81,17 %
	b	**ish der(3)(D3Z1+)[1/14].nuc ish(D3Z1×3)[55/514]**
		47,XX,+der(3)~10,61 % / 46,XX~89,39 %
	c	**nuc ish(D3Z1×3)[56/517]**
		47,XX,+der(3)~10,83 % / 46,XX~89,17 %
	d	**ish der(3)(D3Z1+)[2/7].nuc ish(D3Z1×3)[75/517]**
		47,XX,+der(3)~14,69 % / 46,XX~85,31 %
XXI		**46,XX.nuc ish(DXZ1,SHOX)×1[35/517]/(DXZ1,SHOX)×3[8/517]/(DXZ1,SHOX)×4[1/517]**
		45,X~6,77 % / 47,XXX~1,55 % / 48,XXXX~0,19 % / 46,XX~91,49 %
XXII		**mos 45,X/47,XXX/46,XX.ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1),Xp22.33(SHOX×1)[1/22].nuc ish(DXZ1,SHOX)×1[45/497]/ (DXZ1,SHOX)×3[15/497]/(DXZ1,SHOX)×4[2/497]**
		45,X~8,86 % / 47,XXX~2,89 % / 48,XXXX~0,39 % / 46,XX~87,86 %
XXIII	**a**	**ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1)[13/15]/r(X)(DXZ1+)[2/15].nuc ish(DXZ1×1)[376/505]**
		45,X~74,81 % / 46,X,r(X)~0,38 % /46,XX~24,81 % (Předpoklad při užití této sondy)
	b	**ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1)[14/18]/r(X)(DXZ1+)[4/18].nuc ish(DXZ1×1,DXYS129×0,DXYS61×0)[106/507]/(DXZ1×1)[401/507]**
		45,X~79,05 % / 46,X,r(X)~20,95 %
	c	**ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1),Xp13.2(XIST×1)[101/128]/r(X)(DXZ1+,XIST+)[27/128]**
		45,X~78,91 % / 46,X,r(X)~21,09 %
XXIV	**a**	**46,XX.ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×3)[1/53].nuc ish(DXZ1×1)[21/519]/(DXZ1×3)[6/519]/(DXZ1×5)[1/519]**
		45,X~3,67 % / 47,XXX~1,22 % / 49,XXXXX~0,17 % / 46,XX~94,93 %
	b	**46,XX.nuc ish(DXZ1),(SHOX)×1[13/525]/(DXZ1,SHOX)×3[7/525]/(DXZ1,SHOX)×4[2/525]**
		45,X~2,48 % / 47,XXX~1,33 % / 48,XXXX~0,38 % / 46,XX~95,81 %

XXV	**a**	**mos 45,X/47,XXX.ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1)[16/30]/Xp11.1-q11.1(DXZ1×3)[14/30].nuc ish(DXZ1×1)[248/526]/(DXZ1×3)[251/526]/(DXZ1×4)[3/526]**
		45,X~47,48 % / 47,XXX~47,66 % / 48,XXXX~0,54 % / 46,XX~4,32 %
	b	**mos 45,X/47,XXX.ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1),Xp22.33(SHOX×1)[9/19]/Xp11.1-q11.1(DXZ1×3),Xp22.33(SHOX×3)[10/19]. nuc ish(DXZ1,SHOX)×1[240/538]/(DXZ1,SHOX)×3[291/538]/(DXZ1,SHOX)×4[1/538]**
		45,X~44,70 % / 47,XXX~54,04 % / 48,XXXX~0,18 % / 46,XX~1,08 %
XXVI	**a**	**mos 45,X/46,X,i(X)(q10).ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1)[21/28]/i(X)(DXZ1+)[7/28].nuc ish(DXZ1×1)[487/552]**
		45,X~87,59 % / 46,X,i(X)~1,21 % / 46,XX~11,21 % (Předpoklad při užití této sondy)
	b	**mos 45,X/46,X,i(X)(q10).ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1),Xp13.2(XIST×1)[43/46]/i(X)(DXZ1+,XIST++)[3/46]. nuc ish(DXZ1,XIST)×1[470/526]/(DXZ1×1,XIST×2)[56/526]**
		45,X~89,69 % / 46,X,i(X)~10,31 %
XXVII	**a**	**nuc ish(D13Z1,D21Z1)×3[137/526]/(D13Z1,D21Z1)×5[13/526]**
		45,XY,–13/21~26,05 % / 47,XY,+13/21~2,47 % / 46,XY~71,48 %
	b	**ish 21q22.13-q22.2(LSI21×3)[1/40].nuc ish(LSI21×1)[39/496]/(LSI21×3)[28/496]**
		45,XY,–21~7,28 % / 47,XY,+21~5,41 % / 46,XY~87,31 %
XXVIII	**a**	**ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1)[15/44].nuc ish(DXZ1×1)[245/491]/(DXZ1×3)[1/491]**
		45,X~48,60 % / 47,XXX~0,19 % / 46,XX~51,21 %
	b	**ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1),Xp22.3(KAL×1)[12/27].nuc ish(DXZ1,KAL)×1[227/494]/(DXZ1,KAL)×3[1/494]**
		45,X~45,87 % / 47,XXX~0,19 % / 46,XX~53,93 %
XXIX	**a**	**mos 45,X/46,XX.ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1)[10/21].nuc ish(DXZ1×1)[245/499]/(DXZ1×3)[1/499]/(DXZ1×4)[1/499]**
		45,X~49,04 % / 47,XXX~0,19 % / 48,XXXX~0,19 % / 46,XX~50,58 %
	b	**mos 45,X/46,XX.ish Xp11.1-q11.1(DXZ1×1),Xp22.3(KAL×1)[17/32].nuc ish(DXZ1,KAL)×1[242/502]/(DXZ1,KAL)×3[4/502]/(DXZ1,KAL)×5[1/502]**
		45,X~48,50 % / 47,XXX~0,75 % / 49,XXXXX~0,19 % / 46,XX~50,56 %

5.2 Výsledky metody array CGH

K vyšetření metodou array CGH byli indikováni tři pacienti s označením VIII, IX a XIV. Výsledky jsou zapsány podle mezinárodních pravidel uvedených v oddíle 4.5.2. Výsledky kvalitativní analýzy array CGH u vybraných pacientů jsou zaznamenány v tabulce 5.2.

Tab. 5.2. Výsledky metody array CGH

Pacient	Výsledek
VIII	arr (1-22)×2,(X)×1~2
IX	arr 17p11.2q11.1(18,675,037×2, 18,775,960-22,205,792×2~3, 25,300,229×2)
XIV	arr 18q22.1q23(59,753,365×2, 59,806,894-76,113,788×1~2)

5.3 Výsledky statistického hodnocení

Výsledky Wilcoxonova párového testu i s jednotlivými kritérii jsou uvedeny v tabulce 5.3. Pro konečné zhodnocení byly definovány dvě hypotézy. Nulová hypotéza H0 říká, že výsledky se významně neliší, zatímco alternativní hypotéza H1 hovoří o opaku, tj. říká, že výsledky se významně liší. Na základě stanovené S-hodnoty a jejího porovnání s kritickou hodnotou Wilcoxonova párového testu pro hladinu významnosti $\alpha = 0,05$ byla nebo nebyla zamítnuta nulová hypotéza H0 a přijata alternativní hypotéza H1.

Tab. 5.3. Výsledky Wilcoxonova párového testu.

	Počet hodnot	Součet kladných pořadí	Součet záporných pořadí	S-hodnota	Kritická hodnota $\alpha = 0,05$	Zamítnutí H0
1. úroveň	38	388	-353	353	235	Ne
2. úroveň	33	292	-269	269	170	Ne
3. úroveň	56	843	-753	753	557	Ne

5.4 Hodnocení kvality analýz

5.4.1 Hodnocení kvality materiálu použitého pro FISH

S odečtem signálů je bezpochybně neodmyslitelně spjato vlastní posouzení kvality preparátů, i když běžně zaznamenáváno není. V případě, že daná klinická laboratoř chce podávat dobře reprodukovatelné výsledky, měly by být tyto výsledky podávány pouze z kvalitních preparátů. Nicméně občas dochází i přes dodržení všech zásad zpracování vzorku k přípravě preparátu, jenž nesplňuje obecná kritéria kvality. Nejčastější příčinu představuje náhodná chyba v protokolu. Méně často pak nižší kvalita vyplývá z vlastní povahy vzorku, například interfázní jádra odečítaná z tkáně bukálního stěru obvykle překrývá nános cytoplazmy. Pro hodnocení strukturních abnormalit v mozaice je zase vhodné větší zastoupení mitóz s dobře rozvolněnými metafázními chromozomy. V mnou odečítaných preparátech jsem hodnotila vždy kvalitu a zastoupení interfázních jader i mitóz spolu s výskytem cytoplazmy a nečistot v preparátu. I když pojem "zastoupení" může být lehce zkreslující, protože se jedná o aspekt daný hustotou původní suspenze, byl ponechán z důvodu relativního vyjádření koncentrace interfázních jader či mitóz preparátu. V některých případech byla totiž zaznamenána velmi dobrá koncentrace interfázních jader i přestože mitózy na preparátu víceméně chyběly. Kritéria pro hodnocení jednotlivých aspektů a vlastní hodnocení shrnují tabulky 5.4 a 5.5. Pokud preparát vykazoval nehomogenní kvalitu, je tato skutečnost vyjádřena zlomkem.

Tab. 5.4. Hodnocená kritéria a jejich číselné vyjádření.

Číselné hodnocení	**Hodnocené kritérium**
	Kvalita interfázních jader/mitóz
1	Hodnocené struktury jsou dobře ohraničené, nepřekrývají se a jsou nepoškozené.
2	Struktury v některých místech preparátu vykazují poškození nebo se překrývají.
3	Hodnocené struktury jsou poškozené, nepravidelné a překrývají se. Nelze je hodnotit.
	Zastoupení interfázních jader/mitóz
1	Hodnocené struktury jsou zastoupeny v dostatečném konstantním počtu.
2	Hodnocené struktury jsou v menším počtu či část nelze hodnotit kvůli výskytu agregátů.
3	Hodnocené struktury jsou přítomné v nedostatečném počtu nebo úplně chybí.
	Nečistoty
1	Na preparátu nejsou nečistoty přítomny.
2	Nečistoty jsou přítomny, ale neovlivňují vlastní odečet.
3	Nečistoty jsou přítomny a významně narušují vlastní odečet.

	Cytoplazma
1	Cytoplazma není na preparátu přítomna.
2	Cytoplazma je přítomna, ale nikterak neovlivňuje vlastní odečet.
3	Cytoplazma velmi znesnadňuje či přímo neumožňuje odečet signálů.

Tab. 5.5. Hodnocení kvality jednotlivých preparátů. Použité zkratky PK - periferní krev, A - amniová tekutina, K - vzorek získaný kordocentézou, KŠ - kožní štěp, BS - bukální stěr, Nehodnocené kritérium ---.

Označení vzorku		Biol. mat.	Interfázní jádra		Mitózy		Další aspekty ovlivňující kvalitu	
			Kvalita	Zastoupení	Kvalita	Zastoupení	Nečistoty	Cytoplazma
I	**a**	**PK**	2/3	2/3	1/2	1	1	1
	b	**PK**	2/3	2/3	1/2	1	1	1
II	**a**	**PK**	1	1	1/2	1	2	2
	b	**PK**	1	1/2	1/2	1	2	2
III	**a**	**PK**	3	1	3	1	2	1
	b	**PK**	3	1	3	1	2	1
IV	**a**	**PK**	2/3	2	2	2	2	2/3
	b	**PK**	2/3	2	2	2	2	2
V	**a**	**PK**	2/3	2/3	3	3	1	2/3
	b	**PK**	2/3	2	3	3	1	2/3
VI	**a**	**A**	1	1	1	2	1	1
	b	**A**	1/2	1	1	1	1	1
VII	**a**	**PK**	2	2	2	2	1	2
	b	**PK**	2	2	2	2	1	2
	c	**PK**	2	2	2	2	1	2
	d	**PK**	2	2	2	2	1	2
VIII	**a**	**PK**	2/3	3	2	3	2	1
	b	**PK**	2/3	3	2	3	2	1
	c	**PK**	2/3	3	2	3	2	1
IX	**a**	**K**	---	---	1	1	---	1
	b	**K**	1	1	1	1	1	1
	c	**K**	---	---	1	1	---	1
	d	**K**	---	---	1	1	---	1
X		**PK**	3	2/3	3	2/3	1	1
XI	**a**	**PK**	1	1	1	1	1/2	1
	b	**PK**	1	1	1	1	1	1
XII		**PK**	1	1	1	1	1/2	1
XIII		**PK**	1/2	1	1	1/2	2/3	2/3
XIV		**PK**	2/3	1	1/2	1	2/3	1
XV		**PK**	1	1	1/2	1	2	1
XVI		**PK**	1/2	1	1	1	1/2	1
XVII		**PK**	1/2	1	1/2	1	1/2	1
XVIII	**a**	**PK**	1	1	1	1	1	1
	b	**PK**	1	1	1	1	1	1
	c	**PK**	1	1	1	1	1	1
	d	**KŠ**	1	1	1	1	1	1
	e	**KŠ**	1	1	1	1/2	1	1/2

	f	**KŠ**	1	1	1/2	1	1/2	1
XIX	**a**	**PK**	1	1	1	1	1	1
	b	**BS**	2	1	---	3	1/2	3
XX	**a**	**BS**	2	1	---	3	1/2	2/3
	b	**PK**	1	1	1	1	1/2	1
	c	**KŠ**	1	1	---	3	2	1
	d	**KŠ**	1	1	1/2	2	2	1
XXI		**PK**	1	1	1	1	2	1
XXII		**PK**	1	1	1	1	2/3	1
XXIII	**a**	**PK**	1	1	1	1	2	1
	b	**PK**	1	1	1	1	1/2	1
	c	**PK**	---	----	1/2	1	1/2	1
XXIV	**a**	**PK**	1	1	1	1	1	1
	b	**PK**	1	1	1	1	1	1
XXV	**a**	**PK**	1	1	1	1	1	1/2
	b	**PK**	1	1	1	1	1	1
XXVI	**a**	**PK**	1	1	1	1	1	1/2
	b	**PK**	1	1	1	1	1	1
XXVII	**a**	**PK**	1	1	1	1	1	1
	b	**PK**	1	1	1	1	1	1
XXVIII	**a**	**PK**	1/2	1	1	1	1/2	1
	b	**PK**	1	1	1	1	2/3	1
XXIX	**a**	**PK**	1	1	1	1	2/3	1
	b	**PK**	1	1	1	1	2/3	1

5.4.2 Hodnocení sond pro analýzu FISH

Po každém odečtu jsem vždy zaznamenala své subjektivní hodnocení užité sondy. Hodnocena byla konkrétně intenzita signálu a výskyt nespecifických signálů u sondy značené konkrétním fluorochromem. Kritéria pro hodnocení jsou uvedena v tabulce 5.6 a hodnocení jednotlivých preparátů je uvedeno v tabulce 5.7. V tabulkách 5.8 a 5.9 jsou pak prezentována souhrnná hodnocení centromerických a lokus specifických sond pouze s ohleden na fluorochromy užitými k jejich značení. V případě, že dané aspekty vykazovaly nehomogenitu napříč odečítaným polem, je tato skutečnost zaznamenána v podobě zlomku.

Tab. 5.6. Kritéria pro hodnocení sond a jejich číselné vyjádření.

Číselné hodnocení	**Hodnocené kritérium**
	Intenzita signálu
1	Velmi dobře hodnotitelné signály.
2	Vizuálně hůře hodnotitelný signál, po nasnímání velmi kvalitní.
3	Vizuálně nehodnotitelný signál, po nasnímání a základní úpravě hodnotitelný.
4	Signál hodnotitelný pouze po nasnímání a úpravě, celkově velmi slabý.
5	Signál není hodnotitelný ani po nasnímání.

	Nespecifické signály
1	Nespecifické signály nejsou přítomny.
2	Nespecifické signály jsou přítomny, ale jsou slabé a snadno odlišitelné.
3	Nespecifické signály jsou přítomny, mají intenzitu odpovídající vyšetřovaným signálům.

Tab. 5.7. Hodnocení sond u konkrétních preparátů. Neprokázaný nebo nehodnocený signál je označen ---. Použité zkratky: DEAC – Diethylaminocoumarin, FITC - Fluorescein izothiokyanát, TR – Texas red, SpO – SpectrumOrange, SG – SpectrumGreen.

Označení vzorku		Vyšetřovaný lokus	Výrobce sondy	Fluorochrom	Intenzita signálu	Nespecifické signály
I	**a**	DXZ1	Cytocell	FITC	1	1/2
		DYZ3		TR	---	1
	b	DXZ1	Abbott	SG	1	1/2
		KAL		SpO	1	1
II	**a**	DXZ1	Cytocell	FITC	1	1/2
		DYZ3		TR	---	1
	b	DXZ1	Abbott	SG	1	1
		KAL		SpO	1/2	1
III	**a**	DXZ1	Cytocell	FITC	1/2	1
		DYZ3		TR	---	1
	b	DXZ1	Abbott	SG	1	1
		KAL		SpO	1	1
IV	**a**	DXZ1	Cytocell	FITC	3/4	2/3
		DYZ3		TR	---	1
	b	DXZ1	Abbott	SG	1	2/3
		KAL		SpO	1	1
V	**a**	DXZ1	Cytocell	FITC	3/4	1/2
		DYZ3		TR	---	1
	b	DXZ1	Abbott	SG	1	2
		KAL		SpO	1	1
VI	**a**	DXZ1	Kreatech	PlatinumBright495	2	1
		XIST		PlatinumBright550	2	1
	b	DXZ1	Kreatech	PlatinumBright495	1	1
		XIST		PlatinumBright550	1	1
		SHOX		PlatinumBright550	1	1
VII	**a**	DXZ1	Abbott	SG	1	2
		KAL		SpO	1	1
	b	DXZ1	Kreatech	PlatinumBright495	1	1
		SHOX		PlatinumBright550	1	1
	c	DXZ1	Kreatech	PlatinumBright495	1	1/2
		XIST		PlatinumBright550	1	2
	d	AR	Abbott	SpO	1	1
VIII	**a**	DXZ1	Cytocell	FITC	1	1
		DYZ3		TR	---	1
	b	DXZ1	Abbott	SG	1	1
		KAL		SpO	3/4	1
	c	AR	Abbott	SpO	3/4	1

IX	**a**	---	MetaSystems	---	---	---
	b	D17Z1	Cytocell	TR	1	1
	c	RAI1	Cytocell	FITC	1	1
		LIS1		TR	1	1
	d	NF1	Cytocell	TR	1	1
		17ptel		FITC	1	1
X		D17Z1	Kreatech	FITC	1	1
		TOP2a		SpO	1	1
XI	**a**	D17Z1	MetaSystems	FITC	1	1
	b	D17Z1	MetaSystems	SpO	1	2
XII		DXZ1	Cytocell	DEAC	1	1
		SHOX		TR	1	1
		DYZ1		FITC	---	1/2
XIII		DXZ1	Cytocell	DEAC	1/2	1
		SHOX		TR	2	1
		DYZ1		FITC	---	1/2
XIV		18ptel	Cytocell	FITC	1	2
		18qtel		TR	1	1
XV		18ptel	Cytocell	FITC	1/2	2/3
		18qtel		TR	1/2	1
XVI		18ptel	Cytocell	FITC	2	2
		18qtel		TR	2	1
XVII		TUPLE 1	Cytocell	TR	1/2	1
		N85A3		FITC	3	2/3
XVIII	**a**	DXZ1	Cytocell	FITC	1	1/2
		DYZ3		TR	1	1
	b	LSI 21	Abbott	SpO	1	1
	c	DXZ1	Cytocell	FITC	1	1/2
		DYZ3		TR	1	1
		LSI 21	Abbott	SpO	1	1
	d	DXZ1	Cytocell	FITC	1	1/2
		DYZ3		TR	1	1
	e	LSI 21	Abbott	Spo	1	1
	f	DXZ1	Cytocell	FITC	1	1/2
		DYZ3		TR	1	1
		LSI 21	Abbott	SpO	1/2	1
XIX	**a**	DXZ1	Cytocell	DEAC	1/2	1
		SHOX		TR	2	1
		DYZ1		FITC	---	---
	b	DXZ1	Cytocell	DEAC	3/5	2
		SHOX		TR	3/5	2
		DYZ1		FITC	---	2
XX	**a**	D3Z1	Cytocell	TR	2/5	1
	b	D3Z1	Cytocell	TR	2/5	1
	c	D3Z1	Cytocell	TR	1/4	2/3
	d	D3Z1	Cytocell	TR	1/4	2/3
XXI		DXZ1	Cytocell	DEAC	1/2	1/2
		SHOX		TR	1	1
		DYZ1		FITC	---	3

XXII		DXZ1	Cytocell	DEAC	1/2	1/2
		SHOX		TR	1	1/2
		DYZ1		FITC	---	3
XXIII	**a**	DXZ1	Cytocell	FITC	1	1/2
		DYZ3		TR	---	1
		D18Z1		DEAC	---	---
	b	Xptel/Yptel	Cytocell	TR	1	1
		Xqtel/Yqtel		FITC	1	1/2
		DXZ1	Abbott	SpO	1	1
	c	DXZ1	Kreatech	PlatinumBright495	1	1/2
		XIST		PlatinumBright550	1	1
XXIV	**a**	DXZ1	Cytocell	FITC	1	1/2
		DYZ3		TR	---	1
		D18Z1		DEAC	---	---
	b	DXZ1	Kreatech	PlatinumBright495	1	1
		SHOX		PlatinumBright547	2/3	1
XXV	**a**	DXZ1	Cytocell	FITC	1	1/2
		DYZ3		TR	---	1
		D18Z1		DEAC	---	---
	b	DXZ1	Kreatech	PlatinumBright495	1	1
		SHOX		PlatinumBright547	2/3	1
XXVI	**a**	DXZ1	Cytocell	FITC	1	2/3
		DYZ3		TR	---	1
		D18Z1		DEAC	---	---
	b	DXZ1	Kreatech	PlatinumBright495	1	1
		XIST		PlatinumBright547	2/3	1
XXVII	**a**	D13Z1/D21Z1	Cytocell	TR	1	1
	b	LSI 21	Abbott	SpO	1	1
XXVIII	**a**	DXZ1	Cytocell	FITC	1	1/2
		DYZ3		TR	---	1
		D18Z1		DEAC	---	---
	b	DXZ1	Abbott	SG	1	1/2
		KAL		SpO	1	1/2
XXIX	**a**	DXZ1	Cytocell	FITC	1	2
		DYZ3		TR	---	1
		D18Z1		DEAC	---	---
	b	DXZ1	Abbott	SG	1	2
		KAL		SpO	1	1/2

Tab. 5.8. Hodnocení centromerických sond u konkrétních preparátů. Nezaznamenaný signál pro konkrétní hodnocení je označen ---. Použité zkratky: DEAC – Diethylaminocoumarin, FITC - Fluorescein izothiokyanát, TR – Texas red, SpO – SpectrumOrange, SG – SpectrumGreen.

