

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie

**Kateřina Budková**

**Metody molekulární cytogenetiky: vývoj, rozbor, srovnání**

Methods of molecular cytogenetics: evolution, analysis, comparison



**Bakalářská práce**

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Roman Šolc

PRAHA 2016

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Romanu Šolcovi za pomoc, trpělivost, podporu a cenné připomínky při tvorbě této bakalářské práce.

## **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 3. května 2016

## **Abstrakt**

Cytogenetika je věda zabývající se strukturou a funkcí chromosomů a to zejména v průběhu buněčného dělení. Chromosomální abnormality, které při tomto dělení mohou vznikat, jsou často spojeny se vznikem různých onemocnění. Cytogenetické metody slouží tak především k detekci těchto abnormalit. Zatímco klasické metody umožňovaly po dlouhá léta rozlišení na úrovni celých chromosomů, zavedení nových molekulárních metod vedlo k výraznému zpřesnění těchto analýz. Dnešní metody umožňují snadnou analýzu chromosomů až na úrovni jednotlivých sekvencí. I přes značné rozdíly mezi klasickými a moderními cytogenetickými metodami, nejsou klasické cytogenetické metody zatracovány, ale stále jsou široce používány. Výjimkou není ani kombinování klasických a molekulárních metod s cílem získání komplexní analýzy chromosomových přestaveb.

## **Klíčová slova**

metody molekulární cytogenetiky, pruhování chromosomů, fluorescenční in situ hybridizace, komparativní genomová hybridizace, polymerázová řetězová reakce, multiplex ligation-dependent probe amplification, onkocytogenetika

## **Abstract**

Cytogenetics is a branch of genetics that is concerned with the study of the structure and function of chromosomes, especially during the cell division. Chromosomal abnormalities that may occur during this process are often associated with the emergence of various diseases. Cytogenetic methods are primarily used to detect these abnormalities. Traditional methods allow resolution at the level of whole chromosomes, the introduction of new molecular methods led to a significant refinement of these analyzes. Today's methods allow easy analysis of chromosomes to the level of individual sequences. Despite significant differences between classical and modern cytogenetic techniques, classical cytogenetic methods are not evil, but they are still widely used. Combining classical and molecular methods in order to obtain a comprehensive analysis of chromosomal rearrangements is no exception.

## **Key words**

methods of molecular cytogenetics, chromosome banding, fluorescent in situ hybridization, comparative genomic hybridization, polymerase chain reaction, multiplex ligation-dependent probe amplification, oncocytogenetics

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Barvení a pruhování chromosomů</b> .....	<b>3</b>
2.1. Klasické barvení (solid staining) .....	3
2.2. Pruhování chromosomů.....	4
2.3. G-pruhování (G-banding, GTG).....	5
2.4. Ostatní techniky pruhování.....	5
<b>3. Fluorescenční in situ hybridizace FISH</b> .....	<b>7</b>
3.1. Metody využívající celogenomové (malovací) sondy .....	10
3.1.2. M-FISH a SKY .....	10
3.1.3. Mnohobarevné pruhování (M-BAND) .....	13
3.1.4. COBRA FISH .....	15
3.1.5. Colour changing karyotyping (CCK).....	15
3.2. Další modifikace in situ hybridizace .....	16
3.3. Interfázní FISH .....	17
<b>4. Komparativní genomová hybridizace (CGH)</b> .....	<b>19</b>
4.1. Microarray analýza (aCGH), „technologie genových čipů“ .....	23
<b>5. Metody založené na amplifikaci nukleových kyselin</b> .....	<b>25</b>
5.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	25
5.1.1. Modifikace PCR.....	28
5.2. MAPH (Multilocus amplifiable probe hybridization) .....	29
5.3. MLPA (Multiplex ligase-dependent probe amplification) .....	31
<b>6. Závěr</b> .....	<b>33</b>
Seznam použitých zkratk:.....	35
Seznam citované literatury: .....	36

## 1. Úvod

Cytogenetika, stejně jako ostatní obory biologie, zejména pak molekulární biologie, prodělala za posledních 50 let mnoho technologických změn. Rychlost a přesnost diagnostických metod cytogenetické analýzy umožnily identifikaci mnoha chromosomálních abnormalit. Tyto abnormality jsou často také diagnostickými markery v oblasti onkologie, kde bývá právě rychlost analýzy v mnoha případech klíčová. Nepostradatelnou úlohu nehrají však pouze v diagnostice v klinické praxi humánní medicíny, ale i v mnoha dalších odvětvích přírodních věd. Moderní molekulární metody jsou nyní schopné identifikovat chromosomální dysbalance na úrovni sekvence DNA. Nebylo tomu však vždy. Následující text má za úkol popsat vývoj těchto technik, zmapovat jejich klinické využití a zhodnotit jejich klady či zápory. K otevření dveří do světa cytogenetiky bylo potřeba odemknout mnoho zámků. K základnímu pochopení bylo potřeba seznámit se blíže s chromosomy a získat lepší znalosti o jejich struktuře a funkci.

První je zjištění, že právě chromosomy jsou nositeli genetické informace, druhým jaká je jejich struktura a třetím, že jejich počet je neměnný. Všechny výše zmíněné objevy na sebe v průběhu let navazovaly. Jedinou záhadou zůstával po dlouhá léta jejich přesný počet.

Za pomyslnou startovací čáru moderní cytogenetiky člověka lze tak bez pochyby považovat stanovení správného počtu chromosomů v jádrech lidských buněk (*Homo sapiens*). Somatické (diploidní) buňky člověka mají 46 chromosomů. Tento zásadní objev se odehrál v roce 1955 ve Švédském městě Lund a stála za ním dvě jména: Joe-Hin Tjio a Albert Levan (P. S. Harper 2006). Zajímavou skutečností je to, že výzkum nebyl primárně zaměřen na problematiku počtu lidských chromosomů, nýbrž na výzkum nádorově transformovaných buněk. K objevu vedlo několik technologických činitelů, bez jejichž přítomnosti by ke stanovení korektního počtu chromosomů vůbec nemohlo dojít (Kottler 1974).

Tjio a Levan použili kultury lidských embryonálních fibroblastů původem z plic, které předběžně ošetřili hypotonickým roztokem chloridu draselného (KCl). Omývání kultur tímto roztokem má za následek zvětšení objemu buněk, včetně jejich jader a zároveň separaci chromosomů, které se tak stávají lépe detekovatelnými (Hsu 1952; Argüello-Miranda and Sáenz-Arce 2008). Dalším krokem kupředu bylo znemožnění klasického průběhu mitózy pomocí roztoku kolchicinu. K tomuto objevu došel sám Levan, při sledování průběhu mitózy v kořenových špičkách cibulí po ošetření různě koncentrovaným roztokem kolchicinu. Dnes již víme, že kolchicin díky svým cytostatickým účinkům brání růstu mikrotubulů a způsobuje

zastavení rozchodu chromosomů v metafázi. V praxi zaznamenal Levan tuto skutečnost tak, že chromosomy namísto seřazení do ekvatoriální roviny byly v buňce nesystematicky roztroušeny. I přes to, že je kolchicin pro člověka vysoce nebezpečným buněčným jedem, u rostlin buněčnou smrt nezpůsobuje ani louhování kořenových špiček v 2% roztoku kolchicinu po dobu 72 hodin. (Levan and Östergen 1943). Přítomnost kolchicinu vyvolává vznik polyploidních forem (Blakeslee, 1937).

Zásadní bylo taktéž nahrazení klasického postupu přípravy savčích buněk použitím takzvané *squash technique*, kdy jsou celé buňky nanесeny na podložní sklo, překryty sklem krycím a pozorovány ve světelném mikroskopu. Důsledkem toho se chromosomy srovnají do jedné optické roviny, což zdatelně usnadňuje jejich pozorování. Posledním faktorem bylo použití mikrofotografie, namísto ručních výkresů chromosomů (P. S. Harper 2006). Správnost tohoto zjištění, byla potvrzena ještě v téže roce kdy při sledování meiotických buněk z lidských vaječníků, bylo detekováno 23 párů chromosomů (Ford and Hamerton 1956). Definitivně se tak podařilo vyvrátit 30 let staré dogma o čísle 48 a otevřely se dveře dalšímu detailnímu zkoumání lidského karyotypu (Painter 1923).

O tři roky později si Jerome Lejune při pozorování kultur fibroblastů při mitóze všiml strukturální změny - přítomnosti malého nadpočetného chromosomu. Vzorky pocházely od devíti pacientů trpících mongolismem (dřívější označení pro Downův syndrom) a Lejune označil jako původce tohoto onemocnění právě trisómii 21. chromosomu (Lejeune, Gautier, and Turpin 1959). Ve stejném roce byla indikována přítomnost nadbytečného X chromosomu u mužských pacientů trpících Klinefelterovým syndromem (Ford et al. 1959). Významným objevem, který značně přispěl ke zjednodušení další práce na zkoumání lidského karyotyp, byl objev phytohaemagglutininu (PHA), jakožto vhodného substrátu pro růst a kultivace buněk, (Anders, Moores, and Emanuel 1966).

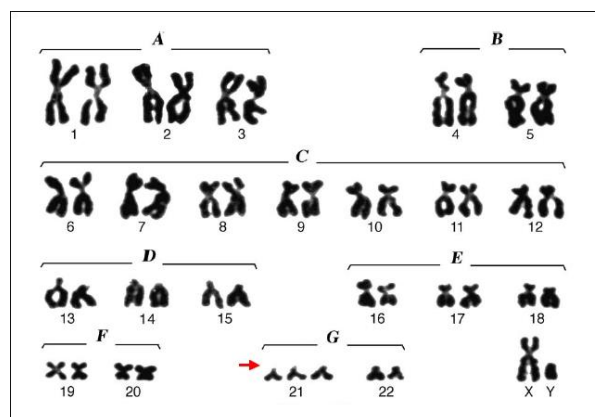
Pozornost se tak postupně začala obracet na aplikaci těchto výsledků do klinické cytogenetiky. S přibývajícimi objevy bylo zapotřebí dále zlepšit techniky identifikace chromosomů.

## 2. Barvení a pruhování chromosomů

V letech 1968-1970 byly objeveny a zavedeny metody pruhování chromosomů, které umožnily pozorování nejen jednotlivých chromosomů, ale i jejich struktur a to až do rozlišení 5 – 10 Mb. Vznikl tak nový systém klasifikace chromosomů. Později v návaznosti na tento systém vznikla norma pro popis změn v karyotypu a chromosomových aberací ISCN (International System of Cytogenetic Nomenclature), která s menšími úpravami platí dodnes (Kosyakova et al. 2009).

### 2.1. Klasické barvení (solid staining)

Bez jakéhokoliv ošetření je velmi složité detekovat pod světelným mikroskopem strukturní detaily chromosomální stavby. Obarvení chromosomů se provádí roztokem Giemsa-Romanowski. Tento způsob barvení, který nese jméno německého chemika Gustava Giemsy, byl původně určen pro demonstraci parazitů, způsobujících malárii. Pro vysokou kvalitu barevní chromatinu začal být používán i v histologii a následně cytogenetice. Žádné další chemikálie nejsou používány. Po tomto ošetření jsou chromosomy rovnoměrně nabarveny, bez jakéhokoliv vizualizace proužků. Díky tomu lze chromosomy pouze rozdělit do skupin (A-G) dle jejich velikosti a umístění centromery. Pouhým nabarvením chromosomů jsme schopni detekovat pouze numerické odchylky (O'Connor 2008; Barcia 2007). Jednotné obarvení chromosomů však brání jednoznačné identifikaci jednotlivých chromosomů a detekci většiny strukturních aberací. Z tohoto důvodu bylo vyvinuto velké úsilí pro vynalezení techniky, která poskytne jasné rozlišení mezi různými páry chromosomů (Smeets 2004).



▲ **Obr. 1. Klasické barvení** karyotypu jedince s trisomií chromosomu 21 (Downův syndrom); označeno červenou šipkou. Chromosomy jsou rozděleny na skupiny autosomů A-G (na základě jejich celkové délky a umístění centromery) a pohlavní chromosomy – převzato z Smeets, 2004

## 2.2. Pruhování chromosomů

Pruhování chromosomů je základní metodou klasické cytogenetiky. Tato technika produkuje řadu odpovídajících orientačních bodů po celé délce chromosomů, které umožňují jak rozpoznání jednotlivých chromosomů v rámci celého genomu, ale i identifikaci specifických segmentů jako jsou místa chromosomálních zlomů a změn, či umístění konkrétních genů. Princip dále zmíněných technik pruhování je principiálně srovnatelný, liší se ve složení barviv a oblastí, které zvýrazňují (Schreck and Distèche 2001).

Chromosomy jsou tak vizualizované za pomoci *pruhů*. Za pruh je považována část chromosomu, která je jasně rozeznatelná tím, že se jeví tmavší či světlejší od sousedních segmentů. Celé chromosomy se tak v konečném důsledku sestávají z nepřerušované řady světlých a tmavých proužků připomínajících čárové kódy. Až na výjimky je pro tyto účely nutné získat chromosomy metafázních buněk. Buňky jsou nejdříve kultivovány. Jednotlivé kultivační protokoly se vzájemně liší v závislosti na původu buněk, ale i na jejich dalším osudu a vybavení cytogenetické laboratoře.

K zastavení buněčného cyklu v metafázi se obecně používají inhibitory tubulinu jako je výše zmíněný kolchicin nebo méně toxický demekolcin. Takto připravené buňky se nanosou na podložní sklíčko, jsou obarveny vhodným barvivem a vizualizované pomocí světelného mikroskopu, který je i přes nové technologie dnešní doby nenahraditelným vybavením cytogenetické laboratoře (Yang, Ganguly, and Cabral 2010).

Konečné rozlišení závisí na kondenzaci chromosomů a stádiu mitózy, ve které jsou chromosomy zachyceny. Rozlišení 350 pruhů odpovídá chromosomům zachyceným v pozdní metafázi (Bickmore 2001).

Aplikace pruhovacích technik na již dobře známé klinické syndromy poskytla v minulosti zcela jiný pohled na skutečné příčiny těchto onemocnění. Syndromy jako jsou Prader–Willi syndrom (PWS), Smith-Magenis syndrom (SMS) či VKF syndrom (Velo Kardio Facial) byly spojeny s konkrétními genovými mutacemi, které je způsobují. Byl také vytvořen základní koncept mikrodelece (Smeets 2004).

Zásadní nedostatek pruhování chromosomů spočívá v jeho značně limitujících možnostech rozlišení (5-8 Mb) a neschopnosti tak detekovat mnohé komplexní chromosomální přestavby. Zejména tak na poli onkocytogenetiky, brání špatná čitelnost karyotypů se špatnou kvalitou metafázi často samotné počáteční detekci chromosomálních přestaveb a jejich následnému objasnění (Károly Szuhai et al. 2000). Využití dodnes nachází

například v detekci aneuploidií, které vznikají v důsledku nepřítomnosti nebo nadpočetnosti chromosomů a jsou tak snadno detekovatelné i pomocí pruhování.

I přes výše zmíněné nedostatky je pruhování chromosomů hojně používanou metodou. Průměrná doba zpracování jednoho vzorku se pohybuje od jednoho dne až do jednoho týdne. Výhodou je bezpochyby i cena vztažená na jeden vzorek, snadná příprava a technická nenáročnost (Salman, Jhanwar, and Ostrer 2004).

### **2.3. G-pruhování (G-banding, GTG)**

Giemsa se stala nejpoužívanějším barvivem pro analýzu lidského karyotypu zejména pro svou spolehlivost, jelikož s ní lze ve výsledku dosáhnout vysoce specifických pruhů. Výhodou je bezpochyby i nízká finanční nákladnost metody (Barcia 2007).

Při G-pruhování jsou chromosomy nejčastěji vystaveny účinkům trypsinu, který jakožto proteolytický enzym, z části natráví chromosomální proteiny. Tím dochází k uvolnění struktury chromatinu a umožnění lepšího přístupu barviva. Tato procedura je nejen rychlá, ale také finančně nenáročná (Seabright 1971).

Proteolytické enzymy nejsou však jediná činidla, která se k denaturaci chromosomů používají. Časté jsou také metody jako je například *SSC-technique*, při které se denaturace dosahuje pomocí působení slaných roztoků a vysoké teploty. Je doloženo také používání chelatačních činidel, močoviny, nebo roztoků deficitních dvojmocných kationtů  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$ . To vše s cílem změnit strukturu chromosomů před barvením. (Özkinay and Mitelman 1979; Sun, Chu, and Chang 1974). Získané pruhy v charakteristických oblastech ramen chromosomů nám umožňují identifikace strukturních i numerických abnormalit. To je užitečné pro detekci malých strukturálních změn chromosomů.

### **2.4. Ostatní techniky pruhování**

#### ***R-pruhování (reverse banding)***

produkuje proužky komplementární s G-pruhováním. Metoda je založena na působení vysoké teploty a inkubace ve fosfátovém pufru. Vysoká teplota ( $85^{\circ}\text{C}$ ) působí na úseky DNA bohaté na adenin a thymin a rozpouští je. K obarvení proto dochází jen v místech bohatých na cytosin a guanin. Vzorky jsou barveny akridinovou oranží, nebo klasicky Giemsou. Výhodou oproti GTG je lepší vizualizace konců chromosomů, podává proto detailnější informace o úsecích v blízkosti telomery (Verma 1975). Je také velmi používanou metodou pro identifikace pozdně se replikujícího inaktivního chromosomu X.

### ***Q-pruhování (quinacrine banding)***

je metodou, zahrnující použití fluorescenčního barviva chinakrinu, který alkyluje DNA. Tato metoda je nejužitečnější pro zkoumání chromosomálních translokací, zejména těch, které souvisejí s chromosomem Y. Ve srovnání s G-barvením je tato metoda finanční náročnější vzhledem k nutnosti vizualizace za pomoci fluorescenčního mikroskopu. Další nevýhodou je, že při delší expozici UV světlem dochází ke slábnutí fluorescenčního signálu (Baj et al. 2005).

### ***T-pruhování (terminal banding)***

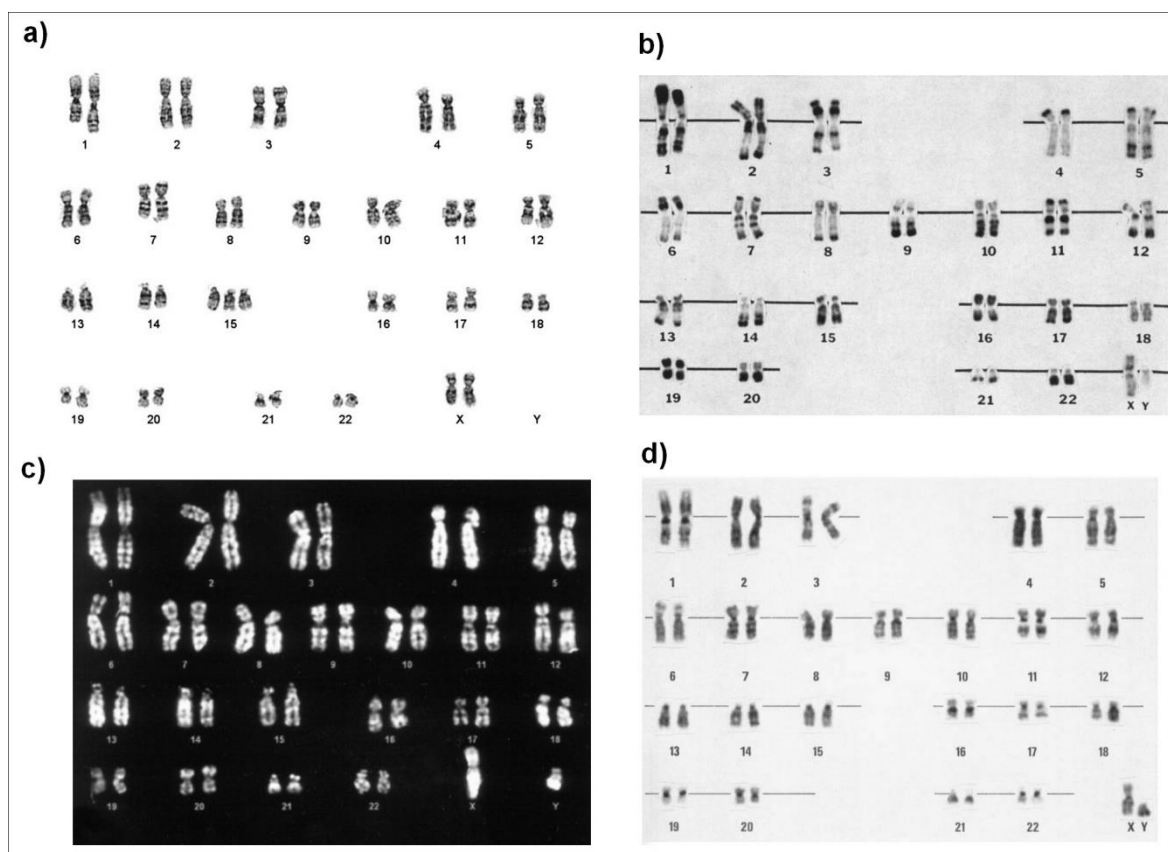
zahrnuje barvení telomerických oblastí chromosomů za použití buď Giemsky nebo akridinové oranže. T pruhy představují podskupinu R pásem (80 % T pruhů koresponduje s pozicí R pruhů) a jsou striktně telomerické (Mezzelani et al. 1996).