	Centromerické sondy [počet preparátů se zaznamenaným hodnocením]					
	DEAC	**FITC**	**TR**	**SpO**	**SG**	**PlatinumBright495**
Hodnocení	**Intenzita signálu**					
1	1	15	6	2	9	7
1/2	4	1	---	---	---	---

2	---	---	---	---	---	1
2/3	---	---	---	---	---	---
3	---	1	---	---	---	---
3/4	---	1	---	---	---	---
4	1	---	---	---	---	---
4/5	---	---	---	---	---	---
5	---	---	---	---	---	---
2/5a*	---	---	2	---	---	---
1/4a*	---	---	2	---	---	---
Hodnocení	**Nespecifické signály**					
1	3	5	22	1	3	6
1/2	2	13	---	---	2	2
2	1	2	---	1	3	---
2/3	---	2	2	---	1	---
3	---	2	---	---	---	---
3/4	---	---	---	---	---	---
4	---	---	---	---	---	---
4/5	---	---	---	---	---	---
5	---	---	---	---	---	---

Tab. 5.9. Hodnocení sond u konkrétních preparátů. Nezaznamenaný signál pro konkrétní hodnocení je označen ---. Použité zkratky: DEAC – Diethylaminocoumarin, FITC - Fluorescein izothiokyanát, TR – Texas red, SpO – SpectrumOrange, SG – SpectrumGreen.

	Lokus specifické sondy [počet preparátů se zaznamenaným hodnocením]			
	FITC	**TR**	**SpO**	**PlatinumBright550**
Hodnocení	**Intenzita signálu**			
1	2	5	12	5
1/2	1	2	2	---
2	1	2	---	1
2/3	---	---	---	3
3	1	---	---	---
3/4	---	---	2	---
4	---	1	---	---
4/5	---	---	---	---
5	---	---	---	---
Hodnocení	**Nespecifické signály**			
1	---	8	14	8
1/2	1	1	2	---
2	2	1	---	1
2/3	2	---	---	---
3	---	---	---	---
3/4	---	---	---	---

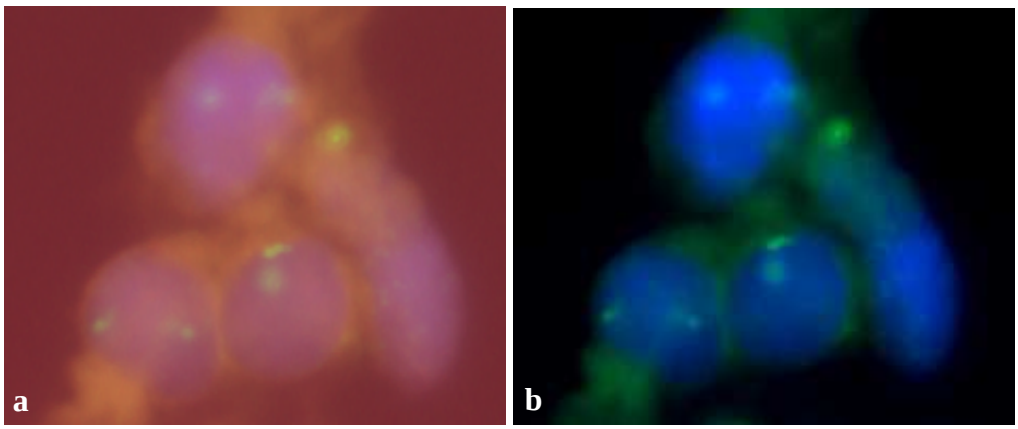
4	---	---	---	---
4/5	---	---	---	---
5	---	---	---	---

5.4.3 Nejvýznamnější faktory ovlivňující kvalitu výsledků FISH

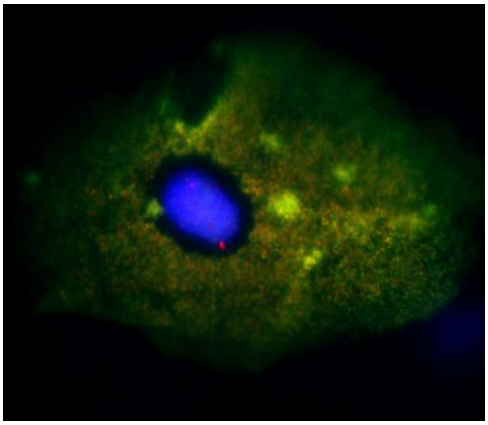
V této části budou na konkrétních příkladech uvedeny faktory ovlivňující konečné hodnocení analýzy FISH. Prezentované nálezy mohou negativně ovlivnit vlastní odečet preparátu, a proto by měly být vždy brány v úvahu. Některé další kritické aspekty této analýzy, týkající se například vhodného výběru sond, budou nastíněny i v rámci vybraných kazuistik.

A) Cytoplazma

Cytoplazma může znemožnit vlastní odečet preparátu tím, že překryje hodnocená interfázní jadra či metafázní chromozomy. Na nich pak nelze hodnotit počet signálů vyšetřovací sondy. U některých tkání ji lze minimalizovat výměnou fixace. Preparáty ze vzorků bukálních stěrů cytoplazmu obsahují vždy.



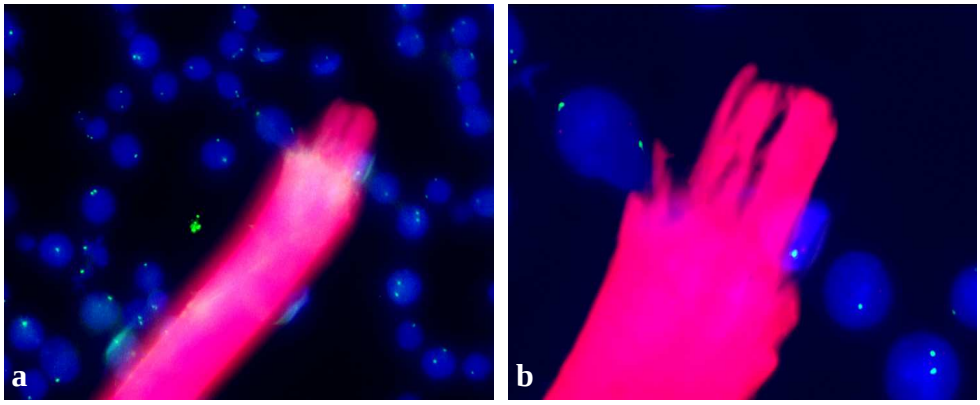
Obr. 5.1. Pohled na interfázní jádra lymfocytů periferní krve překrytá nánosem cytoplazmy a) po nasnímání a b) po základní úpravě. Na obrázku b) je patrná ztráta signálů centromerické sondy i přes nedostatečnou úpravu snímku. Vzorek Va, vyšetřovaný lokus: DXZ1 (FITC) a DYZ3 (TR).



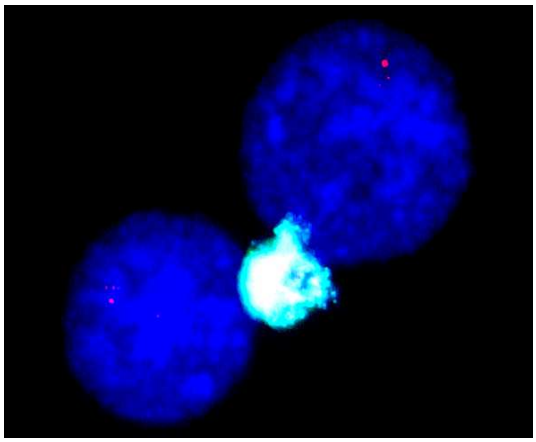
Obr. 5.2. Pohled na interfázní jádro vzorku bukálního stěru obklopené cytoplazmou před základní úpravou. Vzorek XIXb, vyšetřovaný lokus: DXZ1 (DEAC), SHOX (TR), DYZ3 (FITC).

B) Nečistoty

Nečistoty vydávající silnou fluorescenci znemožňují odečet signálů ze struktur nacházejících se v jejich blízkosti.



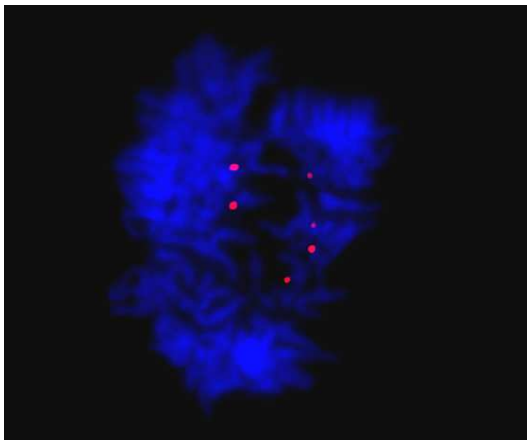
Obr. 5.3. Pohled na vlákno a); b) vydávající silnou fluorescenci ve vlnových délkách SpO neumožňuje odečet signálů lokus specifické sondy u interfázních jader lymfocytů periferní krve v pozadí. Vzorek VIIIb, vyšetřovaný lokus: DXZ1 (SG), KAL (SpO).



Obr. 5.4. Pohled na interfázní jádra lymfocytů periferní krve, na nichž není možno pozorovat signály subtelomerické sondy nasedající na region 18ptel kvůli přítomnosti nečistoty vydávající silnou fluorescenci. Vzorek XVI, vyšetřovaný lokus: 18ptel – D18S552 (FITC), 18qtel – D18S1390 (TR).

C) Struktury dělících se buněk

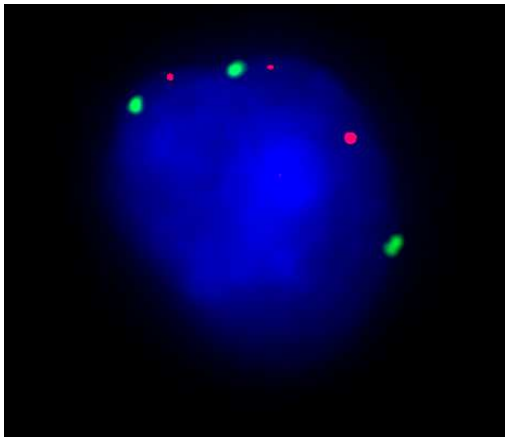
U dělících se interfázních jader dochází ke zdvojnásobení signálů. Dělící se mitózy lze obvykle dobře odlišit, protože se chromozomy nachází ve více či méně kondenzovaném stavu.



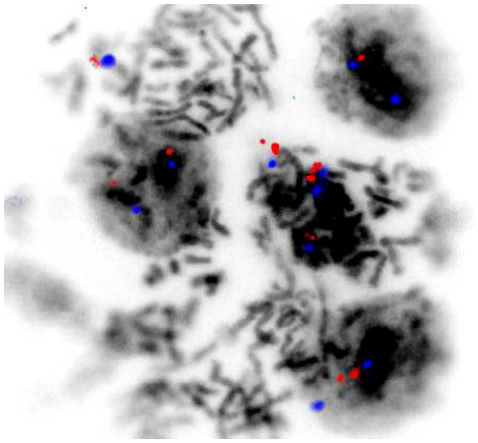
Obr. 5.5. Pohled na mitózu ze vzorku periferní krve u pacienta s trizomií chromozomu 21, Celkem je pozorováno šest signálů sondy LSI 21. Vzorek XVIIIb, vyšetřovaný lokus: D21S259, D21S341, D21S342 (SpO).

D) Překryv struktur

Překryv struktur preparátu může být nesprávně interpretován jako nález další buněčné linie, a to v případě překryvu dvou interfázních jader nebo jader a mitóz. K podobné desinterpretaci může dojít i při sloučení dvou a více mitóz, u nichž není patrná různá míra kondenzace chromozomů.



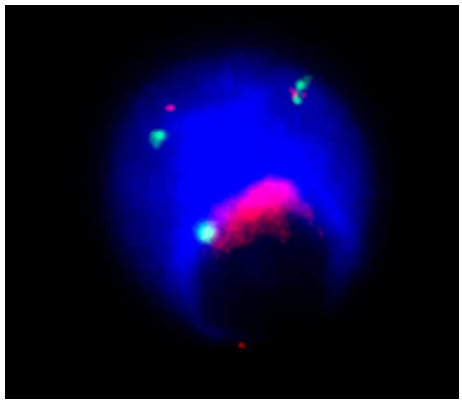
Obr. 5.6. Pohled na překrývající se interfázní jádra lymfocytů periferní krve. V tomto případě může být nález na snímku nesprávně interpretován jako buněčná linie 47,XXX. Vzorek IIb, vyšetřovaný lokus: DXZ1 (SG), KAL (SpO).



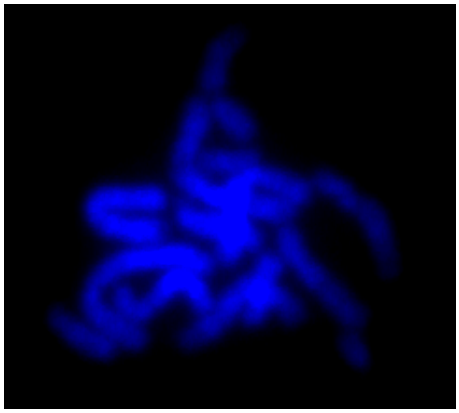
Obr. 5.7. Pohled na překrývající se interfázní jádra a mitózy lymfocytů periferní krve. V tomto případě nelze spolehlivě určit, zda se dané signály nalézají na interfázním jádře či chromozomu mitózy. Vzorek XXI, vyšetřovaný lokus: DXZ1 (DEAC), SHOX (TR), DYZ1 (FITC).

E) Nekompletní a poškozené figury

Nekompletní mitózy i poškozená interfázní jádra by měla být z hodnocení vyloučena vždy. Nelze u nich s jistotou vyloučit, že v daném místě nechybí signál sond, který by vyvrátil či potvrdil námi přijatý závěr.



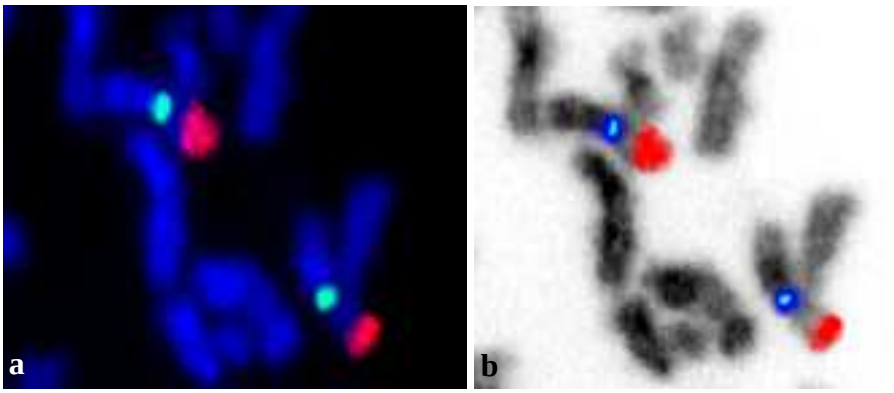
Obr. 5.8. Pohled na poškozené interfázní jádro lymfocytu periferní krve. Vzorek XXVb, vyšetřovaný lokus: DXZ1 (PlatinumBright495), SHOX (PlatinumBright547).



Obr. 5.9. Pohled na nepochybně nekompletní mitózu ze vzorku periferní krve. Vzorek XXIVb, vyšetřovaný lokus: DXZ1 (PlatinumBright495), SHOX (PlatinumBright547).

F) *Bleed through*

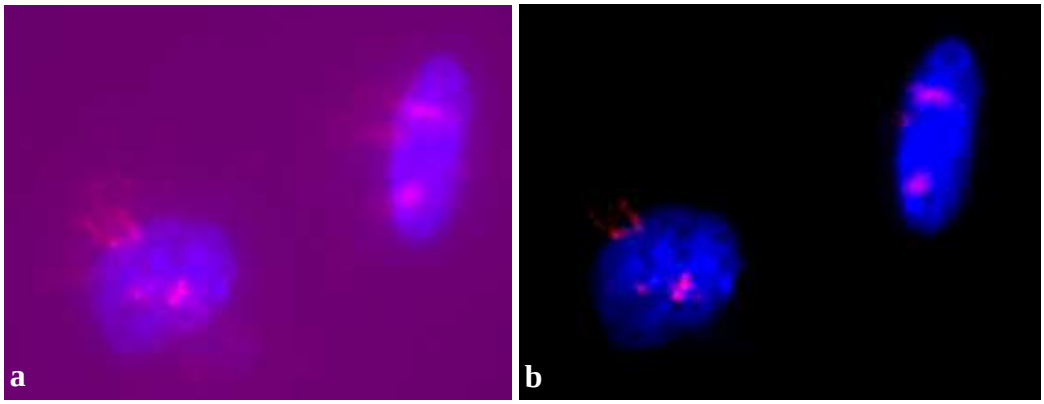
Termín *bleed through* popisuje jev, při němž fluorochrom emituje fluorescenci, kterou vyvolává excitační záření vymezené filtrem pro jiný fluorochrom a které prochází skrze bariérový filtr stejné sady. Tento fenomén byl pozorován mezi sondami značenými fluorochromy DEAC a FITC a mezi sondami značenými fluorochromy SpO a TR.



Obr. 5.10. Pohled na mitózu z preparátu lymfocytů periferní krve. Na prvním snímku a) jsou patrné zelené a červené signály. Po převedení snímku do revertovaných barev b), kvůli zobrazení sondy značené fluorochromem DEAC, je patrné, že se ve skutečnosti jedná o signály X-centromerické sondy nikoliv o sondu nasedající k centromeře chromozomu Y. Vzorek XXI, vyšetřovaný lokus: DXZ1 (DEAC), SHOX (TR), DYZ1 (FITC).

G) Rozpad sondy

Rozpad sondy značně ovlivňuje výpovědní hodnotu vyšetření. Obvykle k němu dochází až po určité době, při nevhodném skladování vzorku nebo opakovaném prohlížení preparátu pod fluorescenčním mikroskopem. Někdy tento jev závisí i na typu vzorku, například vzorky bukálních stěrů vykazují výrazně nižší kvalitu během několika málo dnů či týdnů.



Obr. 5.11. Pohled na interfázní jádra bukálního stěru. První obrázek a) zachycuje rozpad sondy na neupraveném snímku. Druhý snímek b) představuje stejná jádra po nedotažené základní úpravě. Na pravém jádře je patrná ztráta možného signálu. Vzorek XXa, vyšetřovaný lokus: D3Z1 (TR).

5.4.4 Hodnocení kvality array CGH

Kvalitu konečných výstupů metody array CGH lze vyhodnotit jednak vizuálně, jednak pomocí automaticky vygenerovaných dat. Tato data zahrnují: standardní odchylku (*Standard deviation* – SD) vyjadřující míru rozptylu Log poměrů mezi sondami jednoho pole, derivovaný poměr logaritmů (*Derivative Log ratio* – DLR) mezi dvojicemi sousedních sond, poměr intenzit signálu k pozadí (*Signal to backround ratio* – SBR) a střední hodnoty intenzit signálů obou fluorochromů. U velmi kvalitních vzorků by hodnota SD měla být nižší než 0,17, DLR nižší než 0,22, SBR vyšší než 3. Poslední veličinu představuje amplituda, která by měla rovnoměrně kolísat mezi signály obou fluorochromů, její hodnoty závisí na užitém skeneru (BlueGnome Ltd. 2012b).