### ***C-pruhování (centromeric banding)***

detekuje přítomnost konstitutivního heterochromatinu, proto jsou pruhy vizualizované v centromerických oblastech chromosomu. Výjimku tvoří lidský chromosom Y, kde je tento typ heterochromatinu lokalizován na distální části dlouhých ramének chromosomu. Procedura zahrnuje ošetření HCl, Ba(OH)<sub>2</sub> a horkým pufrem. Metoda je zřídka využívána pro diagnostické účely (Bickmore 2001).

### ***Ag-NOR pruhování (NOR banding)***

je obdobou C pruhování. Dochází k vizualizaci oblastí organizátoru jádérka (nucleolus organizing region) zvaných NORy. Proces barvení probíhá za přítomnosti roztoku dusičnanu stříbrného. Výsledný karyotyp je charakteristický přítomností černých sraženin v oblastech akrocentrických chromosomů, k jejichž vyšetření je tato metoda využívána (Wang 2002; Salman, Jhanwar, and Ostrer 2004).



▲ Obr. 2. Metody pruhování chromosomů

a) G-pruhování (Sandberg and Meloni-Ehrig 2010); b) R-pruhování (Verma 1975); c) Q-pruhování (Baj et al. 2005); d) C-pruhování (Özkinay and Mitelman 1979)

### 3. Fluorescenční in situ hybridizace FISH

Jak již bylo zmíněno, pruhovací techniky vyžadují chromosomy v metafázi a rozdíl mezi vizualizovanými chromosomy jsou často velmi obtížně rozlišitelné. Bylo proto potřeba přijít s metodou, která nevyžadovala právě se dělicí buňky a zároveň zlepšit i metody barvení a následné vizualizace. Řešením se stala fluorescenční in situ hybridizace – metoda, která povýšila klasickou cytogenetiku na molekulární vědu.

FISH umožňuje zviditelnění sekvencí nukleových kyselin přímo na chromosomových preparátech a to i interfázních buněk (I-FISH). Může být použita k identifikaci jednotlivých chromosomů, přestaveb mezi nimi a jejich částí jako jsou centromery, telomery, nebo dokonce i jednotlivé geny. FISH je schopna detekovat přestavby větší než 0,5 kbp (Salman, Jhanwar, and Ostrer 2004).

Za použití jednořetězcové hybridizační sondy, je možné fluorescenčně označit specifickou oblast DNA. *Sondou* je myšlen oligonukleotid, který se skládá ze sekvence bází,

komplementárních se sekvencí cílovou, tedy tou, kterou má sonda označit a při párování bází se s ní hybridizuje. Díky tomu, že je sonda označena přímo pomocí fluorochromů, lze za pomoci fluorescenčního mikroskopu detekovat signál v místě, kde k navázání došlo, tjn. místo vazby sondy detekujeme jako fluorescenční signál. Dle počtu a místa jednotlivých signálů odvozujeme případné numerické či strukturní odchylky chromosomu. Pokud daný signál ve výsledku nelze detekovat, znamená to, že sonda nemohla být navázána a cílový úsek tak v daném úseku genomu chybí.

Příprava sond může probíhat dvěma způsoby: prvním způsobem je přímá amplifikace metodou PCR. Druhým způsobem je klonování prostřednictvím vektorů, jako jsou plazmidy, kosmidy, bakteriofágy (BAC), nebo umělé kvasinkové chromosomy (YAC). Výběr vektoru závisí na délce klonovaného úseku. Délka sondy pro FISH se pohybuje v rozmezí od 300 – 600 bp. Správná délka použité sondy zásadně ovlivňuje správnost celého experimentu. V praxi je často cílový úsek delší než délka sondy, řešením je sondu naštěpit na úseky menší než 200 nukleotidů. V opačném případě by takto dlouhá sonda generovala matoucí signál, protože tak velký počet fluorochromů by způsobil intenzivně fluoreskující signál. Koncentrace sond vždy převyšuje koncentraci cílové DNA.

Použitím příliš krátké sondy zvyšujeme riziko zachycení stejných sekvencí i na dalších místech genomu, klesá tak celková specifita analýzy. Tyto sondy disponují také velmi slabým, často nedetekovatelným, fluorescenčním signálem. Použitím naopak příliš dlouhé sondy riskujeme, že cílová DNA nebude sondou vůbec zachycena (Pinkel, Straume, and Gray 1986; Lawrence et al. 1988).

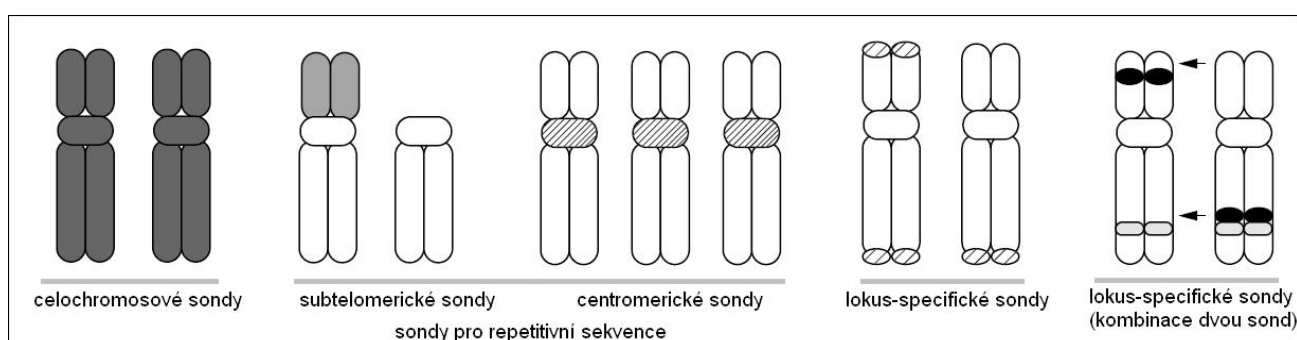
Podle cílové sekvence, na kterou se sonda váže, dělíme sondy na:

***lokus-specifické sondy („genové“)*** – tyto sondy hybridizují s jednotlivými geny či skupinami genů. Jsou používány k identifikaci translokací, inverzí, duplikací a delecí, ale také syndromů přilehlých genů nebo marker chromosomů. V cytogenetické analýze jsou nejpoužívanější ze všech typů sond (Pinkel et al. 1988).

***sondy pro repetitivní sekvence („satelitní“)*** – tyto sondy hybridizují s repetitivními sekvencemi chromosomu a to zejména v subtelomerických, telomerických a centromerických oblastech. Centromerické sondy umožňují detekovat původ derivovaných chromosomů (zejm. marker chromosomů) a aneuploidii interfázních jader. Jsou neodmyslitelnou součástí diagnostiky v lékařské genetice, onkologii a reprodukční medicíně (zejm. PDG). Subtelomerické sondy odhalují nepatrné chromosomální přestavby, nejčastěji translokace.

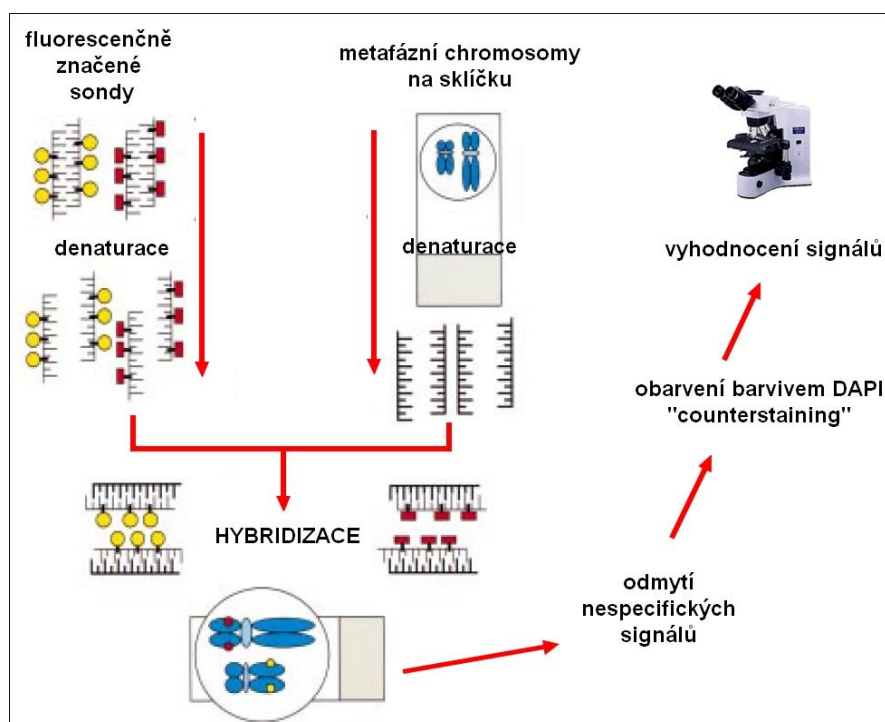
Sondy jsou využitelné i pro analýzu interfázních buněk, a tak nacházejí své uplatnění v metodě I-FISH (Michalová and Zemanová 2005).

*celochromosomové sondy („malovací“)* – tyto sondy hybridizují s mnohočetnými chromosomovými sekvencemi, a tak umožňují označit téměř celý chromosom (s výjimkou centromerických a telomerických úseků). Praktický význam mají zejména v onkologii, kde se používají pro vyšetření chromosomových přestaveb v nádorových buňkách. (Salman, Jhanwar, and Ostrer 2004). Modifikacím FISH využívajícím malovací sondy je dále věnována samostatná kapitola.



▲ Obr. 3. Schematické znázornění typů sond

– upraveno dle Waters et al. 1998



▲ Obr. 4. Schematické znázornění postupu při klasické FISH

– upraveno dle Waters et al. 1998

Zavedením FISH do laboratoří klinické cytogenetiky došlo k významnému zvýšení rozlišení analyzovaných vzorků. Klasická FISH umožnila vznik širokého spektra vlastních modifikací, díky kterým můžeme hovořit o všudy přítomnosti této techniky. I když základní princip in situ hybridizace zůstal nezměněn, zásadním pokroky se odehrály a dodnes odehrávají na poli citlivosti detekce, sběru dat či celkové automatizace analýzy. (Pinkel, Straume, and Gray 1986; M. E. Harper, Ullrich, and Saunders 1981).

Jako příklad zásadních objevů, jichž bylo dosaženo pomocí této metody, lze uvést například důkaz, že akutní myeloidní leukémie (AML) je spojena s inverzí v blízkosti centromery lidského chromosomu 16, která vede k fúzi dvou chromosomu 16 genů: CBFβ a MYH11. Zlepšilo se tak naše chápání abnormální klonální tvorby zahrnující různé oblasti genu (Liu et al. 1993).

Studie diagnostiky melanocytárních lézí taktéž zajišťuje časnou a přesnou diagnostiku zejména nejednoznačných nálezů těchto lézí (Dvořáčková et al. 2013).

FISH je ve srovnání s cytogenetickými metodami dnešní doby již příliš časově náročný a cílený způsob analýzy, který vyžaduje předchozí znalost chromosomální oblasti zájmu. Neposkytuje celogenomový přehled případných genetických nestabilit, vrací pouze výsledek, o který je přímo požádán (na který cílí sonda) (Salman, Jhanwar, and Ostrer 2004).

### **3.1. Metody využívající celogenomové (malovací) sondy**

Celogenomové sondy představují komplexní DNA sondy, které jsou vytvářeny pomocí PCR iniciované degenerovanými primery (DOP-PCR). Vzorky DNA pro následnou amplifikaci pocházejí nejčastěji ze specifických knihoven DNA nebo jsou získány za pomoci mikrodisekce požadované části chromosomu.

#### **3.1.2. M-FISH a SKY**

Dvě nejrozvinutější modifikace FISH, které využívají malovací sondy, jsou M-FISH (Multicolor Fluorescent In Situ Hybridization) a SKY (Spectral Karyotyping). Zavedení těchto technik se pojí s rokem 1996 (M. R. Speicher, Ballard, and Ward 1996; Schröck et al. 1996). Různými modifikacemi těchto metod se v průběhu let podařilo vytvořit impozantní arzenál dostupných technologií vícebarevné-FISH.

Obě tyto metody umožňují simultánní vizualizaci každého z 24 lidských chromosomů (22 autozomů + 2 pohlavní chromosomy X a Y) jinou barvou. Každá sonda je značena různou kombinací a koncentrací jednoho až pěti fluorescenčních barviv (fluorochromů). Výsledkem

je unikátní kombinace barviv pro každý chromosom. V prvních experimentech s M-FISH byly používány následující fluorochromy: FITC (excitační maximum 490 nm; emisní maximum 520 nm) a kyanidová barviva Cy3 (554 nm; 568 nm), Cy3.5 (581 nm; 588 nm), Cy5 (652 nm; 672 nm) a Cy7 (755nm; 778 nm). V dnešní době je k dispozici mnohonásobně větší a rozmanitější nabídka fluorochromů (Michael R Speicher 2001).

K rozlišení sond, které jsou značeny stejnou kombinací fluorochromů, dochází pomocí porovnání různých rozměrů a poměrů použitých fluorochromů. Počet cílových sekvencí, které je možné identifikovat, odpovídá  $2^n - 1$ , kde  $n$  označuje počet fluorochromů (Kakazu and Abe 2006; Macville et al. 1997).

Kombinační a poměrové značení využívá princip Booleovo proměnné pro každou jednotlivou sondu. Výpočet se řídí následujícím vzorcem:

$$\text{Počet barev} = n = \frac{r \cdot n!}{2^{*(n-2)!}}, \text{ kde } n = \text{počet fluorochromů, } r = \text{počet kombinací.}$$

Použitím 3 fluorochromů lze vytvořit 12 barev, použitím 5 fluorochromů 24 barev (Fauth and Speicher 2001).

Hlavní rozdíl mezi metodami M-FISH a SKY je způsob snímání obrazu:

Při M-FISH se zachycují jednotlivé snímky pro každý z pěti fluorochromů pomocí 6 speciálních filtrů s úzkou propustností. Pět filtrů na každý fluorochrom + šestý filtr na barvivo DAPI (*4',6-diamidino-2-fenylindol*), které slouží k podbarvení všech chromosomů. Tyto snímky jsou posléze zpracovány počítačovým programem, který generuje celkový obraz a na základě intenzity fluorescence přiřadí příslušným chromosomům *pseudobarvy*, které slouží ke snadnější klasifikaci (Salman, Jhanwar, and Ostrer 2004; Wang 2002).

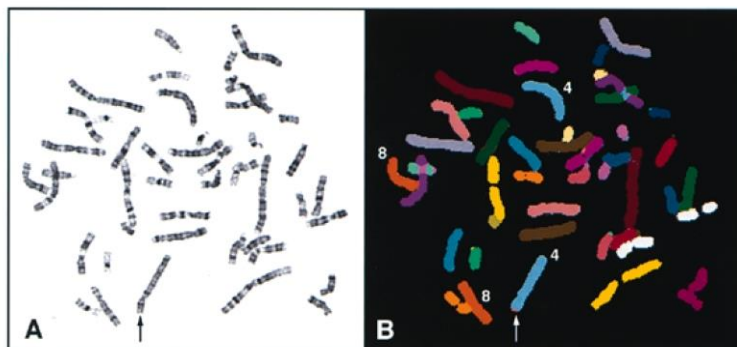
Snímání obrazu u SKY probíhá na rozdíl od M-FISH synchronně v jednom kroku, nikoliv po jednotlivých filtrech. Používaná kombinace fluorescenčního mikroskopu, chlazené CCD kamery (charge-coupled device) s vysokým rozlišením a Fourierova spektroskopu umožňuje měření celého emisního spektra pouze s jednou expozicí na všech bodech obrazu (M. R. Speicher, Ballard, and Ward 1996).

Hlavním využitím obou metod je rozšířené cytogenetické vyhodnocení maligních onemocnění a to díky poskytnutí dodatečných informací a lepší charakterizaci aberantních chromosomů, obsahujících sekvence DNA, které za použití konvenčních způsobů pruhování není možné označit.

Existuje mnoho studií potvrzujících význam metody SKY při identifikaci všech složitých chromosomálních přestaveb – balancovaných i nebalancovaných (včetně kryptických). Obzvláště užitečná je i při práci s komplexními aberacemi. Ty bývají často spojené s různými typy pevných nádorů, a tak nachází praktické využití v onkologii. (Smeets 2004). SKY bývá aplikována na různé nádorové skupiny, včetně hematologických malignit, sarkomů, karcinomů a nádorů na mozku, se záměrem identifikovat specifické chromosomální abnormality, které mohou poskytnout vhled do genů zapojených do procesu onemocnění, stejně jako identifikující opakuující se cytogenetických markerů pro klinickou diagnostiku a posouzení prognózy. Bývá tak již považována za součást rutinního cytogenetické diagnostiky, například ALL (Akutní Lymfoblastické Leukémie) (Lu et al. 2002).

Stejně jako u ostatních metod existují i variace metody M-FISH vytvořené za použití specifických setů sond, ne pouze malovacích sond, které byly pro M-FISH primárně využívány. Jedná se především o specifické centromerické sondy, které nacházejí své využití především v klinické cytogenetice (cenM-FISH). Sub-centromerické sady sond (subscenM-FISH) které jsou, na rozdíl od ostatních dostupných setů sond pro klasickou FISH či M-FISH, schopny vizualizovat euchromatin v blízkosti centromer, jehož signál bývá často nedostatečný, nebo případně dochází k jeho překryvu fluorescenčním signálem centromery. Dále také sondy pro vizualizaci krátkých ramen chromosomů a centromer chromosomů akrocentrických (acroM-FISH, acro-cenM-FISH). Svou využitelnost v analýze M-FISH našly i lokus-specifické sondy, jejichž komerčně dostupné sety se již běžně využívají v prenatální diagnostice zejména pro detekci trisomií chromosomů 13 a 21 a preimplantační diagnostice v rámci asistované reprodukce (Pietrzak et al. 2007; Liehr et al. 2004).

Pro specifické účely, jako je například detekce lidského papillomaviru, lze k těmto malovacím sondám přidat bonusovou sondu například *single copy probe* pro specifickou sekvenci a vytvořit tak zcela jedinečný set (K Szuhai et al. 2001). Spojením specifických centromerických sond a jedné lokus-specifické sondy lze taktéž vytvořit specifický sadu sond pro citlivou detekci uroteliálního karcinomu, který je druhou nejčastější urologickou malignitou (Sokolova et al. 2000).

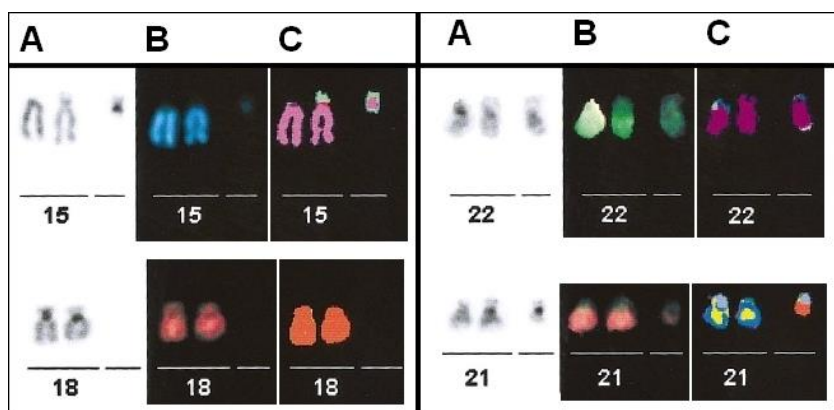


**▲ Obr. 5. Analýza SKY využita pro prokázání Wolfův-Hirschhornovo syndromu.**

A) G-pruhování metafázních chromosomů značí mírnou abnormalitu telomerické oblasti chromosomu 4 (označeno šipkou).