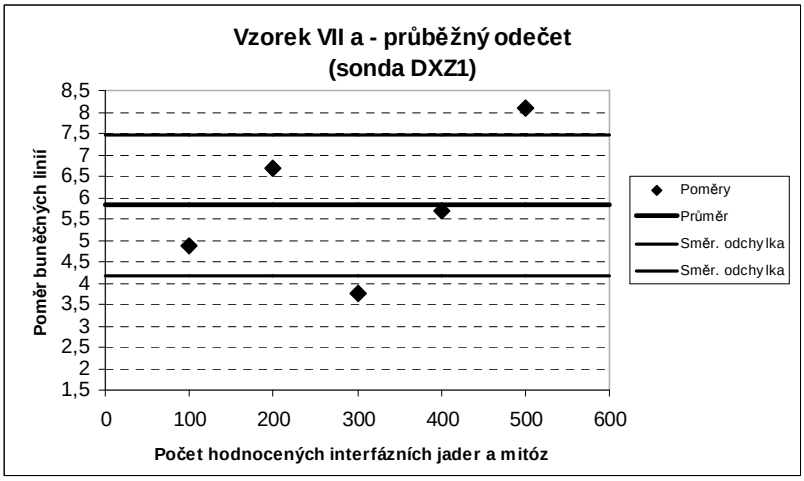
Tab. 5.10. Hodnocení kvality výstupů array CGH. Použité zkratky: SD – *Standard deviation*, LDR – *Derivative Log ratio*, SBR – *Signal to backround ratio.*

Vzorek	SD	DLR	SBR	Amplituda	Kvalita
VIII	0,13/0,12	0,21/0,19	22,60/24,82	1863,37/2353,26	Dostačující
IX	0,18/0,17	0,28/0,26	11,17/16,50	966,90/2013,96	Dostačující
XIV	0,10/0,09	0,15/0,14	13,69/11,84	1176,81/1716,06	Dostačující

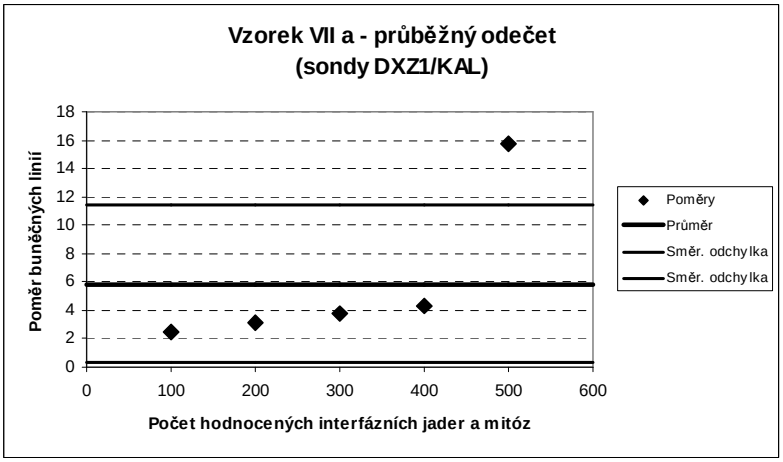
5.4.5 Hodnocení proměnlivosti zastoupení buněčných linií při FISH

Pro zhodnocení proměnlivosti zastoupení buněčných linií během odečtu byla připravena trojice preparátů s kombinací lokus specifické a centromerické sondy od jednoho pacienta. Konkrétně se jedná o pacientku VII, u níž byly zaznamenány dvě buněčné linie – linie 45,X a linie 46,XX. Každý z preparátů byl hodnocen dvojím způsobem, nejprve bylo provedeno stanovení buněčných linií na základě odečtu signálů centromerické sondy a následně na základě odečtu kombinace obou sond. Hodnoty byly zaznamenány po stu odečtených struktur, celkem bylo odečteno přesně 500 hodnotitelných interfázních jader či mitóz. Zastoupení linií bylo dáno do poměru, byl vypočten průměr z jednotlivých poměrů a stanoveny hranice pomocí ± směrodatné odchylky. Vše bylo vyneseno v příslušných grafech (obrázek 5.12, 5.13, 5.14, 5.15, 5.16 a 5.17). Na základě získaných celkových výsledků byl vytvořen graf, kde byly navíc vyneseny i hranice prezentované ± hodnotami dvou směrodatných odchylek. Souhrnný graf je prezentován jako obrázek 5.18. Na tomto grafu je patrné, že i když v rámci průběžných odečtů byly zaznamenány rozličné poměry obou buněčných linií, celkové stanovené poměry buněčných linií nestojí v odlehlých hodnotách prezentovaných hranicemi dvou směrodatných odchylek. Preparáty byly standardně odečítány

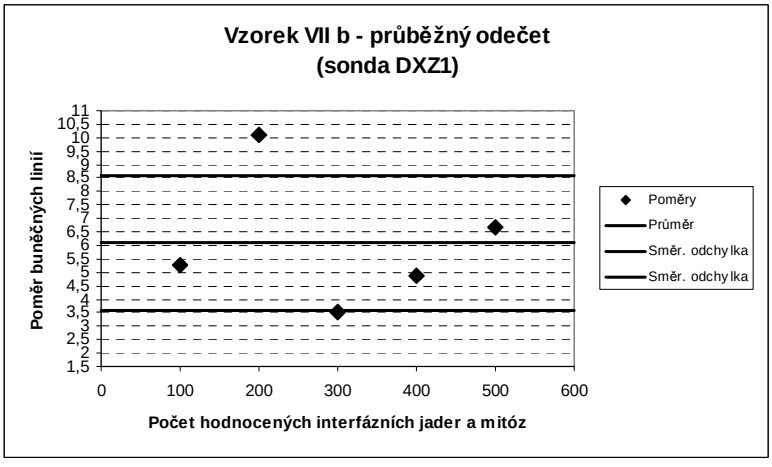
vždy stejně, tj. od levého dolního rohu, takže tímto způsobem byla současně stanovena i proměnlivost opakovaného odečtu preparátu. Celkové výsledky zapsané podle ISCN jsou uvedeny v tabulce 5.1.



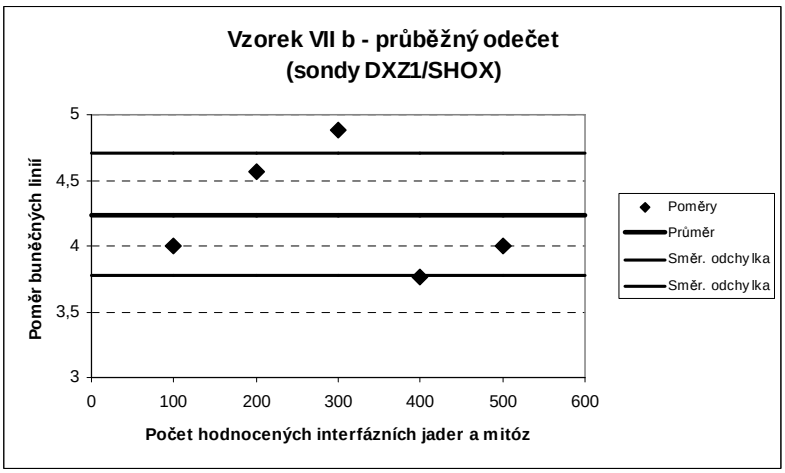
Obr. 5.12. Graf. Vyjádření hodnoty poměrů buněčných linií u vzorku VIIa při odečtu sondy DXZ1.



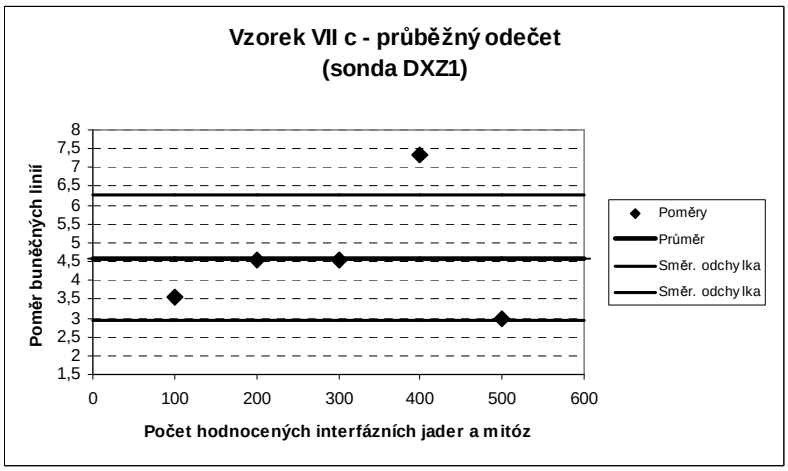
Obr. 5.13. Graf. Vyjádření hodnoty poměrů buněčných linií u vzorku VIIa při odečtu sondy DXZ1a KAL.



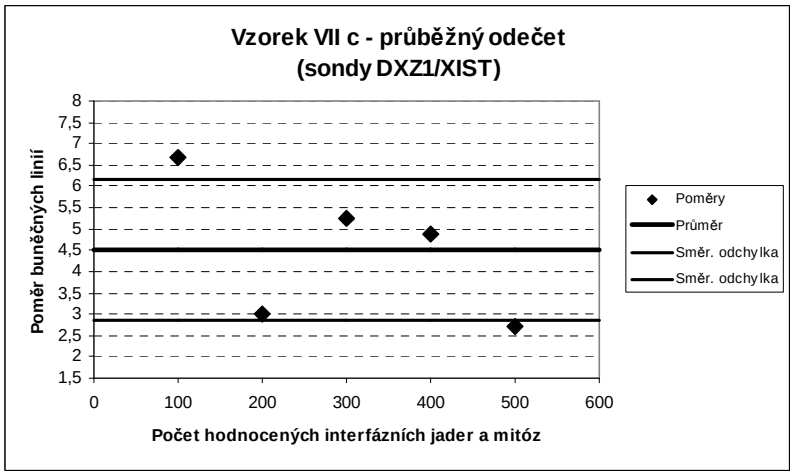
Obr. 5.14. Graf. Vyjádření hodnoty poměrů buněčných linií u vzorku VIIb při odečtu sondy DXZ1.



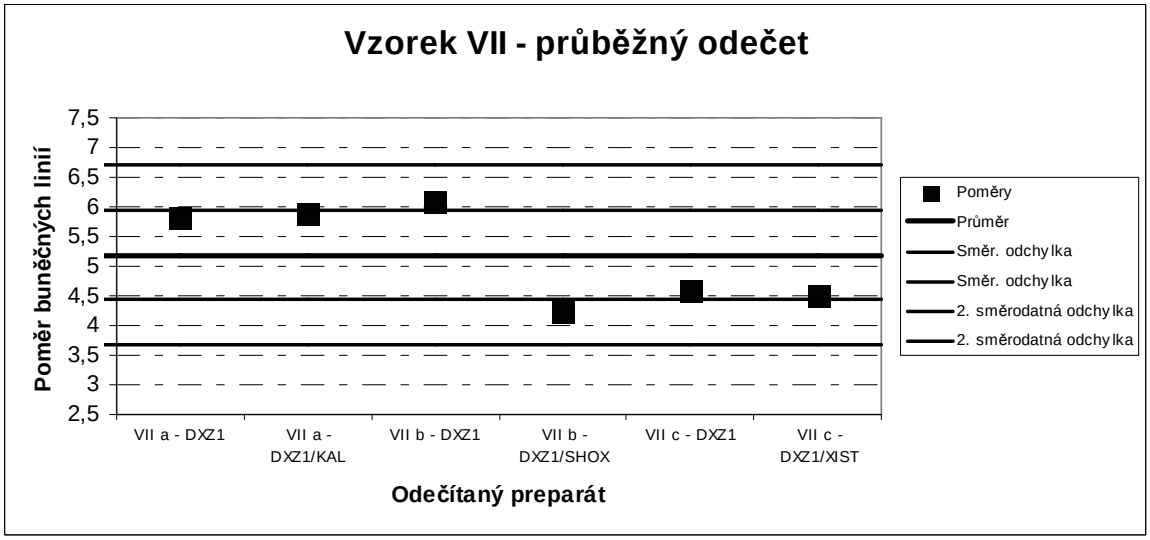
Obr. 5.15. Graf. Vyjádření hodnoty poměrů buněčných linií u vzorku VIIb při odečtu sondy DXZ1 a SHOX.



Obr. 5.16. Graf. Vyjádření hodnoty poměrů buněčných linií u vzorku VIIc při odečtu sondy DXZ1.



Obr. 5.17. Graf. Vyjádření hodnoty poměrů buněčných linií u vzorku VIIc při odečtu sondy DXZ1 a XIST.



Obr. 5.18. graf. Vyjádření celkových hodnot poměrů buněčných linií u vzorku VIIa, VIIb a VIIc při odečtu sond příslušných sond.

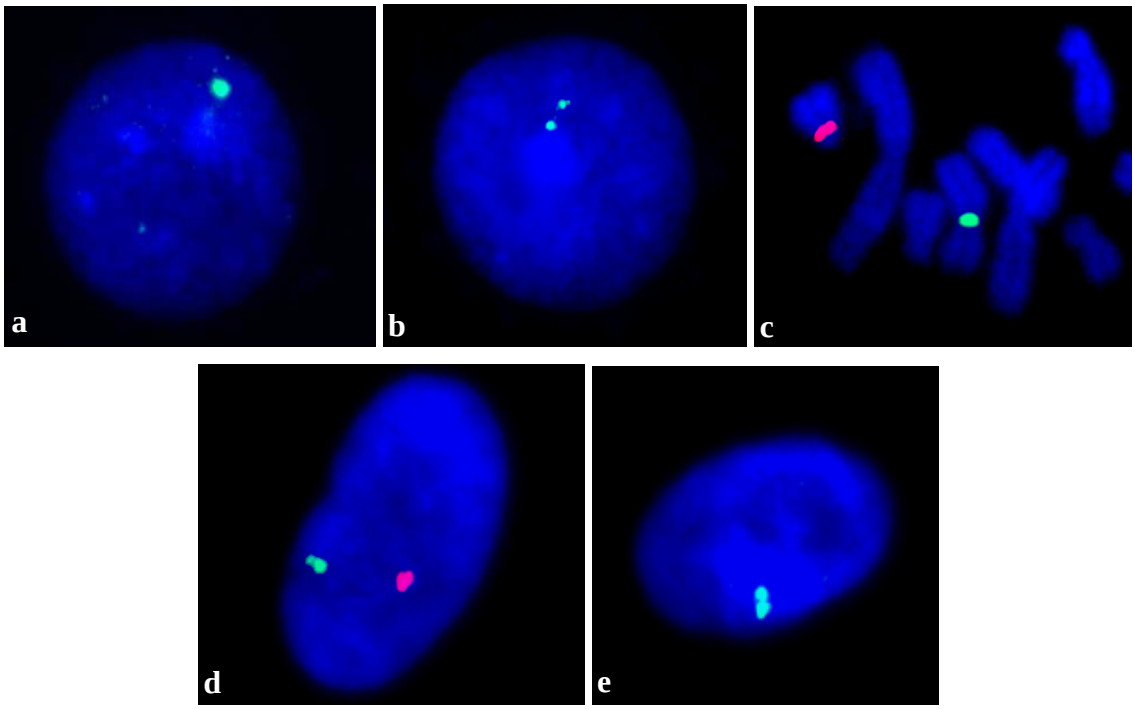
5.5 Kazuistiky vybraných pacientů

5.5.1 Kazuistika pacienta XVIII

Pacient XVIII – chlapec ve věku tří let byl indikován k molekulárně cytogenetickému vyšetření na základě předešlého nálezu mozaicismu během G-pruhování. Analýza prokázala přítomnost dvou buněčných linií, přičemž obě představovaly numerickou aberaci. Linie s trizomií chromozomu 21 i linie s monozomií chromozomu X byla popsána ve dvou tkáních s různým zárodečným původem tj. ve vzorcích periferní krve a biopsie kůže, i když v různém poměru. Pro verifikaci nálezu a přesnější ustanovení zastoupení obou buněčných linií u vzorků z periferní krve i kožního štěpu dále posloužila metoda FISH. Přítomné mitózy byly vždy hodnoceny z hlediska vyšetřovací sondy.

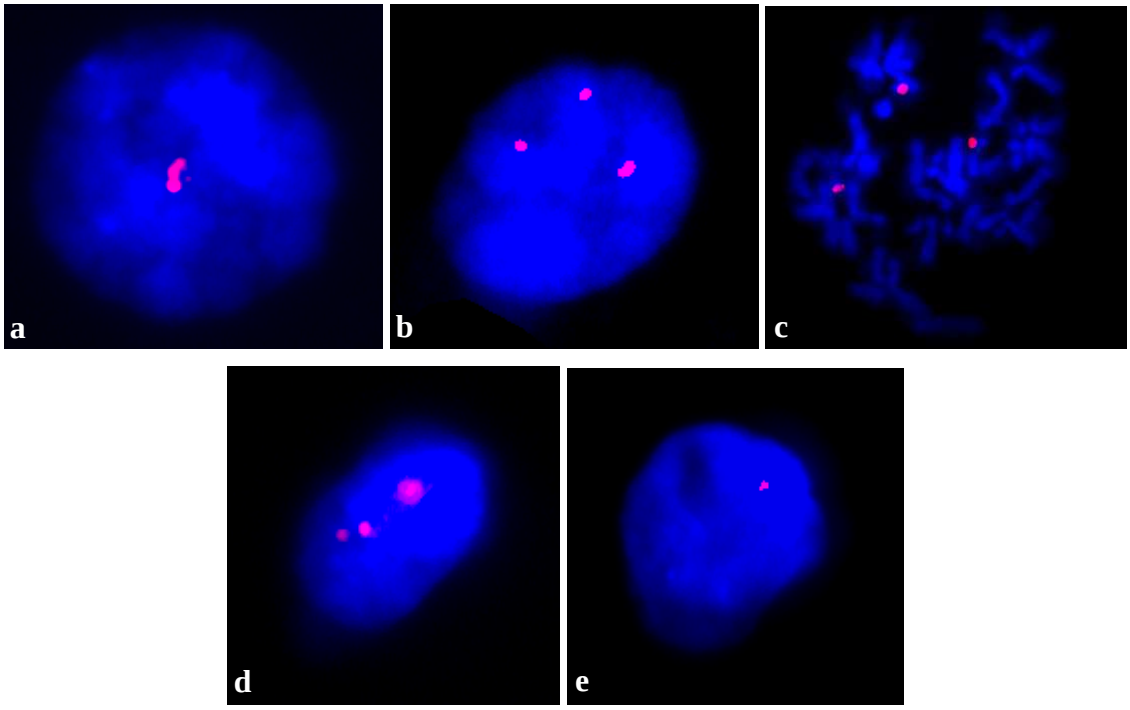
Postup analýzy

V první fázi vyšetření byly nejprve připraveny preparáty z obou tkání se sondami nasedajícími k centromerám obou gonozomů, tj. sondami DXZ1 a DYZ3. U preparátu z lymfocytů periferní krve po zhodnocení 19 mitóz a 503 interfázních jader, byly stanoveny tři předpokládané buněčné linie: 45,X, 46,XX a 46,XY v zastoupení: 45,X~77,20 % / 46,XX~0,38 % / 46,XY~22,41 %. Z preparátu vzorku kultivovaných kožních fibroblastů zastoupení tří buněčných linií po odečtení 13 mitóz a 513 interfázních jader odpovídalo: 45,X~77,19 % / 46,XX~1,14 % / 46,XY~21,67 %.



Obr. 5.19. Interfázní jádra lymfocytů periferní krve nesoucí a) jeden signál sondy DXZ1 (linie 45,X) a b) dva signály sondy DXZ1 (linie 46,XX). c) Část mitózy ze vzorku periferní krve (mimo jiné) s chromozomy Y a X (linie 46,XY). Interfázní jádro fibroblastu d) se signály sond DXZ1 a DYZ3 (linie 46,XY) a e) se signálem sondy DXZ1 (linie 45,X). Vzorek XVIIIa a XVIIId, vyšetřované lokusy: DXZ1 (FITC) a DYZ3(TR).

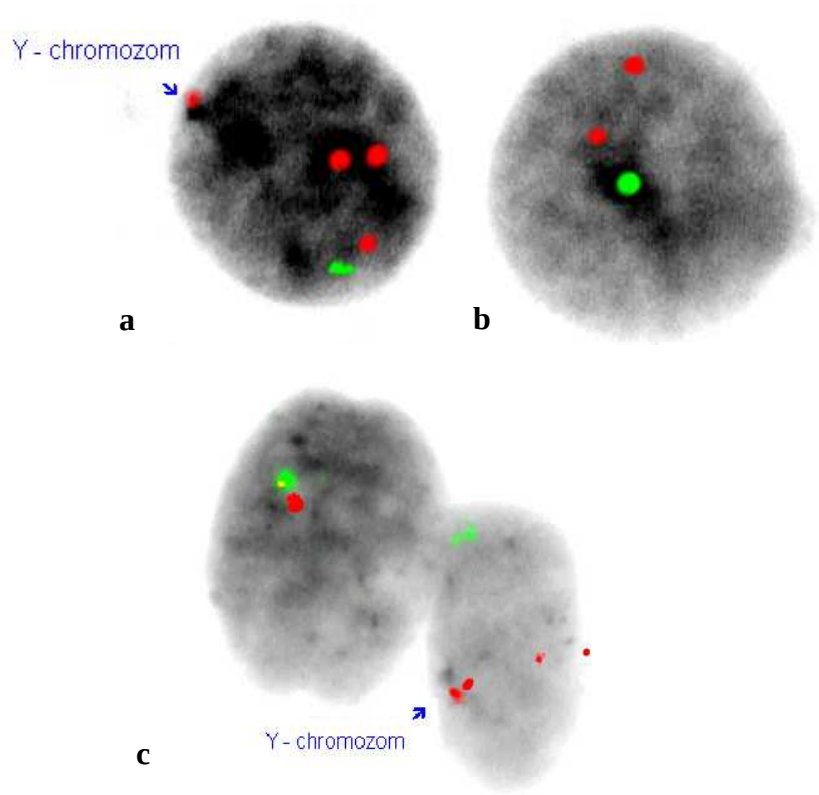
V další fázi analýzy byla aplikována lokus specifická sonda LSI 21, díky níž lze stanovit jednotlivé buněčné linie s trizomií chromozomu 21. Na základě zhodnocení 28 mitóz a 504 interfázních jader bylo vypočteno předpokládané zastoupení tří buněčných linií 47,XY,+21~24,25 % / 45,XY,–21~0,19 % / 46,XY~75,56 %. Třetí buněčná linie s jedním signálem sondy LSI 21 představovala pouze jedno interfázního jádro. I když monozomie chromozomu 21 podle výsledků z odečtu preparátu fibroblastů kožního štěpu byla nalezena u 7 interfázních jader, pokládám za více pravděpodobné, že se jedná o artefakt daný překryvem signálů než o skutečnou buněčnou linii. Vyšší zastoupení této linie přičítám rovněž menší ploše interfázních jader kožního štěpu. Celkové zastoupení buněčných linií u vzorku kožního štěpu – 47,XY,+21~20,85 % / 45,XY,–21~1,29 % / 46,XY~77,86 % – bylo stanoveno na podkladě odečtu 10 mitóz a 532 interfázních jader.



Obr. 5.20. Interfázní jádra lymfocytů periferní krve nesoucí a) jeden signál sondy LSI 21 (linie 45,XY,–21) a b) tři signály sondy LSI 21 (linie 47,XY,+21). c) Mitóza z preparátu periferní krve zobrazující (mimo jiné) tři chromozomy 21 (linie 47,XY,+21). Interfázní jádra fibroblastů z preparátu kožního štěpu nesoucí d) tři signály sondy LSI 21 (linie 47,XY,+21) a e) jeden signál sondy LSI 21 (linie 45,XY,–21). Vzorek XVIIIb a XVIIIe, vyšetřovaný lokus: D21S259, D21S341, D21S342 (SpO).