B) SKY analýza potvrzuje nebalancovanou translokaci mezi chromosomy 4 a 8 [46, XY, der (4) t (4; 8)]

- převzato z Ried et al. 1998



**▲ Obr. 6. Analýza M-FISH vybraných chromosomů**

A) G-pruhování;

B) reálné barvy;

C) klasifikační „pseudobarvy“

- upraveno dle Uhrig et al. 1999

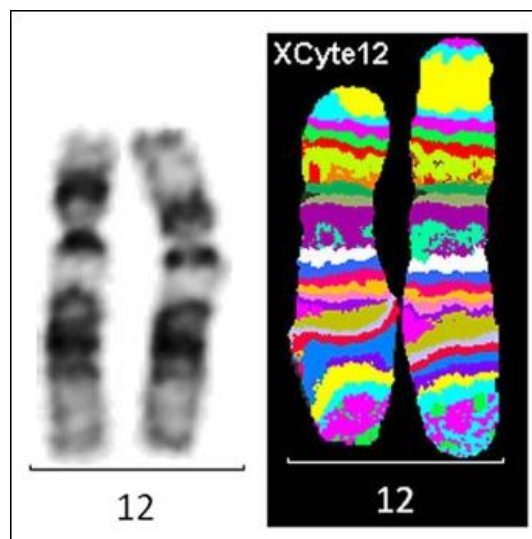
### 3.1.3. Mnohobarevné pruhování (M-BAND)

Mnohobarevné pruhování je modifikací metody M-FISH. K analýze je zde však využíváno parciálních malovacích sond, které hybridizují pouze se specifickými oblastmi chromosomu. Tyto parciální DNA sondy jsou, stejně jako klasické malovací sondy, získávány mikrodisekcí jednotlivých částí daného chromosomu, amplifikovány pomocí DOP-PCR a v následné PCR označeny třemi až pěti různými fluorchromy. Po úspěšné hybridizaci sond dochází k částečnému překrytí signálů podél sledovaných chromosomů. V důsledku toho

dochází ke snižování intenzity fluorescence směrem k okraji signálů a následným pozorovatelným změnám intenzity fluorescenčních signálů podél svislé osy chromosomů.

Vyhodnocení je prováděno na fluorescenčním mikroskopu, který je schopen počítačového snímání obrazu. Na základě zmíněných změn intenzity signálu je počítačový software schopen přiřadit k jednotlivým částem chromosomu klasifikační barvy. V dnešní době je k dispozici mnoho komerčně dostupných sad parciálních malovacích sond s rozdílnou kvalitou rozlišení. Nejnížší kvalitu rozlišení poskytují sady sond RX-FISH či Harlequin-FISH a to v rozmezí 80-90 pruhů na haploidní lidský karyotyp. Naopak nejvyššího rozlišení dosahují sondy MCB / mBAND, které umožňují rozlišení až 550 pruhů na haploidní lidský karyotyp (Liehr et al. 2004).

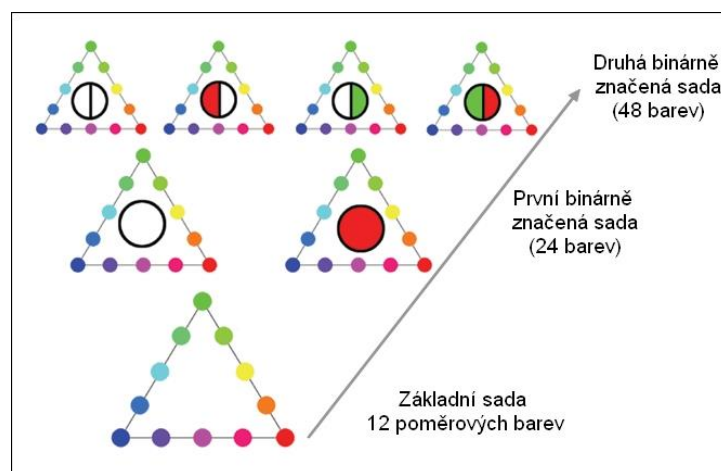
Ačkoliv je rozlišení M-BAND o něco nižší než konvenční pruhovací techniky chromosomů, mají barevné pruhy značný význam pro identifikaci chromosomálních abnormalit, zvláště pak pro komplexní chromosomální přestavby a interchromosomální přestavby (delece, duplikace, inverze, inserce), jelikož tyto abnormality jsou často konvenčním pruhováním obtížně rozeznatelné. Ačkoliv je tato metoda známá již od roku 1999, kdy byla popsána na příkladu chromosomu 5 (Chudoba et al. 1999), nebývá široce využívána a slouží tak spíše jako doplňková metoda klasické analýzy FISH (Su et al. 2015).



**▲ Obr. 7. Mnohobarevné pruhování**  
chromosomu 12 (vpravo) v porovnání s G-pruhováním (vlevo)  
- převzato z Bint et al. 2013

### 3.1.4. COBRA FISH

COBRA FISH (Combined Binary Ratio labeling Fluorescence In Situ Hybridization) je označení pro metodu, která spojuje poměrové a kombinatorické značení s cílem dosáhnout co nejmenšího počtu potřebných fluorochromů a co největšího počtu vzorků analyzovaných současně. COBRA FISH pracuje s několika sety sond. Tyto sety jsou značeny pouhými třemi fluorochromy a dávají tak vzniknout 12 rozdílně barevným sondám. Od druhého setu výše je k sondám přidán čtvrtý fluorochrom, který slouží jako binární značka k rozlišení setů. První set sond binární značení nenesou (Tanke et al. 1999). Pomocí 4 fluorochromů lze tak pomocí COBRA FISH analyzovat všech 46 lidských chromosomů, zatímco při metodách s kombinatorickým značením by bylo zapotřebí fluorochromů 5.



▲ Obr. 8. COBRA FISH: Schematické znázornění značení jednotlivých sad sond

- upraveno dle Szuhai 2006

Samotný proces přípravy vzorků či hybridizace se však o mnoho neliší od analýzy FISH, využívající celogenomové sondy. Tato metoda vyžaduje použití digitálního fluorescenčního mikroskopu (Károly Szuhai and Tanke 2006; Engels et al. 2003)

### 3.1.5. Colour changing karyotyping (CCK)

Metoda je primárně využívána k analýze interchromosomálních aberací a stejně jako předešlé metody, je založena na kombinatorickém značení. V tomto případě za využití pouhých 3 fluorochromů. Nevýhodou této metody je nutnost zachytit snímky metafázích chromosomů dvakrát a z toho vyplývající časová náročnost (Maierhofer et al. 2002).

### 3.2. Další modifikace in situ hybridizace

**Fiber-FISH** je metodou, kde se fluorescenční in situ hybridizace provádí na denaturovaném a mechanicky nataženém vlákně DNA a umožňuje vizualizaci jednotlivých genů nebo jiných malých DNA elementů na chromosomech s vysokým rozlišením cca 1000 bp. Pomocí vlákna DNA jako templátu pro FISH, lze proto zachytit i drobné delece a duplikace s mimořádnou přesností. Použitelná je také k mapování genů jakožto doplňková metoda klasického genomového mapování a to zejména u organismů s relativně malými genomy, například u parazitických prvoků. I když její uplatnění v klinických laboratořích roste, pro složitosti příslušných postupů, se používá hlavně v oblasti výzkumu (Ersfeld 2004; Wang 2002).

**Q-FISH (quantitative FISH)** je metodou vyvinutou k měření délky telomer na základě počtu telomerických repetitiv. Problémy s replikací těchto koncových částí, zapříčiněné neschopností DNA polymerázy, vedou ke ztrátě malého množství telomerické DNA po každém cyklu buněčného dělení. Dochází proto k postupnému zkracování telomer a následné genetické nestabilitě. Z tohoto důvodu může zkracování telomer hrát důležitou roli v nejranější fázi karcinogeneze.

Při Q-FISH se využívají sondy, které se od sond pro klasickou FISH značně liší. Jedná se o PNA sondy (*PNA*s, *peptide nucleic acid*). PNA sonda je uměle syntetizovaný polymer podobný DNA/(RNA) s rozdílným složením kostry. PNA sondy díky své vysoké vazebné specifičnosti, afinitě a citlivosti převyšují DNA sondy a mohou tak tyto dlouhé sondy nahradit. K dalším benefitům patří minimální rušivé signály na pozadí a vysoká stabilita neutrální peptidové kostry sondy, zaručující odolnost vůči degradaci DNázami, RNázami, proteázami i peptidázami (Pellestor and Paulasova 2004). Velikost tkáňových vzorků využitelných pro Q-FISH se pohybuje v průměru 2-5 mikrometrů. Vzorky mohou být jak archivní, tak čerstvé, popř. zmražené. Samotné měření délky telomer je možné provést u všech proliferujících typů buněk, nikoliv tedy u buněk v klidovém stádiu (Aida et al. 2014; Perner et al. 2003).

#### **Variace Q-FISH:**

**Flow-FISH** je spojení Q-FISH a průtokové cytometrie. Nevyžaduje právě se dělící buňky, lze k ní díky tomu použít nejen metafázní, ale i interfázní buňky. Zásadní pozitiva jsou

schopnost měřit délku telomer v jednotlivých buňkách, analýza malých populací těchto buněk. Flow-FISH převyšuje Q-FISH i v celkovém počet zpracovaných vzorků za den, kdy za několik hodin Q-FISH může být zpracováno 15-20 vzorků, zatímco pomocí Flow-FISH lze analyzovat několik stovek vzorků za méně než 1 hodinu (Slijepcevic 2001). Tato metoda dosahuje v současné době nejlepších a nejpřesnějších výsledků měření délky telomer (Baerlocher et al. 2006).

**PNA-FISH** metoda využívá výhod výše zmíněných PNA sond. Primárně se tato metoda používá opět k telomerickému měření, ale byla použita i v několika onkologických studiích a experimentech pro výzkum stárnutí. (Pellestor and Paulasova 2004).

**CO-FISH** (chromosome orientation-FISH) je metodou, kterou je v kombinaci s jednosměrnými sondami, specifickými pro centromerické či telomerické repetice, je možné určit orientaci DNA ( $5' \rightarrow 3'$  /  $3' \rightarrow 5'$ ) (Falconer et al. 2010).

### 3. 3. Interfázní FISH

Výše popsané metody FISH vyžadují ke korektní analýze metafázní chromosomy. V důsledku mnoha faktorů, včetně špatné morfologie, či apoptickým sklonům buněk v kultuře, dosahuje však cytogenetické selhání až 20 % (Kearney and Horsley 2005). Zejména prenatální vzorky, nádorové tkáně či hematologické malignity (vyjma tumorových buněk, postihujících krevní elementy) se nedají běžně převádět na tkáňové kultury a následně na metafázní chromosomy s cílem vytvoření karyotypu. Tento problém lze obejít analýzou FISH prováděnou na interfázních, nedělících se, chromosomech.

I-FISH je metoda, kterou lze provést na izolovaných celých buněčných jádrech, připravených z čerstvých formaldehydem fixovaných či zmražených, ale i archivních parafinových vzorků. Jakákoliv tkáň může být použita jako zdroj buněk. Kromě zmíněných nádorových buněk jsou hojně analyzovány například buňky choriových klků, plodové vody, nebo fetální buňky přítomné v mateřské krvi, jakož i další buněčný materiál získaný post mortem. Analýza čerstvých vzorků nachází své uplatnění v nádorové patologii, kde je I-FISH schopna identifikace jak numerických, strukturálních chromosomálních odchylek, tak i aktuálního buněčného fenotypu a tkáňové morfologie (Tibiletti 2004). Samotný interfázní chromatin je spolehlivým ukazatelem morfologického a fyziologického stavu buňky, jelikož specifické změny chromatinu korelují s procesy, jako je proliferace, diferenciacce či apoptóza (Koutna et al. 2000). Analýza histopatologických parafinových řezů naopak umožňuje mnohé

retrospektivní studie a následné srovnání se zavedenými nádorovými markery (Su et al. 2015).

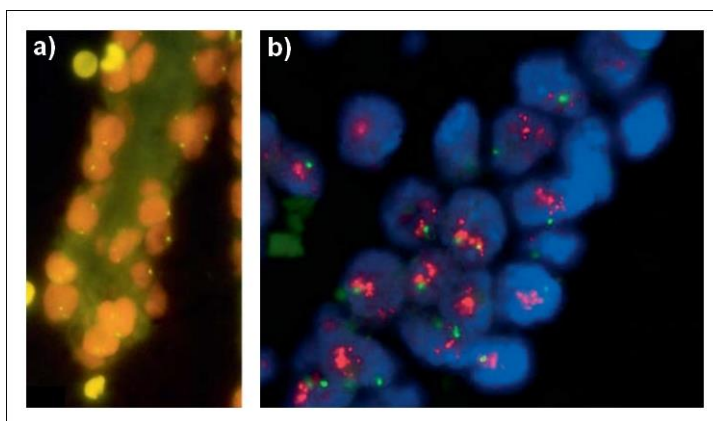
Úspěšnost hybridizace je z velké části závislá na kvalitě vzorků. Vzorky jsou před samotnou hybridizací ošetřeny RNAázou ve snaze zbavit se nativní RNA, která by mohla interferovat se sondou. Stejně tak je nutné odstranění zbytků cytoplazmy z okolí jader a v případě fixovaných vzorků důkladné odmytí parafínu.

Stejně jako u metafázních technik FISH, je i u i-FISH nutno klást důraz na pečlivý výběr typu a velikosti sondy v závislosti na typu zkoumaných cílových jader. Vzhledem k faktu, že kondenzovaného chromatinu v interfázním jádře je v porovnání s metafázním jádrem pouhá desetina, lze použít kratších sond ve srovnání se sondami pro metafázní techniky (Michael R Speicher and Carter 2005). Optimální velikost sondy pro analýzu I-FISH odpovídá délce 300 pb. Pro účely I-FISH lze rozdělit sondy do dvou skupin:

*sondy s jedinečnými sekvencemi a sondy s repetitivními sekvencemi*, které slouží především k označování konkrétních chromosomů a pro rychlé určování pohlaví, nebo aneuploidie. Do této skupiny řadíme centromerické a telomerické typy sond.

Využít lze i dvou, odlišně značených, sond. Pro vyhodnocení experimentu je v tomto případě nutné použít fluorescenční mikroskop, vybavený třemi filtry. Snímání a archivace obrazu pak pomocí CCD kamery (charge-coupled device).

Reprezentativní vzorek by neměl obsahovat více jak 10 % buněk bez fluorescenčního signálu. Analýza takového vzorku může vést k chybnému nadhodnocení monosomií na úkor trisomií (Tibiletti 2004). Při správné hybridizaci je však I-FISH v porovnání množství falešných/rušivých signálů na pozadí s klasickou FISH o mnoho čitelnější metodou (Kearney and Horsley 2005).



▲ Obr. 9. I-FISH

a) využití centromerické FITC-značené sondy pro analýzu vzorku karcinomu vaječníků

b) využití dvou různě barevných sond pro analýzu vzorku karcinomu prsu

- převzato z Tibiletti, 2007

V nádorové cytogenetice je I-FISH využívána zejména pro detekci onkogenů jako jsou *n-myc*, *c-myc*, *Her-2/neu* onkogenu. Ale i v případech detekce dalších nádorových markerů (Michalová and Zemanová 2005). Bylo prokázáno, že u velké části solidních nádorů přítomnost specifické genetické vady úzce souvisí s pozitivní léčebnou odpovědí na biologickou léčbu pomocí monoklonálních protilátek. Analýza stavu genomu onkologických pacientů se z tohoto důvodu stala velmi přínosnou (Tibiletti 2007).

V klinické cytogenetice je I-FISH zvláště užitečná pro rychlou identifikaci chromosomálních aberací, přítomných pouze v malém procentu buněk, které jsou obtížně detekovatelné, popřípadě s malou pravděpodobností záchytu. Konkrétně v prenatální diagnostice je využívána pro detekci numerických i strukturálních chromosomálních anomálií a též pro rychlé potvrzení stupně mozaicismu plodu, kdy jsou buňky odebírány amniocentézou (Chen et al. 2014). Své využití nachází i-FISH i v preimplantační diagnostice, kde se odebírá jen velmi malé množství genetického materiálu (v řádu buněk) a ztráta buněk při případné nezdařené kultivaci má tragický dopad (Wilton 2002).

#### **4. Komparativní genomová hybridizace (CGH)**

Jako první představil světu komparativní genomovou hybridizaci (CGH) jakožto nový nástroj genetické analýzy Kallioniemi v roce 1992. CGH je modifikací výše popsané fluorescenční in situ hybridizace, ale na rozdíl od metafázní FISH nevyžaduje aktivně se dělící buňky a poskytuje přehled numerických změn v celém genomu v jednom hybridizačním kroku. (Kallioniemi et al. 1992)

K experimentu je zapotřebí jen malé množství (0.5–1 µg) izolované DNA ze dvou populací buněk (testované a referenční). DNA každého vzorku je naštěpena, fluorescenčně označena a využita jako sonda. Stejně jako u FISH, je i u CGH stanovení správné délky sondy pro daný experiment klíčové. Fragmenty obou sond musí být stejně dlouhé. Minimální délka fragmentu je 500 bp. Kontrola probíhá elektroforézou.

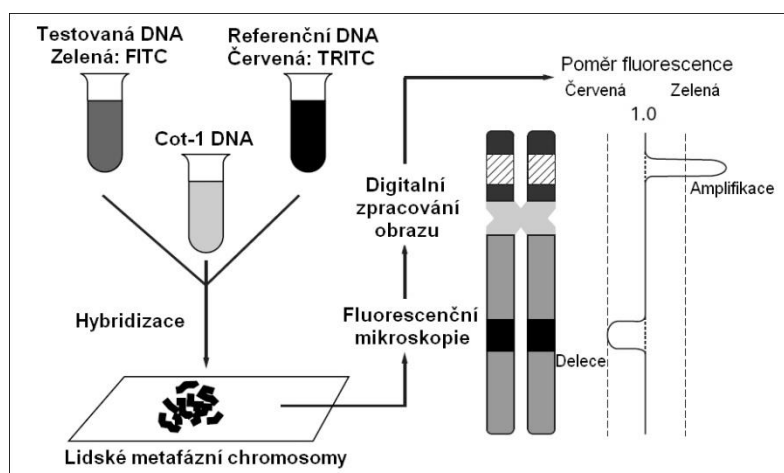
Testovaná DNA je izolovaná přímo z čerstvého či zmrazeného vzorku vyšetřované tkáně, a tak není zapotřebí žádná další kultivace buněk. DNA extrahovaná z čerstvé nebo zmrazené tkáně má obvykle vysokou molekulovou velikost a je tak těžce degradovatelná, což je pro účely CGH ideální. Stejně tak lze ale použít archivní, parafínem nebo formalinem fixované, vzorky (Isola et al. 1994). Tkáň, na kterou CGH primárně cílí, je tkáň nádorovou. (Rickert and Paulus 2004; M R Speicher et al. 1993).

Kritickým bodem metody je požadavek na vysokou čistotu vzorku. Nádorová tkáň, ze které se testovaná DNA odebírá, je však heterogenní tkáň a obsahuje tak mnoho dalších buněčných skupin. Jejich přítomnost však výrazně snižuje citlivost CGH. Uvádí se, že zastoupení patologických buněk ve vzorku nesmí klesnout pod 50 % celkového objemu. Proto je nutné klást důraz na snížení kontaminace nádorového vzorku buňkami zdravé tkáně na minimum například za pomoci mikrodisekcí technik (Cummins et al. 2003; Wang 2002). Referenční sonda, taktéž izolovaná DNA, ale ze zdravého jedince, slouží k porovnání.

Sondy jsou značeny odlišnými fluorochromy. Pro značení sondy testované se nejčastěji využívá barvivo FITC (fluorescein-5-isothiokyanát), který produkuje zelený signál. Červený signál produkuje barvivo TRITC (tetramethylrhodamin-5-isothiokyanát) a je jím barvena sonda referenční (Tachdjian et al. 2000).

Sondy se posléze nechají ko-hybridizovat na podložním sklíčku s metafázními chromosomy, které fungují jako substrát pro analýzu. Tyto chromosomy se připravují dle standardního protokolu, a protože pocházejí ze zdravého jedince, nedisponují žádnou genetickou odchylkou. Vzorek ideální pro CGH by měl obsahovat minimum cytoplasmy, nízkou hustotu buněk. Vzorky s překrývajícími se chromosomy jsou z experimentu vyloučeny. K tomu, aby se předešlo nechtěné vazbě DNA vzorku na repetitivní DNA oblasti (nespecifické hybridizaci), se na podložní sklo přidává navíc Cot-1 DNA (placentární DNA s přidanými DNA repetitivními sekvencemi).

Značené fragmenty DNA „soutěží“ o svá původní místa na metafázích chromosomech a v průběhu hybridizace je obsazují. Po proběhlé hybridizaci je nespecifická sonda odmyta, vzorky odvodněny a obarveny pomocí DAPI (modrý signál).