Předchozí domněnka o nepřítomnosti linie s monozomií chromozomu 21 byla nepřímo potvrzena analýzou třetí dvojice preparátů s kombinací sond nasedajících k oběma gonozomům a lokus specifické sondy LSI 21. U obou preparátů byly nalezeny tři buněčné linie 45,X, 47,XY,+21 a 46,XX, zatímco linie 45,XY,–21 nebyla prokázána ani u jednoho interfázního jádra nebo mitóze. Třetí sada preparátů především posloužila ke konečnému propojení předchozích výsledků. Hodnoty linie 45,X zaznamenané u první sady preparátů odpovídaly linii s dvěma chromozomy 21 druhé sady preparátů. Zatímco linie s jedním chromozomem X a jedním chromozomem Y odpovídala buněčné linii s trizomií chromozomu 21. Konečné zastoupení bylo získáno zhodnocením 521 struktur preparátu z lymfocytů periferní krve, respektive odečtem 518 struktur preparátu kožního štěpu.

Konečný výsledek ze vzorku periferní krve odpovídá následujícím hodnotám: 45,X~72,74 % / 47,XY,+21~26,68 % / 46,XX~0,58 %. Hodnoty získané analýzou fibroblastů kožního štěpu se liší – 45,X~76,83 % / 47,XY,+21~22,39 % / 46,XX~0,77 %, což je fenomén, který byl zaznamenán u celé řady pacientů s mozaicismem.



Obr. 5.21. Interfázní jádra lymfocytů periferní krve nesoucí a) tři signály sondy LSI 21, jeden signál sondy DXZ1 a jeden signál sondy DYZ3 (linie 47,XY,+21) a b) dva signály sondy LSI 21, jeden signál DXZ1, signál sondy DYZ3 není zaznamenán (linie 45,X). c) Interfázní jádra fibroblastů ze vzorku kožního štěpu. Interfázní jádro vlevo nese dva signály sondy LSI 21 a jeden signál sondy DXZ1, signál sondy DYZ3 chybí (linie 45,X). Interfázní jádro vpravo nese tři signály sondy LSI 21, jeden signál sondy DXZ1 a DYZ3 (linie 47,XY,+21). Vzorek XVIIIc a XVIIIf, vyšetřované lokusy: DXZ1 (FITC), DYZ3(TR), D21S259, D21S341, D21S342 (SpO).

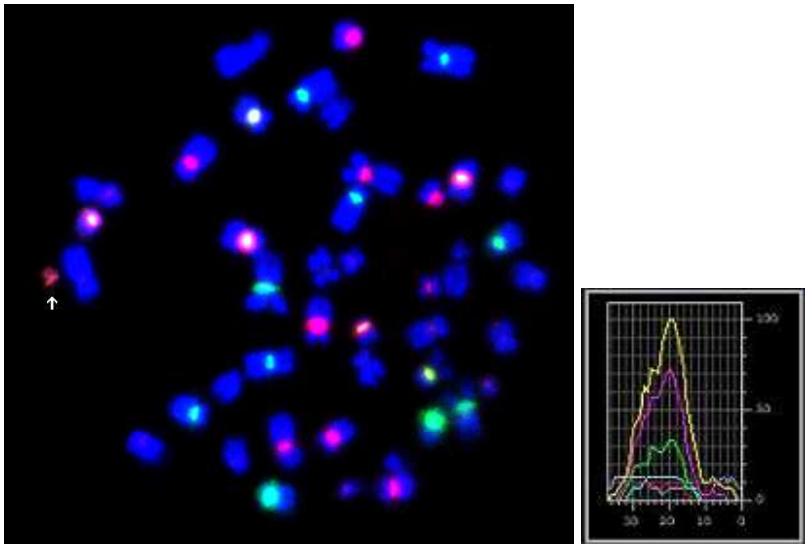
5.5.2 Kazuistika pacienta IX

U pacienta IX – plodu bylo molekulárně cytogenetické vyšetření indikováno na základě vysokého věku obou rodičů v době těhotenství – součet věků ženy (pacientky X) a jejího muže (pacienta XI) překročil hranici 70 let. V historii páru proběhly dvě těhotenství bez komplikací. U ženy byly v minulosti provedeny dvě interrupce na vlastní žádost. Vyšetření karyotypu proběhlo na jiném pracovišti. Plod nesl blíže nespecifikovaný marker. Vzhledem k pokročilé fázi těhotenství bylo, po podepsání informovaného souhlasu, přistoupeno k odběru pupečníkové krve.

Postup analýzy

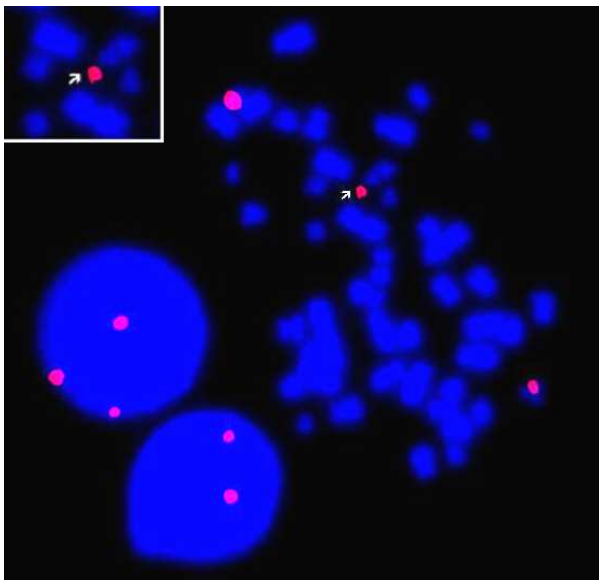
V první fázi vyšetření bylo potřeba identifikovat původ markeru, proto se provedla analýza pomocí mnohobarevné centromerické mFISH podle protokolu firmy MetaSystems. Tento postup umožní rozlišit centromery devatenácti chromozomů (výjimky představují

chromozomy 13, 14, 21, 22 a Y) na základě unikátní kombinace fluorochromů jednotlivých sond. Na základě tohoto vyšetření byl marker chromozom určen jako derivát chromozomu 17.



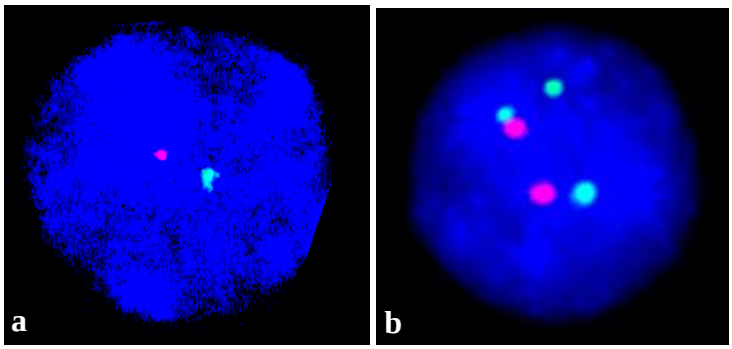
Obr. 5.22. a) Mitóza z preparátu pupečníkové krve. Vlevo uprostřed je patrný marker chromozom označený šipkou. b) Změřené spektrum fluorochromů přítomné sondy odpovídá spektru centromerické sondy pro chromozom 17. Vzorek IXa, centromerická mnohobarevná FISH, snímek pořízený MUDr. Tesnerem. Fotografie je použita s jeho svolením.

Poté následovala kvantitativní analýza. Byl opět připraven preparát ze vzorku získaného kordocentézou, na který se aplikovala sonda nasedající na oblast centromery chromozomu 17, tj. sonda D17Z1. Celkem bylo zhodnoceno 11 mitóz a 504 interfázních jader. Výsledek tohoto vyšetření odpovídal 63,68 % zastoupení buněčné linie 47,XX,+der(17).



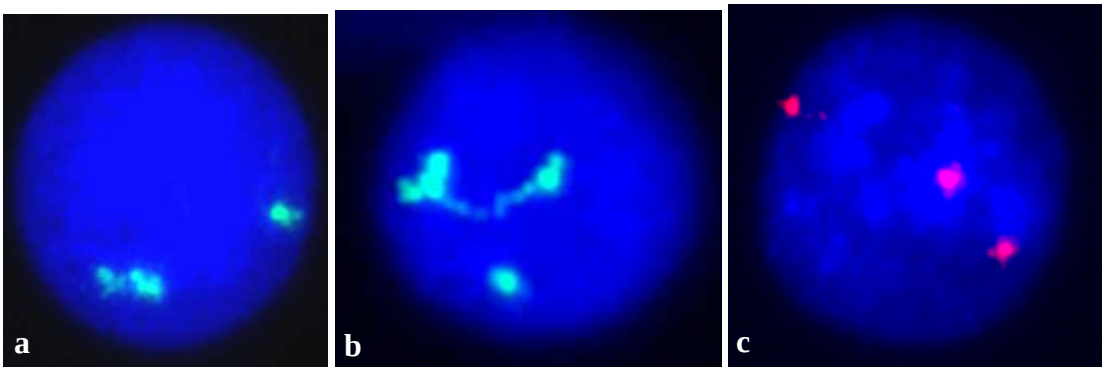
Obr. 5.23. Mitóza a interfázní jádra z preparátu pupečníkové krve. Na mitóze je patrný marker označený šipkou (zvětšeno ve výřezu vlevo nahoře). Každé z interfázních jader prezentuje jednu ze dvou buněčných linií – horní jádro představuje linii 47,XX,+der(17) a spodní linii 46,XX. Vzorek IXb, vyšetřovaný lokus D17Z1 (TR).

Poté bylo provedeno vyšetření vzorků periferní krve od obou rodičů. U pacientky X k této analýze posloužila kombinace sond hybridizující k centromeře chromozomu 17 (D17Z1) a lokusu genu pro topoizomerázu 2 alfa (TOP2A). Aberantní nálezy představovala pouze dvě interfázní jádra, jedno s monozomií chromozomu 17 a jedno se třemi signály sondy D17Z1 a dvěma signály na TOP2A. Vzhledem k tomu, že aberantní nálezy nepřekročily *cut off* hranici 2 % výsledek odpovídal fyziologickému nálezu karyotypu 46,XX.



Obr. 5.24. Interfázní jádra z preparátu periferní krve. a) Interfázní jádro nesoucí jeden signál sondy D17Z1 a jeden signál sondy TOP2A potenciálně odráží monozomii chromozomu 17. b) Interfázní jádro se třemi signály D17Z1 a dvěma signály TOP2A teoreticky představuje linii 47,XX,+der(17). Vzorek X, vyšetřované lokusy D17Z1 (FITC), TOP2A (SpO).

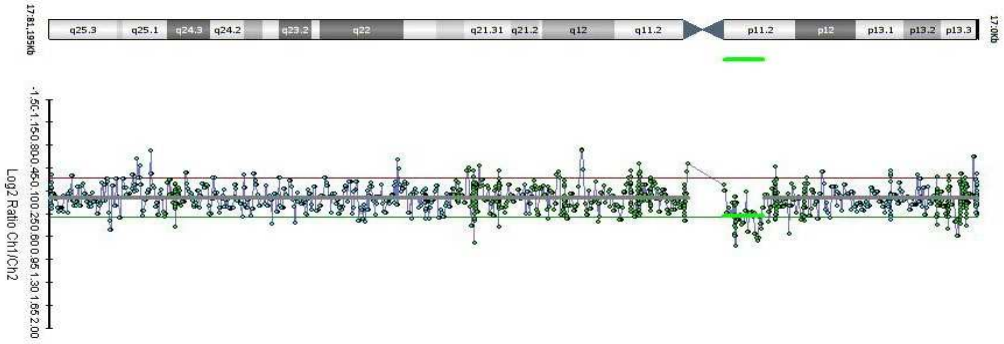
Analýza FISH s aplikací centromerické sondy D17Z1 u pacienta XI podala méně jasné výsledky. Při prvním vyšetření v průběhu analýzy standardního počtu 500 struktur bylo zaznamenáno větší množství interfázních jader se třemi signály, jež by vypovídaly o přítomnosti markeru. Z tohoto důvodu se u preparátu zhodnotilo dvojnásobné množství struktur (celkem 1048). I přes přítomnost četných mitóz, nebyl marker prokázán ani u jedné z nich. Zároveň část signálů u interfázních jader vykazovala překryv, propojení pomocí můstků nebo přílišnou vzájemnou blízkost. Tyto signály se tudíž musely vyhodnotit jako jeden či být úplně vyřazeny jako nehodnotitelné. Výsledek odpovídal teoretickému 0,92 % zastoupení linie s markerem. Z těchto důvodů byla hybridizace zopakována za použití centromerické sondy D17Z1 s rozdílným značením. I přes odečet 527 struktur nebyl opět nalezen marker na mitóze. Výsledek tohoto vyšetření prokázal 1,52 % výskyt linie se třemi signály D17Z1. Přestože závěr při druhém vyšetření hovořil o vyšším zastoupení potenciální aberantní linie, musel být konečný výsledek, kvůli nepřekročení *cut off* hranice, vyhodnocen jako 46,XY.



Obr. 5.25. Interfázní jádra z preparátu periferní krve. a) Interfázní jádro nesoucí signály sondy D17Z1, signál nacházející se vlevo dole byl odečet jako jeden. b) Interfázní jádro se třemi signály sondy D17Z1, které nebylo hodnoceno z důvodu propojení dvou signálů můstkem. c) Tři dobře odlišitelné signály sondy D17Z1, jádro teoreticky představuje linii 47,XX,+der(17). Vzorek XIa a XIb, vyšetřované lokusy D17Z1 (FITC), D17Z1 (SpO).

Nakonec byla metodou FISH orientačně stanovena velikost markeru u vzorku plodu pomocí lokus specifických sond nasedajících na úsek 17p13.3 (představující kritický region pro Miller-Dieker syndrom, konkrétně gen pro destičkový aktivační faktor acetylhydrolázu, isoformu 1B, podjednotku alfa označovaný také jako LIS1), 17p11.2 (představující kritický region Smith-Magenis syndromu, konkrétně gen indukovaný kyselinou retinovou zkráceně RAI1), 17q11.2 (kritický region pro Neurofibromatózu typ 1, gen NF1) a subtelomerický region 17ptel. Pozitivní nález signálu sondy na markeru se potvrdil pouze v úseku 17p11.2. Z podkladů těchto vyšetření vyplývalo, že daný marker neobsahuje dlouhé raménko a koncový úsek krátkého raménka chromozomu 17.

Pro přesné určení rozsahu markeru bylo dále indikováno vyšetření pomocí array CGH. Na základě výsledku analýzy: arr 17p11.2q11.1(18,675,037×2, 18,775,960-22,205,792×2~3, 25,300,229x2), bylo prokázáno, že velikost markeru odpovídá přibližně 6,5 Mb (3,5 Mb tvoří krátké raménko pokryté sondami a 3 Mb region centromery). Oblast krátkého raménka nesla celkem 56 genů, včetně kritických regionů pro Potocki-Lupski syndrom a Smith-Magenis syndrom. Karyotyp plodu obsahoval dva chromozomy X.



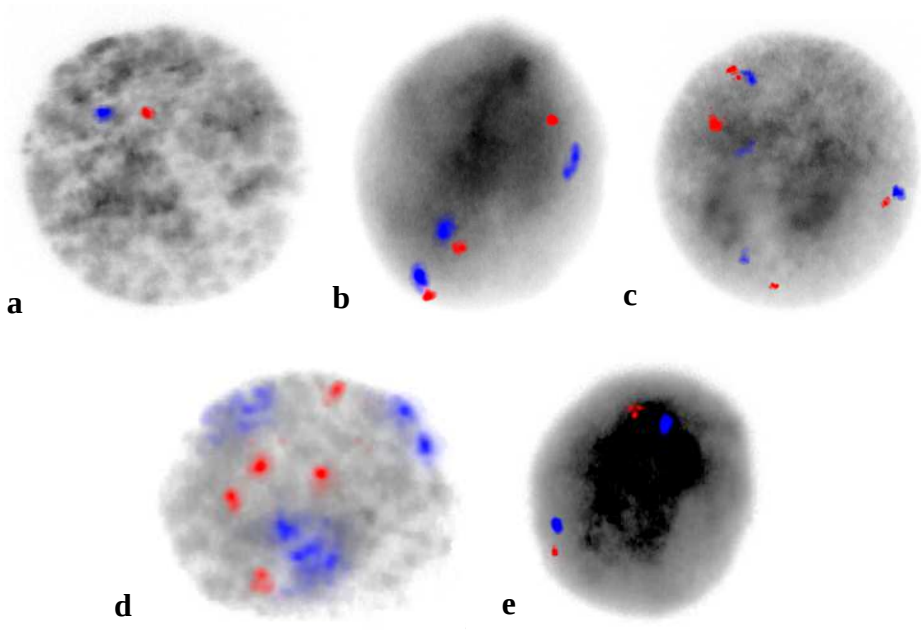
Obr. 5.26. Výstup analýzy array CGH. Část vyznačená zeleně představuje oblast amplifikace signálu vyšetřované DNA, a to na podkladě přítomnosti markeru obsahující dané lokusy. Region centromery není sondami pokryt. Vzorek IX.

5.5.3 Kazuistika pacientky XIX

Pacientka XIX byla k molekulárně cytogenetickému vyšetření indikována pro poruchy reprodukce a infertilitu. Již během analýzy pomocí G-pruhování došlo k nálezu druhé buněčné linie nesoucí tři chromozomy X (tj. 47,XXX). Pro verifikaci nálezu a konečné ustanovení zastoupení buněčných linií se dále využila analýza FISH s kombinací sond k oběma gonozomům a kontrolnímu lokusu genu SHOX.

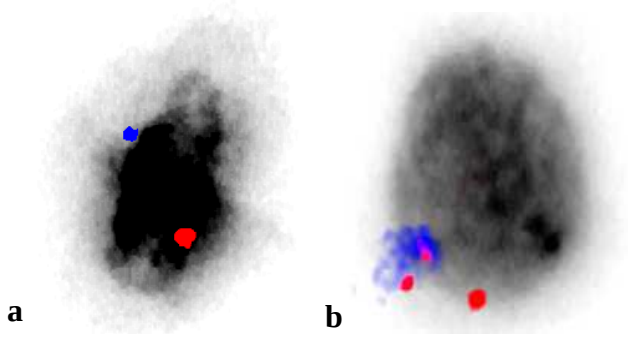
Postup analýzy

Vzorek periferní krve posloužil k získání suspenze kultivovaných lymfocytů, z nichž se připravil preparát. Ten byl hybridizován s výše uvedenou směsí sond. Při odečtu 523 struktur, nebyly zaznamenány ani mitózy s aberantní linií, ani chromozom Y prezentovaný signálem sondy DYZ1 značené fluorochromem FITC. Vyšetření interfázních jader přineslo svědectví o přítomnosti 5 buněčných linií, i když tři z nich se nacházely v nízkém procentu. Konečné zastoupení buněčných linií odpovídá následujícím hodnotám: 45,X~5,74 % / 47,XXX~1,72 % / 48,XXXX~0,38 % / 49,XXXXX~0,19 % / 46,XX~91,97 %. Tyto výsledky zahrnuté ve statistickém hodnocení 2. úrovně plně korelovaly s výsledky klinické části laboratoře ÚBLG.



Obr. 5.27. Interfázní jádra lymfocytů periferní krve nesoucí a) jeden signál sondy DXZ1 a jeden signál sondy SHOX (linie 45,X), b) tři signály sondy DXZ1 i SHOX (linie 47,XXX), c) čtyři signály sondy DXZ1 i SHOX (linie 48,XXXX), d) pět signálů sondy SHOX i přes nižší kvalitu signálů sondy DXZ1 vypovídá o přítomnosti pěti chromozomů X, a tedy jádro představuje linii 49,XXXXX. e) Jádro představující linii 46,XX. Vzorek XIXa vyšetřované lokusy: DXZ1 (DEAC), DYZ1(FITC) a SHOX (TR).

Vzhledem k těmto překvapivým výsledkům přišla indikace stejného vyšetření i u vzorku z tkáně s původem v jiném zárodečném listu – bukálním stěru. Nicméně, kvůli prodlení mezi vyhotovením preparátu a jeho odečtem, klesl počet hodnotitelných interfázních jader na minimum, problém představoval i rozpad sondy a přítomnost cytoplazmy (viz hodnoty v tabulce 5.5). Celkem byly ustanoveny tři buněčné linie s odlišným procentuálním zastoupením – 45,X~4,96 % / 47,XXX~0,83 % / 46,XX~94,21 %. Buněčné linie 48,XXXX a 49,XXXXX nebyly prokázány, což může jednak vyplývat z menšího počtu vyhodnocených struktur, jednak z jejich skutečné nepřítomnosti. Druhý závěr nepřímo potvrzují i výsledky klinické části laboratoře ÚBLG opět zahrnuté ve statistickém hodnocení 2. úrovně.



Obr. 5.28. Interfázní jádra bukálního stěru s aberací nesoucí a) jeden signál sondy DXZ1 a jeden signál sondy SHOX (linie 45,X) a b) tři signály sondy SHOX. Ty i přes rozpad sondy DXZ1 vypovídají o přítomnosti tří chromozomů X. Interfázní jádro představuje linii 47,XXX. Nízká kvalita obou snímků vyplývá z nízké kvality preparátu.Vzorek XIXb vyšetřované lokusy: DXZ1 (DEAC), DYZ1(FITC) a SHOX (TR).