▲ Obr. 10. Schematické znázornění průběhu komparativní genomové hybridizace

- upraveno dle Weiss et al. 1999

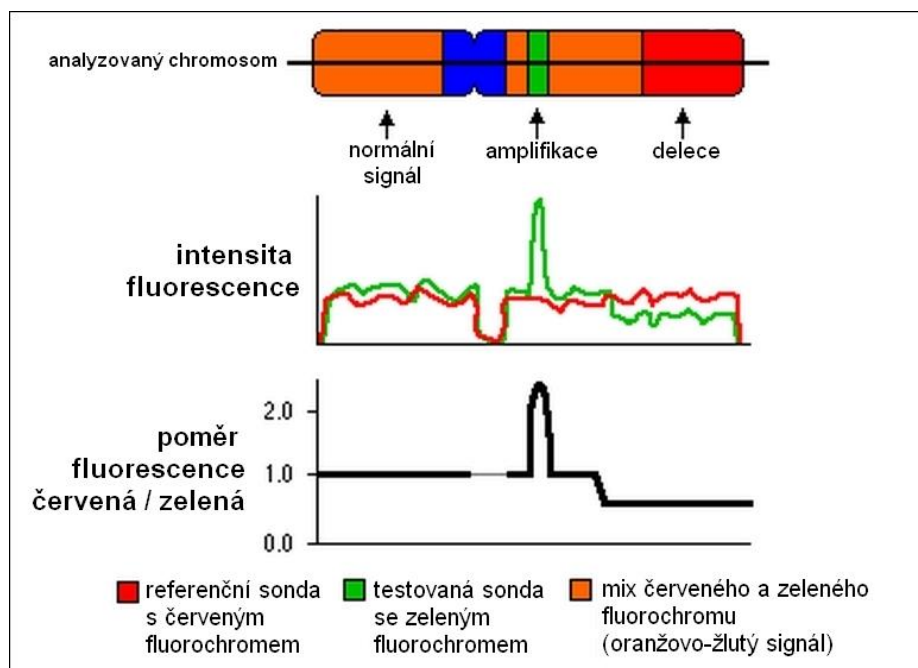
Analýza probíhá pomocí fluorescenčního mikroskopu a k vyhodnocení zmíněného poměru fluorescenčních barviv je využíván počítačový software, který je schopen s vysokou přesností vyhodnotit densitu barvy jednotlivého fluorescenčního signálu. Pro každý chromosom je vygenerován vlastní křivkový graf, který vypovídá o přítomných ztrátách či nadbytku signálu jednoho z fluorochromů.

Při vyhodnocení pracujeme s jedním ze tří následujících nálezů:

**Normální nález** je prezentován rovnoměrným obarvením všech chromosomů fluorescenčními barviv. Poměr fluorescence testované (zelené) i referenční (červené) DNA odpovídá poměru 1:1. Jakákoliv další odchylka poukazuje na výskyt defektní genetické informace či nestandardnost genetické výbavy.

**Amplifikace** (nadbytek) se projevuje jako převládající signál fluorochromu testované sondy, tj. izolované DNA z vyšetřovaného vzorku. (zelená/červená >1)

**Delece** je charakterizována převládajícím signálem sondy referenční. (zelená/červená <1) (Rickert and Paulus 2004; van der Wal et al. 2003).



▲ Obr. 11. Schematické znázornění křivkového grafu pro modelový chromosom

- upraveno dle Weiss et al. 1999

CGH nabízí širokou škálu uplatnění ve vědeckém výzkumu i v klinické praxi – zejména na poli nádorové genetiky. Aplikace CGH ve výzkumu rakoviny zahrnuje jak samotný screening pevných nádorů a hematologických malignit, tak i vyhledávání genů podílejících se na karcinogenezi jednotlivých nádorových onemocněních.

Důkazem přínosnosti této metody v praxi je vysoké množství studií, využívajících CGH k analýze nádorů centrální nervové soustavy, které se vyskytují v dětském a adolescentním věku a tvoří 20 % všech nádorů těchto věkových skupin. Díky velkému množství celosvětově publikovaných studií, bylo možné vytvořit přehled nejčastějších prognostických genetických znaků spojených s jednotlivými typy nádorů CNS. Nejčastěji vyšetřovány byly embryonální nádory, a to ve 30,3 % z celkového počtu studií (Rickert and Paulus 2004). Nejfrekventovanější typ embryonálních nádorů představují neuroblastické nádory, které jsou zároveň vysoce variabilní. Data, získaná pomocí CGH, tak mohou v budoucnu sloužit k další analýze zejména přechodných stadií těchto proměnlivých nádorů (Toraman et al. 2002). CGH se tak jakožto celogenomové metodě mapování podařilo postupem času vytlačit FISH, která byla po dlouhá léta zlatým standartem v mapování genetických abnormalit v onkologii (Mazánek et al. 2008).

Přínos CGH tkví nejen v nahrazení konvenčních metod, nýbrž i ve spolupráci s nimi. Příkladem může být spojení CGH a klasického G-pruhování. Klasickými cytogenetickými metodami jsme schopni zkoumat buňku po buňce, včetně buněk s normálním karyotypem, které se v nádorové tkáni mohou taktéž vyskytovat. Zatímco CGH analýza, jak již bylo zmíněno, je schopna detekovat chromosomální aberace pouze v případě, kdy se vyskytují v podílu buněk větším jak 50 %. Spojením těchto dvou metod lze dojít ke komplexnímu cytogenetickému vyhodnocení studovaných nádorových tkání. A to zejména v případech, kdy se genetické abnormality, které nádory způsobují, vyznačují značnou rozmanitostí a proměnlivostí. Jedná se například o osteosarkomy, postihující zejména pediatrické pacienty (Batanian et al. 2002) nebo karcinomy prsu (Teixeira et al. 2001).

V preimplantační diagnostice je CGH nejúspěšnější metodou pro kompletní karyotypizaci interfázních buněk plodu (Wilton 2002).

Analýzy CGH však není schopna detekce balancovaných přestaveb, jako jsou inverze a reciproké translokace. Rozlišovací schopnost CGH se pohybuje v rozmezí 3-10 Mb. I přes to, že nedetekuje všechny strukturální přestavby, nabízí přehled chromosomálních abnormalit, které jsou přítomny ve většině nádorových buněk. Mnohé nedostatky, které s sebou klasická CGH nese, řeší její modifikace aCGH (Salman, Jhanwar, and Ostrer 2004).

## 4.1. Microarray analýza (aCGH), „technologie genových čipů“

Ve snaze překonat nedostatky klasické CGH došlo k vytvoření velmi nadějně metody mikročipové CGH, často označované jako *molekulární karyotypování* (Vissers et al. 2005). Vývoj takto přesných a citlivých metod k detekci malých chromosomálních abnormalit (<3 Mb) se stal nesmírně důležitým v klinické diagnostice i ve výzkumu v oblasti genetiky člověka.

Princip metody je obdobou konvenční komparativní genomové hybridizace (CGH). Hybridizace stále probíhá za přítomnosti značených sond, avšak místo na celých metafázních chromosomech, probíhá na mikročipech s krátkými fragmenty DNA o velikosti 200 nt. Ty jsou tvořeny podložním sklíčkem (popř. jiným vhodným pevným podkladem) s mřížkou vytvářející mikroskopické kapilární oblasti. Do těchto míst jsou nanášeny krátké fragmenty DNA, představující sondy, a imobilizovány pomocí přímé syntézy sond na čip či technikou *spotování*, kdy je sonda nanášena ve formě roztoku pomocí speciálního přístroje – *spotteru* (Gojová and Kozák 2006).

Sondy, jsou zde stejně jako v ostatních případech, navrženy k reakci s DNA fragmenty zkoumaných vzorků. Velikost sond se liší v závislosti na jejich typu. Využít je možné velké umělé bakteriální chromosomy (BAC; nebo od bakteriofágu P1 odvozený PAC), menší kosmidové vektory nebo nejmenší oligonukleotidy (cDNA) (Shaffer et al. 2007). V první vlně experimentů s aCGH byly široce využívány mikročipy odvozené z umělých bakteriálních chromosomů (BAC) (Shen et al. 2007). BAC klony jsou však poměrně náročné na výrobu a disponují nízkou přesností, tudíž je nutné jednotlivé experimenty opakovat pro ověření validace sond. Rozlišovací schopnost BAC čipů se navíc pohybuje okolo 150kb a chromosomové aberace, které tuto velikost přesahují, tak nemohou být detekovány. V posledních letech jsou nejvíce využívány čipy na bázi oligonukleotidů, které, ve srovnání s BAC čipy, nabízejí zvýšenou citlivost a s tím spojenou schopnost detekce menších oblastí a zároveň lepší čitelnost výsledků. Vzhledem k tomu, že sondy, které se pro mikročipy využívají, jsou několikanásobně menší než pro metafázní chromosomy, je rozlišovací schopnost aCGH proporcionálně vyšší než konvenční CGH. V oblasti detekce nebalancovaných chromosomových přestaveb je tak právem považována za jednu z nejužitečnějších metod analýzy (Bystřická et al. 2010; Hadjidekova et al. 2011).

Na mikročip je posláze stejně jako u konvenční CGH přidán vyšetřovaný vzorek DNA (označen zeleným fluorochromem Cy3), referenční vzorek DNA (označen červeným fluorochromem Cy5), které se před aplikací na mikročip smísí. K zabránění nechtěné

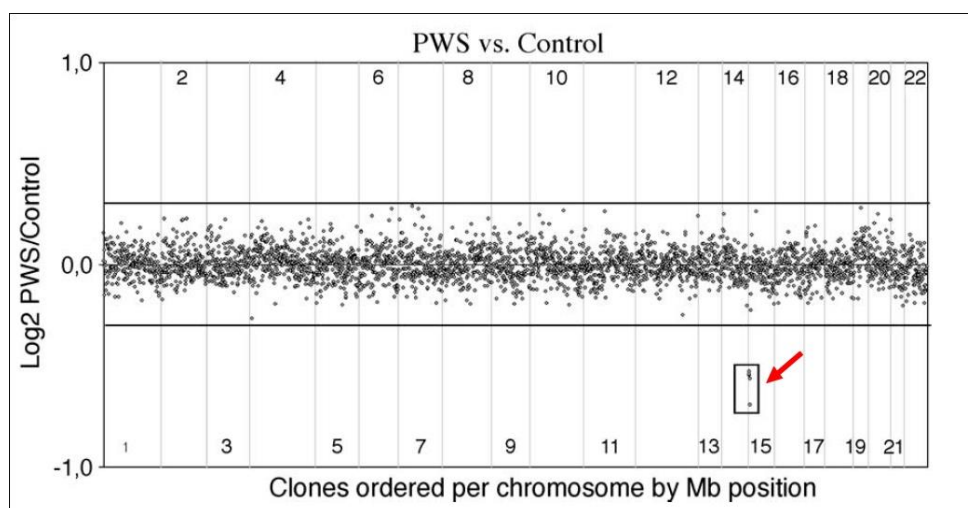
hybridizace repetitivních sekvencí je přidána Cot-1 DNA. Vzorky se nechají hybridizovat se sondou nanesenou na mikročipu. Oblasti na snímku, které se jeví zelené, značí zmnožený chromosomální materiál (duplikace) v daném úseku testovaného vzorku, naopak červený signál značí úbytek chromosomálního materiálu (delece) (Shinawi and Cheung 2008).