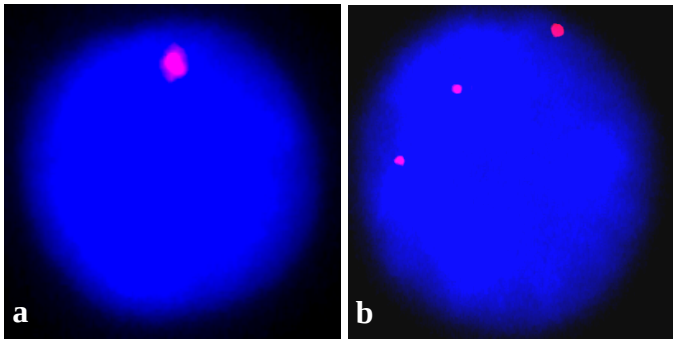
5.5.4 Kazuistika pacienta XXVII

Pacient XXVII – muž s blíže nespecifikovaným fenotypem byl k vyšetření metodou FISH indikován z jiného pracoviště. První analýzou za použití sondy LSI 21 byly ustanoveny tři buněčné linie – linie s monozomií chromozomu 21, trizomií chromozomu 21 a fyziologická linie 46,XY. Pro demonstraci nevhodného užití centromerické sondy k vyšetření aberací chromozomu 21 byl připraven i druhý preparát. Nevýhodou této centromerické sondy je fakt, že nasedá současně i na centromeru chromozomu 13. Podobný fenomén nastává také u sondy, která slouží k vyšetření centromer chromozomů 22 a 14. K oběma analýzám posloužil vzorek periferní krve.

Postup analýzy

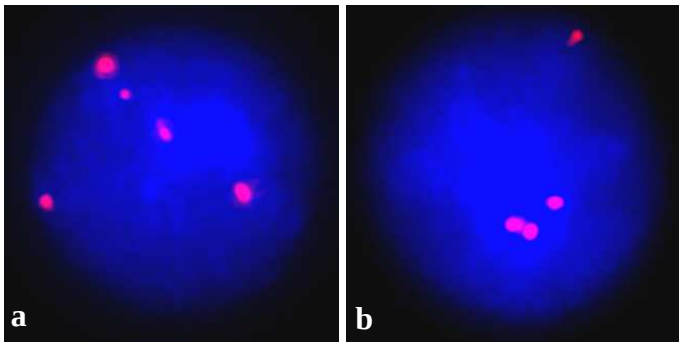
V první fázi analýzy byla na preparát aplikována sonda LSI 21. Tento typ lokus specifické sondy se standardně využívá pro hodnocení numerických aberací chromozomu 21. Konkrétní sonda LSI 21 od firmy Abbott již dříve přinesla dobré výsledky (kvalitní signály) u

pacienta XVIII (viz tabulka 5.7). Ustanovené procentuální zastoupení tří buněčných linií odpovídalo: 45,XY,–21~7,28 % / 47,XY,+21~5,41 % / 46,XY~87,31 %.



Obr. 5.29. Patologické výsledky. Interfázní jádra lymfocytů periferní krve a) nesoucí 1 signál sondy LSI 21 (linie 45,XY,–21) a b) nesoucí tři signály sondy LSI 21 představuje linii 47,XY,+21. Vzorek XVIIb, vyšetřovaný lokus: D21S259, D21S341, D21S342 (SpO).

Na druhý preparát byla aplikována sonda nasedající na centromery chromozomů 13 a 21. Na základě odečtu standardního počtu struktur (celkem 526 interfázních jader a mitóz) bylo ustanoveno procentuální zastoupení tří buněčných linií – 45,XY,–13/21~26,05 % / 47,XY,+13/21~2,47 % / 46,XY~71,48 %. Signály jsem striktně hodnotila podle standardních doporučení, i když se na první pohled jednalo o překrývající se signály nebo signály v těsné blízkosti. Náročnost odečtu zvyšovala i kontrola většího počtu signálů – interfázní jádra 46,XY vykazovala čtyři signály, zatímco interfázní jádra s trizomií chromozomu 21 nesla signálů pět.



Obr. 5.30. a) Interfázní jádro lymfocytu periferní krve nesoucí 5 signálů centromerické sondy (předpokládaná linie 47,XY,+21) a b) interfázní jádro lymfocytu periferní krve, které bylo na podkladu tří signálů hodnoceno jako linie 45,XY,–21, respektive spodní signál je tvořen s největší pravděpodobností dvěma signály ve vzájemné blízkosti (a jádro tak spíše představuje linii 46,XY). Vzorek XVIIa, vyšetřované lokusy: D13Z1/D21Z1(TR).

Z výsledků obou analýz jasně vyplývá, že ve druhém případě (při využití centromerické sondy) došlo k nadhodnocení linie s monozomií chromozomu 21, a to téměř o 19 %. Linie s trizomií chromozomu 21 byla podhodnocena o necelých 5 % a konečně, v případě linie 46,XY činil výsledný rozdíl téměř 16 %. Z těchto údajů vyplývá naprostá

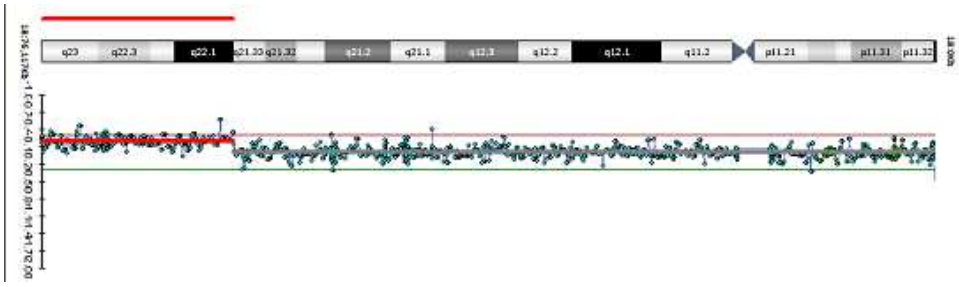
nevhodnost aplikace centromerické sondy, respektive minimálně nevhodnost jejího užití bez kombinace s lokus specifickou sondou na kontrolní region.

5.5.5 Kazuistika pacienta XIV

Pacient XIV – chlapec ve věku 6 let vykazoval blíže nespecifikované deformity předloktí. K molekulárně cytogenetickému vyšetření byl indikován kvůli druhé graviditě matky. Pro získání kompletního obrazu historie rodiny podstoupila vyšetření matka chlapce (pacientka XV) i jeho otec (pacient XVI), u nichž indikace konkrétně zahrnovala vyšetření karyotypu G-pruhováním i analýzu pomocí FISH ze vzorku periferní krve.

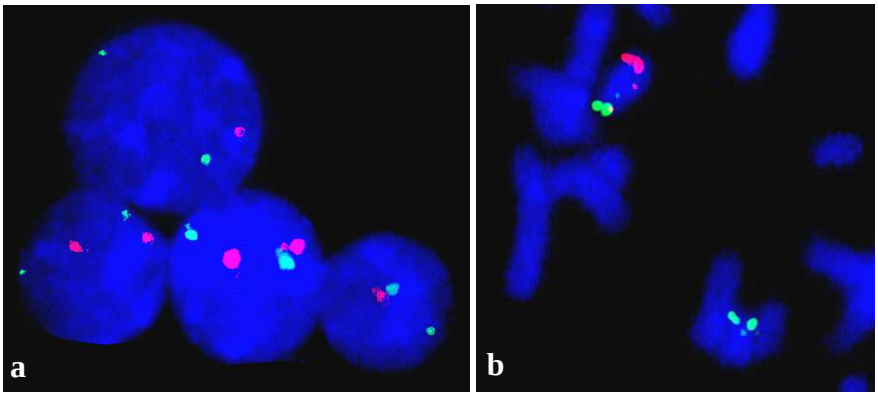
Postup analýzy

U pacienta XIV byla ze vzorku periferní krve podle standardního operačního protokolu izolována DNA. Získaný materiál následně posloužil k analýze pomocí metody array CGH. Z výsledku analýzy, arr 18q22.1q23(59,753,365×2, 59,806,894-76,113,788×1~2), vyplývá, že patologický fenotyp je zapříčiněn ztrátou přibližně 16,3 Mb úseku dlouhého raménka chromozomu 18, v němž se nachází 37 genů. Daná terminální delece se vyskytovala v mozaikové formě.



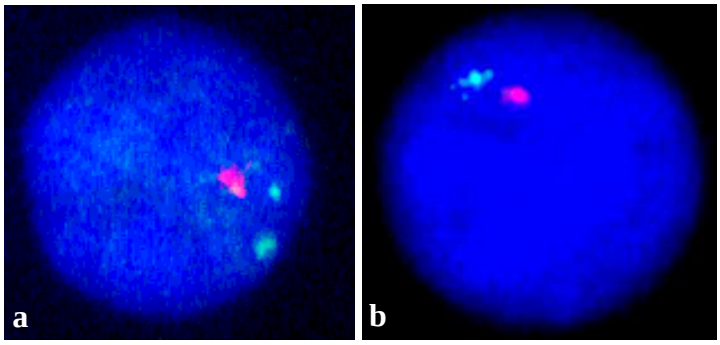
Obr. 5.31. Výstup vyšetření metodou array CGH. Část vyznačená červeně představuje oblast delece dlouhého raménka chromozomu 18. V daném úseku převažuje signál referenční DNA značené fluorochromem Cy5. Vzorek XIV.

Pro přesné určení zastoupení strukturní aberace v mozaice byla indikována metoda FISH s užitím lokus specifických sond nasedající na subtelomerické oblasti krátkého i dlouhého raménka. Zastoupení buněčných linií získané odečtem 17 mitóz a 503 interfázních jader odpovídalo: 46,XY,del(18)(18qtel)~31,92 % / 46,XY~68,08 %.



Obr. 5.32. a) Interfázní jádra lymfocytů periferní krve představující dvě linie – horní jádro a jádro vpravo dole představují buněčnou linii 46,XY,del(18)(18qtel), druhá dvě interfázní jádra představují fyziologickou linii 46,XY. b) Část mitózy zobrazující (mimo jiné) dva chromozomy 18. Chromozom vpravo dole vykazuje terminální deleci prezentovanou ztrátou signálu sondy nasedající k regionu 18qtel. Tato mitóza představuje buněčnou linii 46,XY,del(18)(18qtel). Vzorek XIV, vyšetřované lokusy: 18ptel – D18S552 (FITC), 18qtel – D18S1390 (TR).

Vyšetření vzorků od obou rodičů neprokázalo výskyt kauzální mutace v mozaice ani u jednoho z nich. U pacientky XV bylo zhodnoceno 519 struktur, u pacienta XVI pak 525 struktur. I přes nález několika interfázních jader s aberacemi prezentovanými ztrátou jednoho či druhého signálu, byly konečné výsledky hodnoceny jako fyziologické, protože zastoupení těchto nálezů nepřekročilo *cut off* hranici 2 %.



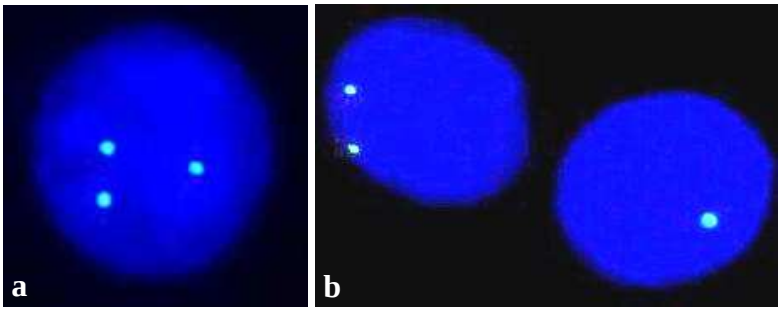
Obr. 5.33. a) Interfázní jádro ze vzorku pacienta XV s chybějícím signálem sondy nasedající na subtelomerický region 18ptel. b) Interfázní jádro lymfocytu ze vzorku pacienta XVI pouze se dvěma signály, nález odpovídá monozomii chromozomu 18. Vzorek XV a XVI, vyšetřované lokusy: 18ptel – D18S552 (FITC), 18qtel – D18S1390 (TR).

5.5.6 Kazuistika pacientky VIII

Pacientka VIII – žena ve věku 37 let byla k molekulárně cytogenetickému vyšetření indikována pro infertilitu a poruchy reprodukce. Již vyšetření metodou G-pruhování odhalilo dvě buněčné linie, tj. linii 45,X a linii 46,XX. Pro další verifikaci nálezu proběhla analýza pomocí metod FISH a array CGH ze vzorků periferní krve.

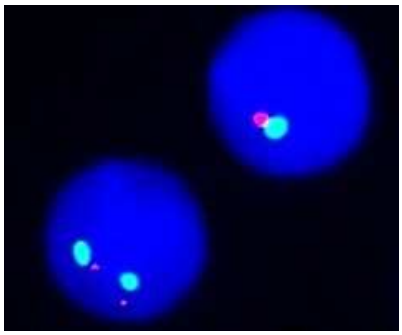
Postup analýzy

Ke standardnímu vyšetření numerické aberace v mozaice posloužila kombinace sond nasedající na centromery obou gonozomů, tj. sondy DXZ1 a DYZ3. Při odečtu 541 hodnotitelných interfázních jader a mitóz nebyl nalezen chromozom Y zastoupený signálem sondy DYZ3. Kromě již popsaných buněčných linií byla nalezena tři jádra představující linii 47,XXX. Konečný výsledek odpovídal: 45,X~44,73 % / 47,XXX~0,37 % / 46,XX~54,90 %.



Obr. 5.34. a) Interfázní jádro lymfocytu periferní krve nesoucí tři signály sondy DXZ1 (linie 47,XXX). b) Dvě interfázní jádra lymfocytů na preparátu ze vzorku periferní krve. Interfázní jádro vpravo představuje fyziologickou linii 46,XX, zatímco levé interfázní jádro s jedním signálem sondy DXZ1 představuje buněčnou linii 45,X. Vzorek VIIIa, vyšetřované lokusy: DXZ1 (FITC) a DYZ3(TR).

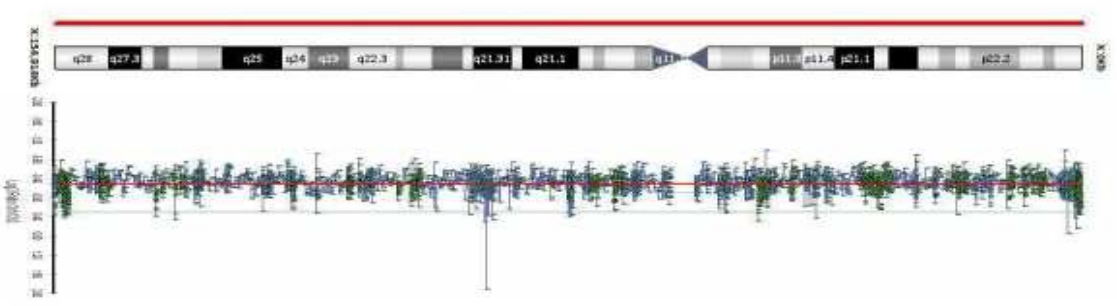
K porovnání tohoto výsledku, jež je zahrnuto i ve statistickém hodnocení 1. úrovně, byl připraven preparát ze stejné tkáně s aplikací kombinace sond k centromeře chromozomu X, tj. sonda DXZ1 a kritického regionu Kallmanova syndromu genu KAL. Konečný výsledek odpovídal třem liniím: 45,X~54,88 % / 47,XXX~0,19 % / 46,XX~44,93 %.



Obr. 5.35. Interfázní jádra lymfocytů prezentující dvě odlišné buněčné linie. Spodní jádro nesoucí po dvou signálech sondy DXZ1 a KAL představuje fyziologickou linii 46,XX. Zatímco horní interfázní jádro s jedním signálem DXZ1 a jedním signálem KAL představuje buněčnou linii 45,X. Vzorek VIIIb, vyšetřované lokusy: DXZ1 (FITC) a KAL (SpO).

Nakonec pro zjištění výpovědní hodnoty lokus specifické sondy bez její kombinace se sondou centromerickou byl připraven třetí preparát, opět ze vzorku periferní krve, se sondou nasedající ke genu pro androgenní receptor. Z výsledků této hybridizace (45,X~58,20 % / 46,XX~41,80 %) je velmi dobře patrné nadhodnocení buněčné linie 45,X oproti výsledkům předešlým.

U této pacientky bylo pro vyloučení strukturních aberací indikováno i vyšetření pomocí array CGH, a to současně s výše uvedenou analýzou FISH. Strukturní přestavba nebyla potvrzena, proto je výsledek zapsán pouze obecně: arr (1-22)×2,(X)×1~2.



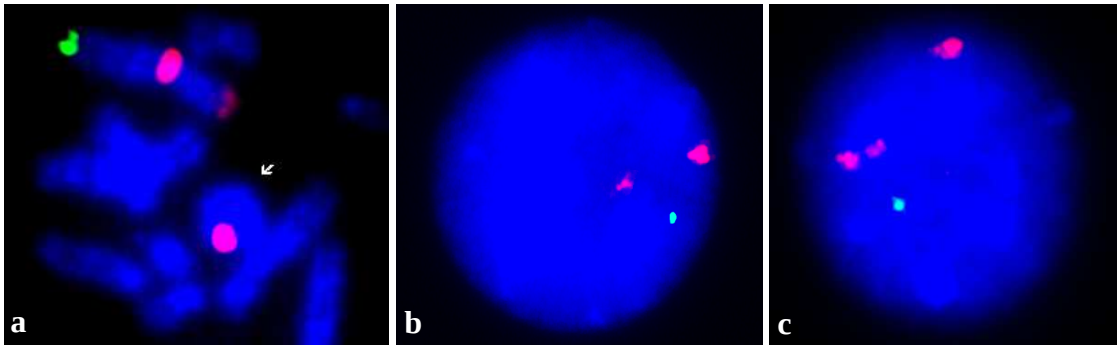
Obr. 5.36. Výstup vyšetření metodou array CGH. Část vyznačená červeně představuje oblast aberace, v tomto případě ztráty celého chromozomu X v mozaice. Vzorek VIII.

5.5.7 Kazuistika pacientky XXIII

Dvacetisedmiletá žena – pacientka XXIII byla k molekulárně cytogenetickému vyšetření metodou FISH indikována na základě podezření na Turnerův syndrom. Požadavek k vyšetření přišel z laboratoře mimo ÚBLG po předchozím nálezu kruhového chromozomu derivovaného z chromozomu X. K vyšetření byl použit kultivovaný vzorek periferní krve.

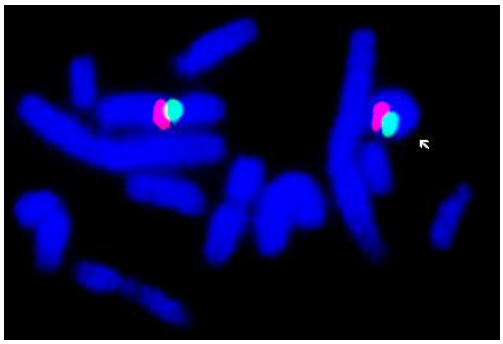
Postup analýzy

Výběr sond vycházel z obecného mechanismu tvorby kruhových chromozomů, kdy po odtržení koncových částí dochází ke sloučení konců a formaci *ring* chromozomu. Ke stanovení zastoupení X chromozomu a pro kontrolu nepřítomnosti chromozomu Y byly využity příslušné centromerické sondy DXZ1 a DYZ3. K rozeznání kruhového a normálního chromozomu posloužily subtelomerické sondy nasedající ke koncovým úsekům gonozomů. Díky této kombinaci lze rozlišit přítomnost či nepřítomnost kruhových chromozomů i na interfázních jádrech, což může být velmi vhodné především u preparátů s nižším počtem mitóz. Na druhou stranu mohou vyvstat komplikace vyplývající z přítomnosti dicentrického chromozomu, který odráží přítomnost dvou signálů DXZ1. V tomto případě takováto jádra byla zařazena mezi nehodnotitelné struktury. Konečný výsledek, získaný odečtem 18 mitóz a 507 interfázních jader, odpovídal přítomnosti dvou buněčných linií v následujícím zastoupení: 45,X~79,05 % / 46,X,r(X)~20,95 %.



Obr. 5.37. a) Část mitózy ze vzorku periferní krve s chromozomem X a kruhovým chromozomem derivovaným z chromozomu X (struktura zaznačená šipkou). Na strukturně nezměněném chromozomu X je patrný signál centromerické sondy DXZ1 a signály obou subtelomerických sond, zatímco kruhový chromozom vykazuje pouze signál sondy DXZ1. b) Interfázní jádro lymfocytu periferní krve představující buněčnou linii 45,X. Patrné jsou signály obou subtelomerických sond a sondy centromerické. c) Interfázní jádro představující linii 46,X,r(X). Toto jádro nese po jednom signálu obou subtelomerických sond a dva signály sondy DXZ1. Vzorek XXIIIa, vyšetřované lokusy: Xptel/Yptel – DXYS129 (TR), Xqtel/Yptel – DXYS61 (FITC).

Další analýza směřovala k ověření přítomnosti genu XIST na kruhovém chromozomu. Vzhledem k rozsahu *ring* chromozomu bylo pravděpodobné, že daný gen bude přítomen, což se záhy potvrdilo pomocí aplikace příslušné lokus specifické sondy. Konečný výsledek (získaný odečtem 128 mitóz) se rovnal 21,09 % zastoupení buněčné linie 46,X,r(X). Tímto vyšetřením se zároveň potvrdila i dobrá výpovědní hodnota předchozí analýzy – výsledný rozdíl mezi oběma odečty se rovnal přesně 0,14 %.



Obr. 5.38. a) Část mitózy s chromozomem X a kruhovým chromozomem derivovaným z chromozomu X (struktura zaznačená šipkou). Na obou chromozomech jsou jasně patrné signály obou sond DXZ1 i XIST. Vzorek XIIIb, vyšetřované lokusy: DXZ1 (PlatinumBright495), XIST (PlatinumBright550).

Pro další srovnání byl připraven preparát pouze se sondami nasedající k centromerám obou gonozomů, tj. sondami DXZ1 a DYZ3. Po odečtu 15 mitóz a 505 interfázních jader stanovený poměr činil: 45,X~74,81 % / 46,X,r(X)~0,38 % /46,XX~24,81 %. Došlo tak k nadhodnocení linie 46,XX (tedy linie s kruhovým chromozomem).

6 Diskuze

6.1 Mozaicismus a vybrané aspekty

Chromozomální mozaicismus je stav, kdy jedinec mající původ v jedné zygotě nese ve svých tkáních dvě nebo více buněčných linií s rozdílným karyotypem. Odlišná karyotypová konstituce vychází z přítomnosti numerických nebo strukturních abnormalit.

6.1.1 Mechanismy vzniku mozaicismu

Mechanismy vzniku mozaicismu uvedené v teoretické části představují obecné modely vedoucí ke vzniku numerických i strukturních abnormalit. Stejné děje se bezesporu v různé míře rovněž podílejí na vzniku aberací v mozaice, a to buď samy o sobě nebo jako součást většího počtu na sebe navazujících procesů. Aberace mohou být následkem chyb meiotického nebo mitotického dělení, přičemž rozlišení původu abnormality v mozaice má svůj význam. V případě dějů vyplývajících z meiotické chyby lze u pacienta předpokládat výskyt mozaicismu i v zárodečných tkáních. Germinální mozaicismus pak může být příčinou familiárního výskytu mutace. V případě mitotických chyb dědičnost záleží na jejich načasování. Pokud například k nondisjunkci dojde dříve, než se u embrya oddělí zárodečná linie, je možný dědičný přenos aberací s takovýmto mitotickým původem. Častěji ale dochází ke zrodu čistě somatického mozaicismu, u něhož přenos odchylky do další generace nehrozí (Chial 2008). V klinické praxi se rutinně *de novo* vznik aberace odhaduje na základě vyšetření obou rodičů postiženého potomka, a to nejčastěji ze vzorku periferní krve. Pokud by jeden z rodičů měl v této tkáni stejnou aberaci v nízké frekvenci, jakou má postižený potomek, vyvstal by předpoklad, že abnormalita zasahuje i zárodečné tkáně. Z tohoto důvodu byla provedena vyšetření u pacientů X, XI, XV a XVI. Výsledky analýz na základě ustanoveného 2 % *cut off* limitu byly vyhodnoceny negativně. Na těchto podkladech se vznik strukturních aberací u pacientů IX a XIV hodnotil jako *de novo*. V případě podezření na čistě germinální mozaicismus lze rovněž provést přímé vyšetření příslušných tkání, které je více informativní, ale kvůli své invazivitě se rutinně neprovádí.

6.1.2 Výskyt mozaicismu

Přítomnost mozaicismu se nevztahuje pouze na jedince s abnormálním fenotypem. Mozaicismus představuje přirozeně se vyskytující stav v rámci časného vývoje embrya (Iourov *et al.* 2008), přičemž byl popsán jako nezbytný pro vývoj centrálního nervového systému (Yurov *et al.* 2007). Do dalšího rozvoje embrya vstupují aktivní korekční procesy potlačující buněčné linie s abnormální karyotypovou výbavou, které mohou vyústit v mozaicismus omezený na placentu. Ten postihuje pouze extraembryonální zárodečné tkáně. Z tohoto důvodu je v rámci prenatální diagnostiky vhodnější vyšetření vzorků získaných amniocentézou či kordocentézou než vzorků získaných odběrem choriových klků. Vznik aneuploidních linií byl zaznamenán i v průběhu stárnutí jedinců. Například Guttenbach se svým týmem (Guttenbach *et al.* 1995) na základě analýzy interfázních jader lymfocytů popsal korelaci mezi přibývajícím věkem a ztrátou pohlavních chromozomů. Zatímco u mužů monozomie chromozomu Y ani u nejvyšší věkové kategorie nepřesáhla námi přijímanou *cut off* hranici 2 %, monozomie chromozomu X tuto hladinu překročila již v druhé nejnižší věkové skupině 6 – 10 let. Vyvstává tedy otázka, zda pacientky s detekovaným nízkofrekvenčním mozaicismem Turnerova syndromu nejsou diagnostikovány chybně. K ověření byla provedena analýza dvou preparátů s rozdílnou kombinací sond u desetileté dívky – pacientky IV, u níž základní cytogenetické vyšetření nezachytilo žádné abnormality. I přestože výsledky získané odečtem sondy DXZ1 nasedající k regionu centromery chromozomu X podaly důkaz o přítomnosti aneuploidních linií, předpokládám, že se spíše jedná o náhodnou chybu danou překryvem signálů, respektive centromerických oblastí chromozomů X, přítomností nespecifických signálů nebo o nález vyplývající z kultivačního mozaicismu. Důkaz představuje negativní výsledek získaný druhou analýzou, při níž byla zvolena kombinace centromerické a lokus specifické sondy. Nepřímý důkaz představuje i podobné procento zachycených buněčných linií s aberacemi u pacientů, u nichž byly výsledky na základě nepřekročení *cut off* limitu hodnoceny jako negativní.

6.1.3 Mozaicismus a jeho vliv na fenotyp

Vliv mozaicismu na výsledný fenotyp je důsledkem několika příčin. První aspekt představuje míra mozaicismu. Obecně nízkofrekvenčnímu mozaicismu bývají přisuzovány menší efekty na fenotyp, přičemž mozaicismus může být odhalen až na podkladě neplodnosti jedince (Sybert a McCauley 2004 nebo Kouru *et al.* 2011). Na základě infertility a poruch reprodukce byly diagnostikovány pacientky s označením VIII, XIX, XXIV a XXIX.

Stanovená diagnóza, Turnerův syndrom v mozaice, se shodovala u všech těchto případů. Zajímavé je, že pacientky VIII a XXIX vykazovaly přibližně 50 % zastoupení aneuploidní linie, zatímco u pacientek XIX a XXIV byl prokázán nízkofrekvenční mozaicismus s přibližně 5 % zastoupením aberantních buněk. Nejmladší ženě bylo v době vyšetření 31 let a nejstarší 45 let. V této věkové skupině Guttenbach se svým týmem popsal ztrátu chromozomu X (pouze s ohledem na věk) s frekvencí do 3 % (Guttenbach *et al.* 1995). Proto lze předpokládat, že zachycený nízkofrekvenční mozaicismus nevyplývá z vyššího věku pacientek XIX a XXIV.

Dále hraje roli, který konkrétní chromozom či lokus je zavzat v příslušné numerické, respektive strukturní aberaci. Tento kontrast může být patrný u pacientů s označením XIV a XVII. Zatímco pacient XIV vykazoval blíže nespecifikované deformity předloktí a mozaicismus se strukturní aberací v 31,92 % zastoupení, tak pacient XIV vykazoval mentální retardaci na podkladě aneuploidie chromozomu 22, jež byla odhalena s frekvencí nižší než 5 % (přesný výsledek není uveden, protože se lišil od výsledků ÚBLG, více viz další text).

Na výsledném fenotypu se podílí i všeobecně přijímaný fakt o rozdílné míře mozaicismu v jednotlivých tkáních pacienta. Například bylo prokázáno, že u pacientů s mozaikou Downova syndromu koreluje zastoupení aneuploidní buněčné linie ve vzorku z bukálního stěru s jejich inteligenčním kvocientem (Papavassiliou *et al.* 2009). Různá míra mozaicismu byla zaznamenána i u pacientů XVIII, XIX a XX, u nichž byly analyzovány vzorky z více tkání. Mnou stanovené zastoupení buněčných linií mezi tkáněmi se lišilo o 0,01 – 8,22 %.

Při posuzování fenotypu musí být vzaty v úvahu i epigenetické modifikace vyplývající z uniparentální dizomie a inaktivace chromozomu X. Inaktivace chromozomu X se iniciuje expresí genu XIST. Strukturní aberace zahrnující markery, izochromozomy či kruhové chromozomy derivované z chromozomu X, které nesou tento gen, jsou preferenčně inaktivovány. Pokud lokus genu XIST zasáhne delece či je jinak porušena jeho funkce v rámci strukturní přestavby, odráží se tato skutečnost v atypickém projevu Turnerova syndromu. Tento necharakteristický fenotyp zahrnuje mentální retardaci, syndaktylii, polydaktylii či dysmorfické faciální rysy (Matsuo *et al.* 2002, Leppig *et al.* 2004). Z tohoto důvodu jsem provedla analýzu regionu genu XIST u pacientů VI, XXIII a XXVI. Ve všech případech byla přítomnost genu XIST prokázána. U pacientek XXIII a XXVI s kruhovým chromozomem, respektive izochromozomem Xq byl tento výsledek, na základě indikace pro suspektní Turnerův syndrom, očekáván. U pacienta VI, plodu s prokázaným markerem

derivovaným z chromozomu X, mělo toto vyšetření význam pro predikci fenotypu (více viz další text).

6.2 Metoda FISH a její omezení

Analýza FISH představuje pouze jednu z alternativ sloužících k vyšetření strukturních a numerických aberací. I když je v dnešní době dostupná řada metod umožňujících detekci těchto abnormalit, v současné konkurenci se udrží jen ty, které mají vysokou senzitivitu, specificitu, rychlý, nenáročný a automatizovaný postup. Zároveň by měly být finančně dostupné. Nejlépe tyto podmínky pro rutinní diagnostiku splňují metody G-pruhování, FISH, QF-PCR, MLPA a BoBs^{TM}.

6.2.1 Časová náročnost, specificita a senzitivita

Časová náročnost pracovního postupu metody FISH, nehodnotím-li dobu kultivace, při užití lokus specifické či centromerické sondy odpovídá v průměru jednomu nebo jednomu a půl dni. Stejný časový úsek podle dostupných informací vyžaduje i QF-PCR a BoBs^{TM} (Vialard *et al.* 2011). Techniky MLPA i array CGH zaberou přibližně 2 dny, respektive 3 dny, což jsem si i sama ověřila (postup metody MLPA jsem měla možnost zhodnotit v rámci bakalářské práce). Rozdíl mezi těmito údaji tkví v počtu takto analyzovaných vzorků. Pomocí analýzy MLPA v rámci jednoho protokolu lze v tomto čase zhodnotit více vzorků. U metody FISH při detekci mozaicismu trvá vyhodnocení vzorku po provedení protokolu zhruba jednu až dvě hodiny v závislosti na kvalitě preparátu, množství hodnocených struktur a zkušenosti hodnotitele. Časová náročnost může rovněž odrážet i množství analyzovaných signálů sond zejména, pokud není k hodnocení užit širokopásmový filtr. Z tohoto důvodu jsem chtěla porovnat výtěžnost analýz FISH strukturních aberací v mozaice u pacientek XXIII a XXVI při použití kombinace lokus specifických sond s centromerickými sondami jako spolehlivého nástroje pro detekci abnormality na straně jedné a při užití pouze centromerických sond DXZ1 a DYZ3 na straně druhé s tím, že odečet takového preparátu vyžaduje přibližně o třetinu až polovinu méně času. U pacientky XXIII byl prokázán karyotyp 45,X/46,X,r(X), pacientka XXVI měla karyotyp 45,X/46,X,i(X). Pokud by u obou pacientek byly tyto dvě buněčné linie prokázány už G-pruhováním, naskýtá se otázka, zda pro zrychlení postupu FISH nepostačí aplikovat pouze směs sond nasedajících na centromery gonozomů. Toto vyšetření umožní verifikovat nález přestavby na přítomných mitózách, odhalit přítomnost

chromozomu Y a stanovit zastoupení buněčných linií za předpokladu, že interfázní jádra se dvěma signály by byla hodnocena jako 46,X,r(X), respektive 46,X,i(X). Po provedení obou analýz FISH jsem zaznamenala 4,24 % rozdíl u pacientky XXIII a 2,11 % rozdíl u pacientky XXVI. Výsledky obou vyšetření dobře korelují, přičemž druhý přístup je časově úspornější. Na druhou stranu se menší časové nároky aplikace centromerických sond pojí se snížením specificity i senzitivity analýzy. Například přítomnost dicentrického *ring* chromozomu by se projevila v nálezu tří signálů sondy DXZ1 na interfázním jádře, a tudíž by mohlo dojít k dezinterpretaci v podobě ustanovení linie 47,XXX.

Další faktor ovlivňující rychlost vyšetření představuje kultivace vzorků, která je v případě diagnostiky mozaicismu nevýhodná i z jiných důvodů. Mnohé práce popisují změnu poměrů zastoupených buněčných linií mezi kultivovanými a nekultivovanými vzorky (např. Ballif *et al.* 2006 či Scott *et al.* 2010). Tento jev byl zachycen i u jednoho vzorku v mém souboru, konkrétně u pacienta s označením IX. U plodu byla pomocí analýzy FISH s centromerickou sondou zachycena buněčná linie s markerem v 63,68 % zastoupení. Toto vyšetření bylo provedeno ze vzorku získaného kultivací pupečníkové krve. Následně byla indikována analýza metodou array CGH, k níž se využil vzorek nekultivovaný. Analýza array CGH se primárně využívá jako kvalitativní, nicméně lze z ní velmi hrubě stanovit zastoupení buněčné linie s aberací. V tomto případě zastoupení buněčné linie s markerem odpovídalo přibližně 40 %. Poměr zastoupení buněčných linií se vlivem kultivace tedy zřejmě změnil, i když není jisté o kolik. Metoda array CGH v tomto směru poskytuje skutečně méně hodnověrné informace. Například Ballif se svými kolegy (Ballif *et al.* 2006) zachytil 3 – 25 % rozdíl v zastoupení buněčných linií získaného metodou FISH v kultivovaném a nekultivovaném materiálu. Z tohoto důvodu byla v minulosti představena tzv. interfázní FISH nevyužívající kultivovaný materiál (Weremowicz *et al.* 2001).

Obecně je metoda FISH brána za analýzu s velmi dobrou senzitivitou a specificitou, a to i přestože výpovědní hodnotu ovlivňuje několik okolností. K nejvýznamnějším patří skutečnost, že specifita závisí na správném výběru sondy (Gao *et al.* 2012). Vlastní analýza stojí tak na předem ustanoveném předpokladu, který nejčastěji vyplývá z výsledků získaných základním cytogenetickým vyšetřením. Pokud je toto vyšetření neinformativní, musí být nejprve provedeny analýzy umožňující takříkajíc zúžit "okruh podezřelých". Například pro analýzu markerů představuje, pro toto počáteční zhodnocení, vhodnou alternativu centromerická mFISH, díky níž byl identifikován původ markeru u pacienta IX. V jiných případech lze užít schémata postupu vyšetření vycházející z populační frekvence dané abnormality se souběžným hodnocením fenotypu pacienta. U některých strukturních aberací

může ke správnému výběru sondy posloužit i znalost mechanismu formace abnormality. Tento přístup posloužil k výběru sond při analýze kruhového chromozomu u pacientky XXII s karyotypem 45,X/46,X,r(X). Kombinace lokus specifických sond nasedajících k subtelomerickým úsekům a centromerických sond umožnila rozeznání a detekci *ring* chromozomu i na interfázních jádrech, díky čemuž bylo určeno konečného zastoupení buněčných linií.

Podobný problém se zacílením pouze na určitý lokus či region se potýkají i metody QF-PCR, MLPA a BoBs™, zatímco analýza array CGH bývá podle některých prací naopak až příliš informativní. Podle jedné z nedávných studií metoda array CGH není doporučována jako prvotní vyšetření v rámci prenatální medicíny (Vialard *et al.* 2011). Důvodem je hrozící záměna nedostatečně charakterizované varianty za kauzální mutaci. Ilustrativní příklad nám v tomto případě může poskytnout i výsledek analýzy array CGH pacienta IX, u něhož kromě dříve určeného markeru, byly nalezeny čtyři další oblasti vykazující odchylku od předpokládaného poměru intenzit obou signálů fluorochromů. Všechny tyto delece či duplikace byly pomocí databází dourčeny jako polymorfismy. Zásadní význam při determinaci měl námi užitý program *BlueFuse Multi software* verze 2.6. od firmy BlueGnome Ltd., který je schopen identifikovat strukturní varianty na základě vlastní integrované databáze. V případě detekce potenciálně kauzálních mutací jsou připojeny i podrobné komentáře s odkazy na publikované práce s danými nálezy a na informace databází *Online Mendelian Inheritance in Man* ® a *HUGO Gene Nomenclature Committee*.

6.2.2 Výpovědní hodnota metody FISH v diagnostice mozaicismu

Výpovědní hodnota diskutovaných metod pro diagnostiku mozaicismu je značně proměnlivá. Na jednotlivé analýzy lze pohlížet z více hledisek, jejichž kritéria musí splňovat. První aspekt představuje samotné určení abnormality, tj. který chromozom se prezentuje ve změněném počtu u aneuploidie, respektive jaká strukturní přestavba se nachází v konkrétním regionu. Druhé hledisko, záchyt a vlastní stanovení zastoupení buněčných linií, pak do jisté míry závisí na prvním hledisku. V některých případech, například při familiárním výskytu dědičné choroby, hraje svou roli i analýza původu mutace (viz předchozí text).

Všechny rutinně využívané metody mají dobrou výpovědní hodnotu v oblasti diagnostiky aberací, na níž jsou zacíleny. Výjimky tvoří základní cytogenetické vyšetření a array CGH, které podávají mnohem širší spektrum informací (u G-pruhování závislé na nízké rozlišovací schopnosti). Nicméně diskutované analýzy zmíněné v úvodu kapitoly by selhaly

především na poli detekce nízkofrekvenčního mozaicismu. Jediná metoda umožňující detekci a kvantifikaci, ať už strukturních či numerických odchylek karyotypu, i přes jejich nízké zastoupení, je metoda FISH.

Výpovědní hodnota metody FISH má rovněž svá omezení, i pokud pomineme již diskutovaný fakt potřeby správného zacílení. Správnost určení zastoupení většího počtu buněčných linií předpokládá odečet dostatečného počtu struktur. Právě to představuje jeden z důvodů, proč se doposud preferuje kultivovaný materiál. Při interfázní FISH je rutinně hodnoceno pouze 30 až 50 interfázních jader (Weremowicz *et al.* 2001). Zhodnocení malého počtu struktur by se mohlo odrazit jednak ve falešně negativním výsledku, jednak v ustanovení výsledku s nesprávně určeným zastoupením buněčných linií. Nesprávně stanovené zastoupení může rovněž být ve vybraných případech odrazem proměnlivosti zastoupení buněčných linií při odečtu preparátu, respektive mezi preparáty (nástin problému byl graficky znázorněn v praktické části v oddíle 5.4.5). I zhodnocení dostatečného množství struktur ale nemusí zaručit přesný výsledek. Například u pacienta XVII jsem na základě třinácti odečtených mitóz a 497 interfázních jader stanovila procentuální zastoupení dvou buněčných linií: 45,X,–22~2,15 % / 46,XY~97,85 %. Na rozdíl od toho byly analýzou stejného preparátu v klinické části ÚBLG zachyceny tři buněčné linie: 45,X,–22~1,91 % / 47,XY,+22~1,14 % / 46,XY~96,95 %. Důvodů nezachycení linie 47,XY,+22 je více. Zastoupení 1,14 % představuje přibližně šest interfázních jader či mitóz z celkového počtu 500 hodnocených struktur. Ty tak mohou být snadno přehlédnuty. Hlavní důvod zřejmě ale představuje zaznamenaná nízká intenzita lokus specifické sondy N85A3 značené fluorochromem FITC v kombinaci s častým nálezem nespecifických signálů (viz tabulka 5.7).

V případě strukturních aberací je navíc vhodné nález abnormality potvrdit i na mitózách, protože pouze na nich lze pozorovat skutečné pozice signálů sond a uspořádání přestavby. Tento problém může být dobře ilustrován u pacienta XI indikovaného v souvislosti s prenatálním vyšetřením pacienta IX. Na základě nálezu interfázních jader se třemi signály centromerické sondy D17Z1 vyvstal předpoklad, že tento pacient nese nízkofrekvenční mozaicismus pro marker derivovaný z chromozomu 17 (tedy mozaiku markeru, jež byla nalezena u plodu). I když byly provedeny dvě analýzy se zhodnocením více než 1500 struktur, nebyla prokázána ani jedna mitóza s předpokládaným markerem. V souvislosti s tímto nálezem a pro nepřekročení *cut off* limitu 2 % byl výsledek vyhodnocen jako negativní.

I přes správné zacílení analýzy FISH nemusí mít zvolený typ sondy dostatečnou výpovědní hodnotu v oblasti kvantitativní analýzy. V této práci jsem měla možnost porovnat výsledky analýz získaných na podkladě užití pouze centromerické sondy, kombinace

centromerické sondy s lokus specifickou sondou a aplikace lokus specifické sondy bez kontrolní sondy. I když se výsledky vyšetření za použití centromerické sondy a centromerické sondy v kombinaci s lokus specifickou sondou obecně významně nelišily, osobně považuji takto nastavenou analýzu za nejspolehlivější diagnostický přístup. Důvodem je možnost vyloučení překryvu signálů centromerických oblastí, protože překryv signálů většího počtu sond je nepravděpodobný. To samé platí i pro hodnocení signálů ve vzájemné blízkosti nebo signálů, mezi nimiž se nacházejí můstky. Tento přístup je především přínosný při diagnostice nízkofrekvenčního mozaicismu, u kterého nezhodnocení i malého počtu aberantních interfázních jader, může výrazně ovlivnit výsledek analýzy. U dvou pacientek s označením VII a VIII byly nahybridizovány preparáty pouze s lokus specifickou sondou. V prvním případě, u pacientky VII, došlo k podhodnocení aberantní linie, zatímco ve druhém případě, u pacientky VIII, byla aberantní linie nadhodnocena. Nekonzistence výsledků, podle mého názoru, vyplývala z běžně zaznamenávaného slabšího signálu lokus specifické sondy daného jejím menším rozsahem. Na druhou stranu lze vzít v úvahu i fakt, že výsledky, alespoň částečně, odráží možné kolísání poměrů zastoupených buněčných linií v rámci vyšetření většího počtu preparátů (více viz subkapitola 5.4.5). I přesto považuji analýzu s použitím správně zacílené lokus specifické sondy bez její kombinace se sondou kontrolní za nejméně hodnověrný diagnostický postup.

6.2.3 Automatizace postupu

V dnešní době se stále více prosazuje trend zjednodušování i zrychlování pracovních postupů a snižování vlivu lidského faktoru, jakožto zdroje náhodných chyb. Tento trend se odráží v automatizaci metod. Zatímco analýzy BoBs^{TM}, MLPA, QF-PCR a array CGH mají automatizované postupy, metody FISH i G-pruhování jsou stále ve velké míře závislé na lidské zkušenosti a faktorech prostředí, což se odráží i ve způsobu hodnocení výsledků daných metod.

Metoda FISH a její zhodnocení má několik kritických momentů. Na počátku analýzy představuje jeden z kritických faktorů už vlastní výběr sondy často závislý na výsledcích předchozích vyšetření. Pro tuto závislost není analýza FISH vhodná jako *stand alone* test (Lim *et al*. 2010). Nevhodný výběr sondy nastiňuje například analýza vzorků pacienta VI s nálezem markeru derivovaného z chromozomu X, kdy u prvního preparátu byly použity sondy nasedající k centromerickému regionu a genu XIST. Volba sondy XIST nasedající na region v blízkosti centromery neumožnila rozeznat marker na interfázních jádrech. Tento

faktor spolu s nízkým obsahem mitóz nedovolil ani orientačně stanovit zastoupení buněčných linií, a proto musel být připraven druhý preparát. Jinou situaci představuje nevhodné užití centromerické sondy nasedající na centromery chromozomů 13 a 21 přiblížené v kazuistice pacienta XXVII. S výběrem sondy souvisí rovněž zvážení skutečnosti, jakým fluorochromem je značena. Jak vyplývá z průběžně zaznamenávaných údajů, obecně sondy značené fluorochromem FITC vykazovaly častěji nespecifické signály (viz tabulky 5.8 a 5.9). Z tohoto důvodu byl také u pacienta XI s podezřením na výskyt nízkofrekvenčního mozaicismu markeru derivovaného z chromozomu 17 připraven a hodnocen druhý preparát se stejnou sondou, která měla rozdílné značení. Především u vzorků s potřebou kombinace většího počtu sond musí být jejich značení pečlivě zváženo zejména, pokud musejí být kombinovány sondy s fluorochromy, u nichž hrozí *bleed through*. Z tohoto důvodu byly u pacienta XVIII postupně připraveny dva preparáty se sondami LSI 21 a se sondami hybridizujícími k centromerám obou gonozomů. Teprve po zhodnocení těchto preparátů byl vytvořen třetí preparát s kombinací všech sond. Pokud by byl tento preparát zhodnocen jako první, hrozila by záměna signálů sond LSI 21 a DYZ3 kvůli jevu *bleed through*.

Další kritický faktor představuje vyšetřovaný materiál a jeho vlastnosti. Tyto vlastnosti můžeme dělit na ovlivnitelné a neovlivnitelné. Ovlivnitelným faktorem může být například výměna fixačního roztoku u suspenze lymfocytů, jež by v důsledku snížila množství přítomné cytoplazmy. Neovlivnitelný faktor představuje například rychlost degradace struktur vzorku. Zatímco poločas rozpadu CD4 a CD8 lymfocytů odpovídá 87 dním, respektive 77 dním, tak degradace epitelových buněk bukálního stěru započíná již po 5 až 25 dnech (Papavassiliou *et al.* 2009). Nestabilita preparátů ze vzorků bukálního stěru byla zaznamenána i u dvou pacientek XIX a XX. V obou případech jsem se potýkala s menší kvalitou interfázních jader, absencí mitóz, občasným výskytem nečistot a především s nánosem cytoplazmy komplikujícím odečet signálů sond (viz tabulka 5.5).

Pracovní postup metody FISH obsahuje dva kritické momenty. První představuje denaturace, jejíž doba a teplota musí být přesně dodrženy. Nedostatečná denaturace by neumožnila dostatečné rozvolnění dvouřetězců DNA, přílišná denaturace by naopak vedla k tvorbě difúzních signálů. Druhý kritický moment představuje odmývání sondy, u něhož musí být opět přesně dodržena doba i teplota. Nedostatečné provedení tohoto kroku by vedlo k neodstranění nespecifických signálů sond a stanovení falešně pozitivního výsledku. Přílišné promytí by snížilo signál sond, což by mohlo mít za následek vydání falešně negativního i pozitivního výsledku.

Při běžné analýze metodou FISH v rámci stanovení klinické diagnózy jsou odečítána interfázní jádra a metafázní chromozomy. S odečítanými strukturami na preparátu souvisí i rozlišovací schopnost této metody odpovídající 50 kb – 2Mb u interfázních jader, respektive 5 Mb u metafázních chromozomů (Speicher a Carter 2005). Samotný odečet preparátů představuje část analýzy přímo závislé na lidské zkušenosti, přičemž svou roli hraje i kvalita mikroskopu, jeho přídatné zařízení a celkové seřízení. I přestože jsou definována obecná pravidla, jak preparáty hodnotit, v některých případech je nutné použít individuální přístup vyplývající především z kombinace sond a jejich fluorochromů, případně kvality preparátu. Odklon od doporučených pravidel však nemusí být přínosný. To dokazují i výsledky získané odečtem preparátů XXc a XXd. U nich byla zaznamenána nízká kvalita signálů daná rozpadem sondy a komplikovaná hojným výskytem nespecifických signálů (viz tabulka 5.7). Pro hodnocení byly proto užity individuální parametry. Ty ale, vzhledem ke značné odlišnosti mnou získaných výsledků od výsledků druhého hodnotitele, nebyly zřejmě správně nastaveny (stanovené zastoupení se lišilo přesně o 20,04 %). Z tohoto důvodu také nejsou výsledky zařazeny ve statistickém hodnocení 2. úrovně.

6.3 Korelace genotypu a fenotypu u vybraných pacientů

V případě postnatální medicíny má stanovení chromozomového nálezu zásadní význam pro nasměrování další diagnostiky, například pro včasný záchyt sdružených orgánových abnormalit nebo jiných poruch, které jsou pro danou odchylku karyotypu typické, dále pro stanovení prognózy nebo zavedení symptomatické léčby. Symptomatická léčba, například hormonální terapie u pacientek s Turnerovým syndromem, může umožnit jedincům prožít víceméně plnohodnotný život. Při včasné diagnóze Turnerova či Klinefelterova syndromu lze na základě cytogenetického vyšetření indikovat odběr zárodečných buněk pro budoucí *in vitro* fertilizaci (Hovatta *et al.* 2006, Karnis 2012). V rámci prenatální medicíny je fenotyp na základě výsledků vyšetření predikován s ohledem na již zdokumentované případy, přičemž musí být bráno v potaz, že každý případ má svá specifika a může se od ostatních lišit (Clarke *et al.* 1989). V následujícím přehledu diskutuji kazuistiky několika vybraných pacientů. Z důvodu utajení osobních a klinických dat nebyla dostupná podrobná klinická dokumentace, proto se text soustředí především na popisy chromozomových aberací a jejich analýzy, případně nastiňuje možnosti dalšího diagnostického postupu.

6.3.1 Predikce fenotypu u pacientky VI

U pacientky VI bylo v prenatálním období indikováno vyšetření ze vzorku získaného amniocentézou. Molekulárně cytogenetická analýza posloužila k detekci a identifikaci markeru derivovaného z chromozomu X v mozaice. U pacienta byly provedeny dvě analýzy, při nichž se využily sondy nasedající k lokusům genu XIST, genu SHOX a centromeře chromozomu X. Výsledný karyotyp odrážel přítomnost tří buněčných linií 46,X,der(X) / 45,X / 46,XX. Na markeru byla potvrzena přítomnost genu XIST a delece oblasti genu SHOX, oba geny byly potvrzeny u obou zbývajících buněčných linií. Na základě těchto zjištění je pravděpodobné, že jedinec bude prezentovat fenotypové znaky Turnerova syndromu. Ztráta genu SHOX v buněčných liniích 46,X,der(X) a 45,X se s největší pravděpodobností promítne do rozvoje defektů skeletu a malé postavy (Clement-Jones *et al*. 2000). Přítomnost obou aberantních linií bude mít dále vztah k vývoji dysgeneze genitálu a v dospělosti k poruchám reprodukce. Vzhledem k přítomnosti genu XIST na markeru, není očekáván atypický fenotyp Turnerova syndromu pojící se s mentální retardací a faciální stigmatizací (Wolff *et al*. 1994). Na základě výsledků vyšetření nebylo těhotenství přerušeno. Po narození by bylo vhodné u pacienta provést obdobnou kvantitativní analýzu k verifikaci současného nálezu. Za úvahu by stála i indikace kvalitativní analýzy pro bližší určení rozsahu markeru pomocí metody array CGH.

6.3.2 Predikce fenotypu u pacienta IX

Prenatální vyšetření u pacienta IX bylo provedeno ze vzorku získaného kordocentézou. Již G-pruhování, provedené na pracovišti mimo FN Motol, prokázalo malý nadpočetný chromozom – marker, jenž byl pomocí centromerické mFISH charakterizován jako derivovaný z chromozomu 17. Pomocí aplikace centromerické sondy D17Z1 se provedla kvantifikace buněčných linií. Zastoupení buněčné linie 47,XX,+der(17) se rovnalo 63,68 %. Na podkladě vyšetření obou rodičů (pacienta X a XI) byl poté určen *de novo* původ aberace. Následovaly kvalitativní analýzy FISH a array CGH. Velikost markeru odpovídala 6,5 Mb, přičemž oblast krátkého raménka obsahovala 56 genů včetně genů pro syndromy Smith-Magenis a Potocki-Lupski. Příčinou Smith-Magenis syndromu je delece v oblasti 17p11.2, zatímco Potocki-Lupski syndrom nese ve stejném úseku duplikaci. Je tedy pravděpodobné, že by se u pacienta v budoucnu rozvinuly projevy Potocki-Lupski syndromu, i když vzhledem k mozaicismu zřejmě v odlišné míře. Příznaky plně se projevujícího syndromu zahrnují opožděný vývoj, mentální retardaci s poruchou řeči, autistické rysy, spánkovou apnoi, defekty

kardiovaskulárního systému a hypotonii (Lee *et al.* 2012). Vzhledem k těmto závěrům bylo na přání rodičů přistoupeno k umělému přerušení těhotenství. U pacienta XI by stálo za úvahu zopakovat analýzu a najisto vyloučit či potvrdit případný výskyt markeru na větším počtu struktur, především na mitotických figurách.

6.3.3 Vyšetření pacienta XVIII

Pacient XVIII byl k vyšetření metodou FISH indikován kvůli potvrzení nálezu předchozího vyšetření metodou G-pruhování. K analýze posloužily vzorky periferní krve a biopsie kožního štěpu. Výsledek potvrdil vzácný mozaicismus dvou aneuploidních linií. Tyto aneuploidie, tedy trizomie chromozomu 21 a monozomie chromozomu X, samy o sobě představují samostatné klinické jednotky, Downův a Turnerův syndrom. Navíc byla ustanovena i linie 46,XX v minoritním zastoupení. Prevalence nálezu mozaicismu s koexistencí trizomie chromozomu 21 a monozomie chromozomu X odpovídá 1 / 2 000 000 porodů. Do roku 1998 bylo popsáno pouze 24 podobných nálezů, přičemž z 21 přeživších pacientů 17 vykazovalo dominanci znaků Downova syndromu a 4 pacienti nesli fenotyp obou syndromů (Harada *et al.* 1998). Pouze jeden pacient byl ženského pohlaví. Takovýto mozaikový karyotyp může být výsledkem několika procesů, kdy první aneuploidie vyvstane z chyby meiotického dělení. Výsledkem je zygota s numerickou aberací, u níž záhy dochází k chybě mitotického dělení a ke vzniku druhé aneuploidie. Jeden z uvažovaných mechanismů vzniku je i sloučení dvou zygot s rozlišnými aneuploidiemi a vzniku chimérismu (Harada *et al.* 1998). Do budoucna by bylo vhodné pacienta monitorovat kvůli možnému výskytu komplikací vyplývajících ze stanovených aneuploidií. Přínosné by mohlo být i určení původu aneuploidií a stanovení mechanismu vzniku.

6.3.4 Vyšetření pacienta XIV

Pacient XIV byl indikován k molekulárně cytogenetickému vyšetření kvůli identifikaci aberace zodpovídající za blíže nespecifikované deformity předloktí. V souvislosti s nálezem abnormality byli k vyšetření indikováni i oba rodiče (pacient XV a pacient XVI), přičemž matka byla opět gravidní. Z negativních výsledků jejich vyšetření lze usoudit, že se jedná o aberaci s *de novo* původem. Nejprve byla u pacienta provedena kvalitativní analýza array CGH. Ta odhalila mozaiku terminální delece přibližně 16,3 Mb úseku dlouhého raménka chromozomu 18 v oblasti cytogenetických pruhů 18q22.1 až 18q23. K určení

zastoupení buněčné linie s aberací následně posloužila analýza FISH. Delece dlouhého raménka chromozomu 18 byla doposud popsána u řady případů, které odrážely velkou variabilitu fenotypu zahrnující mimo defektů skeletu také mentální i růstovou retardaci, defekty kardiovaskulárního a urogenitálního systému (Cody *et al.* 1999). U pacientů s obdobným rozsahem terminální delece v nemozaikové formě se rozvíjí především menší vzrůst, porucha myelinizace a defekty skeletu postihující dolní končetiny. Mentální vývoj může být mírně opožděný či zcela normální (Feenstra *et al*. 2007). Fenotyp pacienta je tak vzhledem k cytogenetickému nálezu méně typický, i když deformity předloktí a paží byly u nižšího procenta pacientů s delecí dlouhého raménka chromozomu 18 rovněž popsány (Cody *et al.* 1999). Příčinou absence jiných příznaků může být téměř 70 % zastoupení buněčné linie 46,XY. Vzhledem k dalším možným projevům syndromu by bylo do budoucna vhodné pacienta sledovat s cílem včasného zjištění případných dalších odchylek ve vývinu.

7 Souhrn

Cílem této práce bylo zhodnocení možností diagnostiky mozaicismu. Hodnocena byla především výpovědní hodnota metody FISH, a to v oblasti vysokofrekvenčního i nízkofrekvenčního mozaicismu strukturních a numerických aberací. Na základě jednotlivých analýz byly určeny kritické faktory vyplývající z vlastností vyšetřovaného biologického materiálu, výběru sond, jejich značení a kvality výsledného preparátu. Zaznamenána tak byla například nízká kvalita vzorků bukálních stěrů, nevhodnost absence mitóz při hodnocení strukturních aberací, častější výskyt nespecifických signálů při užití sond značených fluorochromem FITC nebo jev *bleed through*.

Přes uvedené faktory a další úskalí analýzy FISH byla tato technika vyhodnocena jako dostatečně senzitivní a specifická v oblasti kvantitativní i kvalitativní analýzy mozaicismu, přestože stojí na principu náhodného výběru a subjektivního přístupu hodnocení. Senzitivita byla potvrzena i na poli diagnostiky nízkofrekvenčního mozaicismu, kde selhává celá řada rutinně zavedených technik. Reprodukovatelnost výsledků potvrdilo jejich konečné statistické hodnocení, na jehož podkladě nelze přijmout alternativní hypotézu. Alternativní hypotéza říká, že získané zastoupení buněčných linií se významně liší. Významně se nelišilo ani v případě stejného hodnotitele, ani v případě různých hodnotitelů nebo při nezávislé analýze stejných vzorků v různých laboratořích. Kvůli potřebě správného zacílení nebyla technika FISH uznána za vhodnou jako *stand alone* metoda. Nevýhodou může být i její nižší výpovědní hodnota v oblasti určení rozsahu strukturních aberací. V tomto směru ji tak může vhodně doplnit například metoda array CGH.

Především pro snížení časové náročnosti metody FISH dochází v současné době k neustálému zdokonalování stávajících a vývoji nových automatických vyhodnocovacích systémů umožňujících snímání mikroskopických obrazů a jejich další počítačové zpracování. S touto problematikou souvisí i výzkumný a vývojový projekt, na němž se podílí naše laboratoř. Výsledky této práce by měly přispět k definici chyb měření, k upřesnění kritérií pro hodnocení mozaikových nálezů a případně i ke správnému zacílení dalšího rozvoje vyhodnocovacího systému.

8 Seznam použité literatury

1. Araújo, A., Ramos, E.S. (2008): Cryptic mosaicism involving a second chromosome X in patients with Turner syndrome. Braz. J. Med. Biol. Res. 41: 368-372.
2. Arps, S., Koske-Westphal, T., Meinecke, P., Meschede, D., Nieschlag, E., Harprecht, W., Steuber, E., Back, E., Wolff, G., Kerber, S., Held, K.R. (1996): Isochromosome Xq in Klinefelter syndrome: report of 7 new cases. Am. J. Med. Genet. 64: 580-582.
3. Ballif, B.C., Rorem, E.A., Sundin, K., Lincicum, M., Gaskin, S., Coppinger, J., Kashork, C.D., Shaffer, L.G., Bejjani, B.A. (2006): Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens. Am. J. Med. Genet., Part A. 140: 2757-2767.
4. Bandyopadhyay, R., McCaskill, C., Knox-Du Bois, C., Zhou, Y., Berend, S.A., Bijlsma, E., Shaffer, L.G. (2003): Mosaicism in a patient with Down syndrome reveals post-fertilization formation of a Robertsonian translocation and isochromosome. Am. J. Med. Genet., Part A. 116: 159-163.
5. Bartsch, O., Loitzsch, A., Kozlowski, P., Mazauric, M.-L., Hickmann, G. (2005): Forty-two supernumerary marker chromosomes (SMCs) in 43 273 prenatal samples: chromosomal distribution, clinical findings, and UPD studies. Eur. J. Hum. Genet. 13: 1192-1204.
6. Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N., Stark, J.M. (2008): Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. PloSGenet. 4.
7. Blank, C.E., Gemmell, E., Casey, M.D., Lord, M. (1962): Mosaicism in a mother with a mongol child. Br. Med. J. 11: 378-380.
8. BlueGnome Ltd. (2012a): CytoChip oligo reference manual. Verze 1.8. BlueGnome Ltd., Cambridge.
9. BlueGnome Ltd. (2012b): Quality measures for BlueGnome arrays – Oligo/Focus. Technical note. Verze 1.02. BlueGnome Ltd., Cambridge.
10. Bohgaki, T., Bohgaki, M., Hakem, R. (2010): DNA double-strand break signaling and human disorders. Genome Integr. 1: 15-28.
11. Bojesen, A., Juul, S., Birkebæk, N., Gravholt, C.H. (2004): Increased mortality in Klinefelter syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. 89: 3830-3834.

12. Bojesen, A., Juul, S., Gravholt, C.H. (2003): Prenatal and postnatal prevalence of Klinefelter syndrome: a national registry study. J. Clin. Endocrinol. Metab. 88: 622-626.

13. Brisset, S., Aboura, A., Audibert, F., Costa, J.-M., L 'Herminé, A.C., Gautier, V., Frydman, R., Tachdjian, G. (2003): Discordant prenatal diagnosis of trisomy 21 due to mosaic structural rearrangements of chromosome 21. Prenat. Diagn. 23: 461-469.

14. Brook, C.G.D. (1986): Turner syndrome. Arch. Dis. Child. 61: 305-309.

15. Cirigliano, V., Voglino, G., Cañadas, M.P., Marongiu, A., Ejarque, M., Ordoñez, E., Plaja, A., Massobrio, M., Todros, T., Fuster, C., Campogrande, M., Egozcue, J., Adinolfi, M. (2004): Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18 000 consecutive clinical samples. Mol. Hum. Reprod. 10: 839-846.

16. Clarke, M.J., Thomson, D.A.G., Griffiths, M.J., Bissenden, J.G., Aukett, A., Watt, J.L. (1989): An unusual case of mosaic Down's syndrome involving two different Robertsonian translocations. J. Med. Genet. 26: 198-201.

17. Clement-Jones, M., Schiller, S., Rao, E., Blaschke, R.J., Zuniga, A., Zeller, R., Robson, S.C., Binder, G., Glass, I., Strachan, T., Lindsay, S., Rappold, G.A. (2000): The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. Hum. Mol. Genet. 9: 695-702.

18. Cody, J.D., Ghidoni, P.D., DuPont, B.R., Hale, D.E., Hilsenbeck, S.G., Stratton, R.F., Hoffman, D.S., Muller, S., Schaub, R.L., Leach, R.J., Kayel, C.I. (1999): Congenital anomalies and anthropometry of 42 individuals with deletions of chromosome 18q. Am. J. Med. Genet. 85: 455-462.

19. Conlin, L.K., Thiel, B.D., Bonnemann, C.G., Medne L., Ernst L.M., Zackai E.H., Deardorff, M.A., Krantz, I.D., Hakonarson, H., Spinner, N.B. (2010): Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. Hum. Mol. Genet. 19: 1263-1275.

20. Crolla, J.A., Youings, S.A., Ennis, S., Jacobs, P.A. (2005): Supernumerary marker chromosomes in man: parental origin, mosaicism and maternal age revisited. Eur. J. Hum. Genet. 13: 154-160.

21. Delhanty, J.D.A. (2005): Mechanisms of aneuploidy induction in human oogenesis and early embryogenesis. Cytogenet. Genome Res. 111: 237-244.

22. Devlin, L., Morrison, P.J. (2004): Accuracy of the clinical diagnosis of Down syndrome. Ulster Med. J. 73: 4-12.

23. Feenstra, I., Vissers, L.E.L.M., Orsel, M., van Kessel, A.G., Brunner, H.G., Veltman, J.A., van Ravenswaaij-Arts, C.M.A. (2007): Genotype–phenotype mapping of chromosome 18q deletions by high-resolution array CGH: an update of the phenotypic map. Am. J. Med. Genet., Part A. 143: 1858-1867.

24. Filippo, J.S., Sung, P., Klein, H. (2008): Mechanism of eukaryotic homologous recombination. Annu. Rev. Biochem. 77: 229-257.

25. Fisch, H., Hyun, G., Golden, R., Hensle, T.W., Olsson, C.A., Liberson, G.L. (2003): The influence of paternal age on Down syndrome. J. Urol. 169: 2275-2278.

26. Frank, S.A. (2010): Somatic evolutionary genomics: Mutations during development cause highly variable genetic mosaicism with risk of cancer and neurodegeneration. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107: 1725-1730.

27. Frías, J.L., Davenport, M.L. (2003): Health supervision for children with Turner syndrome. Pediatrics. 111: 692-702.

28. Foresta, C., Galeazzi, C., Bettella, A., Marin, P., Rossato, M., Garolla, A., Ferlin, A. (1999): Analysis of meiosis in intratesticular germ cells from subjects affected by classic Klinefelter's syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. 84: 3807-3810.

29. Foresta, C., Galeazzi, C., Bettella, A., Stella, M., Scandellari, C. (1998): High incidence of sperm sex chromosomes aneuploidies in two patients with Klinefelter's syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. 83: 203-205.

30. Gao, J., Liu, C., Yao, F., Hao, N., Zhou, J., Zhou, Q., Zhang, L., Liu, X., Bian, X., Liu, J. (2012): Array-based comparative genomic hybridization is more informative than conventional karyotyping and fluorescence in situ hybridization in the analysis of first-trimester spontaneous abortion. Mol. Cytogenet. 33.

31. Girirajan, S. (2009): Parental-age effects in Down syndrome. J. Genet. 88: 1-7.

32. Goldmann, R., Tichý, L., Freiberger, T., Zapletalová, P., Letocha, O., Soška, V., Fajkus, J., Fajkusová, L. (2010): Genomic characterization of large rearrangements of the LDLR gene in Czech patients with familial hypercholesterolemia. BMC Med. Genet. 11: 115-122.

33. Gottlieb, B., Beitel, L.K., Trifiro, M.A. (2001): Somatic mosaicism and variable expressivity. Trends Genet. 17: 79-82.

34. Gravholt, C.H., Fedder, J., Naeraa, R.W., Müller, J. (2000): Occurrence of gonadoblastoma in females with Turner syndrome and Y chromosomal material: a population study. J. Clin. Endocrinol. Metab. 85: 3199-3202.

35. Guttenbach, M., Koschorz, B., Bernthaler, U., Grimm, T., Schmid, M. (1995): Sex chromosome loss and aging: in situ hybridization studies on human interphase nuclei. Am. J. Hum. Genet. 57: 1143-1150.

36. Gu, W., Zhang, F., Lupski, J.R. (2008): Mechanisms for human genomic rearrangements. PathoGenetics. 1.

37. Halder, A., Jain, M., Kabra, M., Gupta, N. (2008): Mosaic 22q11.2 microdeletion syndrome: diagnosis and clinical manifestations of two cases. Mol. Cytogenet. 18.

38. Hamelin, C.E., Anglin, G., Quigley., C.A., Deal, C.L. (2006): Genomic imprinting in Turner syndrome: effects on response to growth hormone and on risk of sensorineural hearing loss. J. Clin. Endocrinol. Metab. 91: 3002-3010.

39. Harada, N., Abe, K., Nishimura, T., Sasaki, K., Ishikawa, M., Fujimoto, M., Matsumoto, T., Niikawa, N. (1998): Origin and mechanism of formation of 45,X/47,XX,+21 mosaicism in a fetus. Am. J. Med. Genet. 75: 432-437.

40. Hassold, T., Benham, F., Leppert, M. (1988): Cytogenetic and molecular analysis of sex-chromosome monosomy. Am. J. Hum. Genet. 42: 534-541.

41. Hassold, T., Hall, H., Hunt, P. (2007): The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. Hum. Mol. Genet. 16: 203-208.

42. Hassold, T., Hunt, P. (2009): Maternal age and chromosomally abnormal pregnancies: what we know and what we wish we knew. Curr. Opin. Pediatr. 21: 703-708.

43. Hassold, T., Hunt, P. (2001): To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. Nat. Rev. Genet. 2: 280-291.

44. Hassold, T., Pettay, D., Robinson, A., Uchida, I. (1992): Molecular studies of parental origin and mosaicism in 45,X conceptuses. Hum. Genet. 89: 647-652.

45. Held, K.R., Kerber, S., Kaminsky, E., Singh, S., Goetz, P., Seemanová, E., Goedde, H.W. (1992): Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes?. Hum. Genet. 88: 288-294.

46. Hook, E.B., Cross, P.K. (1987): Extra structurally abnormal chromosomes (ESAC): detected at amniocentesis: frequency in approximately 75,000 prenatal cytogenetic diagnoses and associations with maternal and paternal age. Am. J. Hum. Genet. 40: 83-101.

47. Hook, E.B., Warburton, D. (1983): The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner's syndrome: livebirth prevalence rates and evidence for diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities or mosaicism. Hum. Genet. 64: 24-27.

48. Hovatta, O., Hreinsson, J., Fridström, M., Borgström, B. (2006): Fertility and pregnancy aspects in Turner syndrome. Int. Congr. Ser. 1298: 185-189.

49. Hultén, M.A., Jonasson, J., Nordgren, A., Iwarsson, E. (2010): Germinal and somatic trisomy 21 mosaicism: how common is it, what are the implications for individual carriers and how does it come about?. Curr. Genomics. 11: 409-419.

50. Cheng, Y.K.Y., Wong, C., Wong, H.K., Leung, K.O., Kwok, Y.K., Suen, A., Wang, C.C., Leung, T.Y., Choy, K.W. (2013): The detection of mosaicism by prenatal BoBs™. Prenat. Diagn. 33: 42-49.

51. Cheung, S.W., Shaw, C.A., Scott, D.A., Patel, A., Sahoo, T., Bacino, C.A., Pursley, A., Li, J., Erickson, R., Gropman, A.L., Miller, D.T., Seashore, M.R., Summers, A.M., Stankiewicz, P., Chinault, A.C., Lupski, J.R., Beaudet, A.L., Sutton, V.R. (2007): Microarray-based CGH detects chromosomal mosaicism not revealed by conventional cytogenetics. Am. J. Med. Genet., Part A. 143: 1679-1686.

52. Chial, H. (2008): Somatic mosaicism and chromosomal disorders. Nature education. 1.

53. Choi, J.H., Choi, Y.J., Kim, S.Y. (2012): Congenital ocular anomaly in an infant with trisomy 14 mosaicism. Korean J. Ophthalmol. 26: 316-318.

54. Chu, C.E., Connor, J.M. (1995): Molecular biology of Turner's syndrome. Arch. Dis. Child. 72: 285-286.

55. Iourov, I.Y., Vorsanova, S.G., Yurov, Y.B. (2008): Chromosomal mosaicism goes global. Mol. Cytogenet. 1.

56. ISCN (2009): An international system for human cytogenetic nomenclature. Shaffer, L.G., Slovak, M.L., Campbell, L.J. (Eds.). S. Karger AG, Basel.

57. James, R.S., Dalton, P., Gustashaw, K., Wolff, D.J., Willard, H.F., Mitchell, C., Jacobs, P.A. (1997): Molecular characterization of isochromosomes of Xq. Ann. Hum. Genet. 61: 485-490.

58. Kalousek, D.K., Vekemans, M. (1996): Confined placental mosaicism. J. Med. Genet. 33: 529-533.

59. Karnis, M.F. (2012): Fertility, pregnancy, and medical management of Turner syndrome in the reproductive years. Fertil. Steril. 98: 787-791.

60. Kasparek, T.R., Humphrey, T.C. (2011): DNA double-strand break repair pathways, chromosomal rearrangements and cancer. Semin. Cell Dev. Biol. 22: 886-897.

61. Kočárek, E. (2007): Molekulární biologie v medicíně. Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, Brno.

62. Köhler, B., Lumbroso, S., Leger, J., Audran, F., Grau, E.S., Kurtz, F., Pinto, G., Salerno, M., Semitcheva, T., Czernichow, P., Sultan, C. (2005): Androgen insensitivity syndrome: somatic mosaicism of the androgen receptor in seven families and consequences for sex assignment and genetic counseling. J. Clin. Endocrinol. Metab. 90: 106-111.

63. Kotzot, D. (2002): Supernumerary marker chromosomes (SMC): and uniparental disomy (UPD): coincidence or consequence?. J. Med. Genet. 39: 775-778.

64. Koumbaris, G., Hatzisevastou-Loukidou, H., Alexandrou, A., Ioannides, M., Christodoulou, C., Fitzgerald, T., Rajan, D., Clayton, S., Kitsiou-Tzeli, S., Vermeesch, J.R., Skordis, N., Antoniou, P., Kurg, A., Georgiou, I., Carter, N.P., Patsalis, P.C. (2011): FoSTeS, MMBIR and NAHR at the human proximal Xp region and the mechanisms of human Xq isochromosome formation. Hum. Mol. Genet. 10: 1925-1936.

65. Kouru, K.H., Malmgren, H., White, I., Blennow, E. (2011): Hidden mosaicism for a structural chromosome rearrangement: a rare explanation for recurrent miscarriages and affected offspring?. Fertil. Steril. 95: 806-808.

66. Lamb, N.E., Yu, K., Shaffer, J., Feingold, E., Sherman, S.L. (2005): Association between maternal age and meiotic recombination for trisomy 21. Am. J. Hum. Genet. 76: 91-99.

67. Lee, C.G., Park, S.-J., Yun, J.-N., Yim, S.-Y., Sohn, Y.B. (2012): Reciprocal deletion and duplication of 17p11.2-11.2: Korean patients with Smith-Magenis syndrome and Potocki-Lupski syndrome. J. Korean Med. Sci. 27: 1586-1590.

68. Lee, J.A., Carvalho, C.M.B., Lupski, J.R. (2007): A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. Cell. 131: 1235-1247.

69. Leppig, K.A., Sybert, V.P., Ross, J.L., Cunniff, C., Trejo, T., Raskind, W.H., Disteche, C.M. (2004): Phenotype and X inactivation in 45,X/46,X,r(X) cases. Am. J. Med. Genet., Part A. 128: 276-284.

70. Liehr, T., Claussen, U., Starke, H. (2004): Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. Cytogenet. Genome Res. 107: 55-67.

71. Liehr, T., Karamysheva, T., Merkas, M., Brecevic, L., Hamid, A.B., Ewers, E., Mrasek, K., Kosyakova, N., Weise, A. (2010): Somatic mosaicism in cases with small supernumerary marker chromosomes. Curr. Genomics. 11: 432-439.

72. Liehr, T., Weise, A. (2007): Frequency of small supernumerary marker chromosomes in prenatal, newborn, developmentally retarded and infertility diagnostics. Int. J. Mol. Med. 19: 719-731.

73. Lim, A.S.T, Lim, T.H., Hess, M.M., Kee, S.K., Lau, Y.Y.F., Gilbert, R., Hempel, T.E., Anderson, K.J., Zaleski, D.H., Tien, S.L., Chia, P., Subramaniam, R., Tan, H.K., Tan, A.S.A., Sanger, W.G. (2010): Rapid aneuploidy screening with fluorescence in-situ hybridisation: is it a sufficiently robust stand-alone test for prenatal diagnosis?. Hong Kong Med. J. 16: 427-433.

74. Los, F.J., Van Opstal, D., van den Berg, C. (2004): The development of cytogenetically normal, abnormal and mosaic embryos: a theoretical model. Hum. Reprod. Update. 10: 79-94.

75. Mann, K., Hills, A., Donaghue, C., Thomas, H., Ogilvie, C.M. (2012b): Quantitative fluorescence PCR analysis of >40 000 prenatal samples for the rapid diagnosis of trisomies 13, 18 and 21 and monosomy X. Prenat. Diagn. 32: 1197-1204.

76. Mann, K., Ogilvie, C.M. (2012a): QF-PCR: application, overview and review of the literature. Prenat. Diagn. 32: 309-314.

77. Mantikou, E., Wong, K.-M., Repping, S., Mastenbroek, S. (2012): Molecular origin of mitotic aneuploidies in preimplantation embryos. Biochim. Biophys. Acta. 10: 1921-1930.

78. Matsuo, M., Muroya, K., Adachi, M., Tachibana, K., Asakura, Y., Nakagomi, Y., Hanaki, K., Yokoya, S., Yoshizawa, A., Igarashi, Y., Hanew, K., Matsuo, N., Ogata, T. (2000): Clinical and molecular studies in 15 females with ring X chromosomes: implications for r(X) formation and mental development. Hum. Genet. 107: 433-439.

79. McGinniss, M.J., Kazazian, H.H., Jr., Stetten, G., Petersen, M.B., Boman, H., Engel, E., Greenberg, F., Hertz, J.M., Johnson, A., Laca, Z., Mikkelsen, M., Patil, S.R., Schinzel, A.A., Tranebjaerg, L., Antonarakis, S.E. (1992): Mechanisms of ring chromosome formation in II cases of human ring chromosome 21. Am. J. Hum. Genet. 50: 15-28.

80. Messiaen, L., Vogt, J., Bengesser, K., Fu, C., Mikhail, F., Serra, E., Garcia-Linares, C., Cooper, D.N., Lazaro, C., Kehrer-Sawatzki, H. (2011): Mosaic type-1 NF1 microdeletions as a cause of both generalized and segmental neurofibromatosis type-1 (NF1). Hum. Mutat. 32: 213-219.

81. Moore, C.M., Best, R.G. (2001): Chromosomal genetic disease: structural aberrations. eLS.

82. Nijhuis-van der Sanden, M.W.G., Eling, P.A.T.M., Otten, B.J. (2003): A review of neuropsychological and motor studies in Turner syndrome. Neurosci. Biobehav. Rev. 27: 329-338.

83. Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F. (2004): Thompson & Thompson Klinická genetika. Vydání šesté. Triton, Praha.

84. Papavassiliou, P., York, T.P., Gursoy, N., Hill, G., Nicely, L.V., Sundaram, U., McClain, A., Aggen, S.H., Eaves, L., Riley, B., Jackson-Cook, C. (2009): The phenotype of persons having mosaicism for trisomy 21/Down syndrome reflects the percentage of trisomic cells present in different tissues. Am. J. Med. Genet., Part A. 149: 573-583.

85. Penrose, L.S. (1933): The relative effects of paternal and maternal age in mongolism. J. Genet. 27: 219-224.

86. Ranke, M.B. (1999): Turner syndrome. Eur. J. Endocrinol. 141: 216-217.

87. Rappold, G.A., Fukami, M., Niesler, B., Schiller, S., Zumkeller, W., Bettendorf, M., Heinrich, U., Vlachopapadoupoulou, 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. J. Clin. Endocrinol. Metab. 87: 1402-1406.

88. Robinson, W.P., Barrett, I.J., Bernard, L., Telenius, A., Bernasconi, F., Wilson, R.D., Best, R.G., Howard-Peebles, P.N., Langlois, S., Kalousek, D.K. (1997): Meiotic origin of trisomy in confined placental mosaicism is correlated with presence of fetal uniparental disomy, high levels of trisomy in trophoblast, and increased risk of fetal intrauterine growth restriction. Am. J. Hum. Genet. 60: 917-927.

89. Robinson, W.P., Wagstaff, J., Bernasconi, F., Baccichetti, C., Artifoni, L., Franzoni, E., Suslak, L., Shih, L.Y., Aviv, H. (1993): Uniparental disomy explains the occurrence of the Angelman or Prader-Willi syndrome in patients with an additional small inv dup(15) chromosome. J. Med. Genet. 30: 756-760.

90. Rosenfield, R.L., Perovic, N., Devine, N., Mauras, N., Moshang, T., Root, A.W., Sy, J.P. (1998): Optimizing estrogen replacement treatment in Turner syndrome. Pediatrics. 102: 486-488.

91. Rosypal, S. (2000): Úvod do molekulární biologie. Díl třetí. Třetí inovované vydání. Stanislav Rosypal, Brno.

92. Scott, S.A., Cohen, N., Brandt, T., Toruner, G., Desnick, R.J., Edelmann, L. (2010): Detection of low-level mosaicism and placental mosaicism by oligonucleotide array comparative genomic hybridization. Genet. Med. 12: 85-92.

93. Shaffer, L.G., Agan, N., Goldberg, J.D., Ledbetter, D.H., Longshore, J.W., Cassidy, S.B. (2001): American college of medical genetics statement on diagnostic testing for uniparental disomy. Genet. Med. 3: 206-211.

94. Shaffer, L.G., Bui, T.-H. (2007): Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. Am. J. Med. Genet., Part C. 145: 87-98.

95. Shaw, C.J., Lupski, J.R. (2004): Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. Hum. Mol. Genet. 13: 57-64.

96. Sherman, S.L., Allen, E.G., Bean, L.H., Freeman, S.B. (2007): Epidemiology of Down syndrome. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 13: 221-227.

97. Shchelochkov, O.A., Cooper, M.L., Ou, Z., Peacock, S., Yatsenko, S.A., Brown, C.W., Fang, P., Stankiewicz, P., Cheung, S.W. (2008): Mosaicism for r(X) and der(X)del(X)(p11.23)dup(X)(p11.21p11.22) provides insight into the possible mechanism of rearrangement. Mol. Cytogenet. 16.

98. Schwarz, K., Ma, Y., Pannicke, U., Lieber, M.R. (2003): Human severe combined immune deficiency and DNA repair. BioEssays. 25: 1061-1070.

99. Smyth, C.M., Bremner, W.J. (1998): Klinefelter syndrome. Arch. Intern. Med. 158: 1309-1314.

100. Snustad, D.P., Simmons, M.J. (2009): Genetika. Masarykova Univerzita/ Nakladatelství, Brno.

101. Speicher, M.R., Carter, N.P. (2005): The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. Nat. Rev. Genet. 6: 782-792.

102. Strachan, T., Read, A.P. (1999): Human molecular genetics. Edice druhá. Wiley-Liss, New York.

103. Sybert, V.P., McCauley, E. (2004): Turner's syndrome. N. Engl. J. Med. 351: 1227-1238.

104. Tarani, L., Lampariello, S., Raguso, G., Colloridi, F., Pucarelli, I., Pasquino, A.M., Bruni, L.A. (1998): Pregnancy in patients with Turner's syndrome: six new cases and review of literature. Gynecol. Endocrinol. 12: 83-87.

105. Toutain, J., Labeau-Gaüzere, C., Barnetche, T., Horovitz, J., Saura, R. (2010): Confined placental mosaicism and pregnancy outcome: a distinction needs to be made between types 2 and 3. Prenat. Diagn. 30: 1155-1164.

106. Uehara, S., Nata, M., Obara, Y., Niinuma, T., Funato, T., Yajima, A. (1997): A Turner syndrome woman with a ring X chromosome [45,X/46,X,r(X)(p22.3q27)] whose child also had a ring X chromosome. Fertil. Steril. 67: 576-579.

107. Van Echten-Arends, J., Mastenbroek, S., Sikkema-Raddatz, B., Korevaar, J. C., Heineman, M. J., van der Veen, F., Repping S. (2011): Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review. Hum. Reprod. Update. 17: 620-627.

108. Van, P.L., Bakalov, V.K, Zinn, A.R., Bondy, C.A. (2006): Maternal X chromosome, visceral adiposity, and lipid profile. JAMA. 295: 1373-1374.

109. Van Veghel-Plandsoen, M.M., Wouters, C.H., Kromosoeto, J.N.R., den Ridder-Klünnen, M.C., Halley, D.J.J., van den Ouweland, A.M.W. (2011): Multiplex ligation-depending probe amplification is not suitable for detection of low-grade mosaicism. Eur. J. Hum. Genet. 19: 1009-1012.

110. Vialard, F., Simoni, G., Aboura, A., De Toffol, S., Molina Gomes, D., Marcato, L., Serero, S., Clement, P., Bouhanna, P., Rouleau, E., Grimi, B., Selva, J., Gaetani, E., Maggi, F., Joseph, A., Benzacken, B., Grati, F.R. (2011): Prenatal BACs-on-Beads™: a new technology for rapid detection of aneuploidies and microdeletions in prenatal diagnosis. Prenat. Diagn. 31: 500-508.

111. Volpi, E.V., Bridger, J.M. (2008): FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. BioTechniques. 45: 385-409.

112. Warburton, D., Dallaire, L., Thangavelu, M., Ross, L., Levin, B., Kline, J. (2004): Trisomy recurrence: a reconsideration based on north american data. Am. J. Hum. Genet. 75: 376-385.

113. Weremowicz, S., Sandstrom, D.J., Morton, C.C., Niedzwiecki, C.A., Sandstrom, M.M., Bieber, F.R. (2001): Fluorescence in situ hybridization (FISH) for rapid detection of aneuploidy: experience in 911 prenatal cases. Prenat. Diagn. 21: 262-269.

114. Weterings, E., Chen, D.J. (2007): DNA-dependent protein kinase in nonhomologous end joining: a lock with multiple keys?. J. Cell Biol. 179: 183-186.

115. Wikström, A.M., Dunkel, L. (2008): Testicular function in Klinefelter syndrome. Horm. Res. 69: 317-326.

116. Wise, J.L., Crout, R.J., McNeil, D.W., Weyant, R.J., Marazita, M.L., Wenger, S.L. (2009): Cryptic subtelomeric rearrangements and X chromosome mosaicism: a study of 565 apparently normal individuals with fluorescent in situ hybridization. PLoS ONE. 4: 1-4.

117. Wolff, D.J., Brown, C.J., Schwartz, S., Duncan, A.M.V., Surti, U., Willard, H.F. (1994): Small marker X chromosomes lack the X inactivation center: implications for karyotype/phenotype correlations. Am. J. Hum. Genet. 55: 87-95.

118. Wolff, D.J., Miller, A.P., Van Dyke, D.L., Schwartz, S., Willard, H.F. (1996): Molecular definition of breakpoints associated with human Xq isochromosomes: implications for mechanisms of formation. Am. J. Hum. Genet. 58: 154-160.

119. Youssoufian, H., Pyeritz, R.E. (2002): Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans. Nat. Rev. Genet. 3: 748-758.

120. Yurov, Y.B., Iourov, I.Y., Vorsanova, S.G., Liehr, T., Kolotii, A.D., Kutsev, S.I., Pellestor, F., Beresheva, A.K., Demidova, I.A., Kravets, V.S., Monakhov, V.V., Soloviev, I.V. (2007): Aneuploidy and confined chromosomal mosaicism in the developing human brain. PLoS ONE. 2: 558-563.

121. Zvárová, J. (2011): Základy statistiky pro biomedicínské obory. Druhé doplněné vydání. Karolinum, Praha.