Snímání obrazu probíhá pomocí speciálního *microarray* skeneru, kde jsou sklíčka skenována do obrazových souborů. Následně pomocí softwaru je provedena kvantifikace intenzity fluorescence a interpretace výsledků.

Shinawi & Cheung (2008) konstatují, že aCGH svou schopností detekce chromosomálních a strukturálních aberací (delece, duplikace, translokace, inverze a marker chromosomů), které jsou primární příčinou vrozených anomálií, dymorfismů, globální vývojové zpoždění (GDD), autismu a různých syndromů, se stala spolehlivým pomocníkem prenatální diagnostiky.

Mezi další aplikace aCGH patří objasnění genetického profilu pacientů s malformacemi či mentální retardací. Tato onemocnění jsou zpravidla způsobena mikrodelecemi a mikroduplikacemi, které není konvenční cytogenetická analýza schopna odhalit (Thuresson et al. 2007).

Uplatnění nachází také v onkologických studiích. Detekce chromosomálních abnormalit spojených s tvorbou nádorových buněk přispívá k lepšímu stanovení prognózy nebo reakci na terapii. To potvrzují například rozsáhlé studie všech typů lidské leukémie (Van Der Veken and Buijs 2011; Lundin et al. 2007).



▲ Obr. 12. Výsledek analýzy array-CGH DNA pacienta s PWS

Horní část grafu slouží jako část kontrolní, dolní část grafu patří analyzované DNA. Dva vodorovné pruhy ohraničují oblast normální variace signálu, v dolní části grafu lze jasně pozorovat signál mimo tuto oblast, poukazující na delecí chromosomu 15 (označeno šipkou) - převzato z Smeets 2004

## 5. Metody založené na amplifikaci nukleových kyselin

### 5.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Vývoj polymerázové řetězové reakce (PCR) se stal jednou z inovací, které změnilý vývoj molekulárních věd a nespočet dílčích disciplín biologie. Citlivost metody je tak vysoká, že lze pomocí PCR detekovat jednotlivé molekuly DNA. Princip metody spočívá na využití termostabilních polymeráz k namnožení vlákna DNA. Množství namnožené DNA se hromadí vzrůstající geometrickou řadou, a tak je z hlediska celkového výtěžku velmi výhodnou metodou (Sochivko et al. 2016).

První, kdo tuto metodu publikoval a patentoval, byl Kary B. Mullis (Mullis 1990), který byl za svůj objev oceněn Nobelovou cenou. Klíčovým faktorem, který vedl k automatizaci a výraznému zdokonalení PCR, byla izolace termostabilní DNA polymerázy z bakterie *Thermus aquaticus* – *Taq* polymerázy. *Taq* polymeráza a dnes již známé ostatní termostabilní DNA polymerázy, nahradily dříve používanou polymerázu původem z bakterie *Escherichia coli*.

*Taq* polymeráza, kromě své termostability, disponuje stejnými vlastnostmi jako ostatní DNA polymerázy a to včetně schopnosti oprav a replikace DNA (Eom, Wang, and Steitz 1996; Lee et al. 2010). Je tak schopna syntetizovat komplementární vlákno dle templátové jednovláknové DNA a to ve směru 5'→3', čím dochází k extenzi vlákna. Polymeráza sama o sobě však není schopna syntézy vlákna DNA de novo, nýbrž pouze od existujícího 3' konce, proto je nutné použít *primer* (krátký oligonukleotid), který udává polymeráze místo, kde má syntéza započít. Sekvence primerů jsou komplementární k jednomu z řetězců DNA a ohraničují se jimi úseky DNA, které mají být zmnoženy (amplifikovány). K zajištění hromadění produktu je využíváno dvou primerů (páru primerů). Každý z páru primerů nasedá ve vzájemně protisměrné orientaci na své komplementární místo na jednom ze dvou templátových vláken. Kódující primer začíná na 5' konci vlákna a antikódující primer na 3' konci vlákna.

Hlavními komponenty PCR reakce tedy jsou: termostabilní DNA polymeráza, templátová DNA (obsahující sekvenci DNA, kterou chceme amplifikovat), primery, reakční pufr, které pomáhá stabilizovat DNA a další složky reakce.

Reakce probíhá v tříkrokových cyklech:

**Denaturace → Nasednutí primerů (annealing) → Extenze a syntéza**

**Počáteční denaturace** DNA probíhá po dobu až 1 minuty při 94-98°C v závislosti na teplotním optimu zvolené DNA polymerázy. Doba trvání dalších denaturací, probíhajících na začátku každého z cyklů, se zkracuje na 10-60 vteřin. Dochází k rozpadu dvouvláknové DNA (dsDNA) na dvě jednovláknové templátové DNA (ssDNA).

**Nasednutí primerů** na komplementární sekvence templátových vláken je umožněno znatelným snížením teploty.

**Extenze** probíhá za teploty 72°C, která odpovídá teplotnímu optimu DNA polymerázy. DNA polymeráza prodlužuje primery, přidání nukleotidů za použití cílové DNA jako templátu. Změny teplot jednotlivých částí cyklu jsou řízeny pomocí tenkostěnných mikrokumavek v *termocykleru*.

Návrh a optimalizace jednotlivých složek reakce je pro celý experiment zásadní, proto je zapotřebí věnovat těmto úkonům dostatečnou pozornost. Jednou z nejdůležitějších fází je návrh a optimalizace primerů. V dnešní době existuje mnoho počítačových programů, jejichž účelem je pomoc při navrhování párů primerů (například NCBI Primer design tool; Primer3). Základní kritéria pro výběr primerů:

- velikost v rozmezí 15-30 párů basí
- poměr G-C párů 40-60 %
- mít stejnou teplotu tání ( $T_m$ ) v rozmezí mezi 52-58°C; popř.  $T_m$  lišící se maximálně o 5°C
- nasednout na své přesně komplementární sekvence a to za stejné teploty
- netvořit sekundární formace (například vlásenkové smyčky), dimery a obsahovat sekvence navzájem komplementární či koncové palindromické sekvence

Optimalizace teploty, při níž dochází k nasednutí primerů, je jedním z dalších klíčových faktorů reakce. Ideální teplota tohoto kroku je obecně o 1-5°C nižší než nejnižší teplota tání ( $T_m$ ) jednoho z párů primerů. Při nízké teplotě dochází k nespecifické amplifikaci produktu. Naopak vysoká teplota vede k nízkému výtěžku reakce.

Templátová DNA může pocházet jak z čerstvých, tak fixovaných či archivních vzorků. Malé množství či nízká kvalita templátové DNA není pro PCR zásadním problémem.

S kriticky malým množstvím templátové DNA lze bojovat snížením teploty při nasednutí primerů. Velmi nízké kvality vzorků lze přizpůsobit optimalizací primerů – amplifikací kratších sekvencí (Lorenz 2012).

Složení a optimalizace reakční směsi může také zvýšit výtěžek a specifičnost PCR. Základní složkou směsi jsou deoxynukleosidtrifosfáty (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), které jsou termostabilní a slouží jako pomyslné stavení kameny pro práci DNA polymerázy. Dále je přidávána pufovací složka. Hodnota pH a teplota pufru závisí na zvolené DNA polymeráze. Například optimální hodnota pH pro správnou funkci Taq polymerázy činí 7,4 (Eom, Wang, and Steitz 1996); optimum Tpa polymerázy až 8,4 (Lee et al. 2010). DNA polymerázy vyžadují mimo jiné i přítomnost hořečnatých iontů ( $Mg^{2+}$ ), které fungují jako kofaktor po celou dobu reakce. Změna koncentrace hořečnatých iontů je zároveň jedním z nejjednodušších činidel pro manipulaci s cílem zvýšení výtěžku amplifikovaných produktů (Lorenz 2012).

Pro stabilizaci a ulehčení reakce je přidáváno dalších solí (například KCl, NaCl). Pro prevenci tvorby dimerů primerů a zvýšení výtěžku produktů lze přidat koagulační proteiny například hovězí trombin či albumin (Zhang et al. 2014).

Když je PCR dokončena, jsou produkty reakce analyzovány gelovou elektroforézou často následovanou Southernovo blottingem a hybridizací (Baumforth et al. 1999).

Hlavní výhodou PCR je zejména její vysoká citlivost. Ta je však zároveň spojena s náchylností ke kontaminaci neboli k falešně pozitivním signálům. Ke kontaminaci dochází i extrémně malým externím materiálem například při míchání reakčních činidel, popřípadě zbytkovým materiálem z předchozího experimentu. Je proto žádoucí dodržovat opatření jako jsou oddělené místnosti pro přípravu a samotnou analýzu. Samozřejmostí je sterilizace nástrojů. Dalším opatřením je použití negativních či pozitivních kontrol. Pozitivní kontroly jsou založeny na amplifikaci vzorku, který jistě obsahuje cílovou DNA. Pro účely negativní kontroly dochází k vynechání jedné ze složek reakce (DNA polymerázy, primeru, nebo dokonce samotného templátu) (Banasik, Stanisławska-Sachadyn, and Sachadyn 2016).

Aplikace klasické PCR a jejich modifikací lze užít v mnoha různých oblastech prenatální diagnostiky (Langlois and Duncan 2011), onkologie (Raj, Moreno, and Gomella 1998), mikrobiologie (Lee et al. 2010) či forezních věd (Zubakov et al. 2010).

### 5.1.1. Modifikace PCR

Většina modifikací PCR se od výše popsaného protokolu standardní PCR o mnoho neliší. I malou změnou lze však dosáhnout konkrétního cíle.

**Multiplex PCR** reakcí lze na rozdíl od klasické PCR dosáhnout amplifikace dvou nebo více cílových sekvencí. To je umožněno přidáním více než jednoho páru primerů do reakční směsi. Metoda byla od svého zavedení v roce 1988 úspěšně použita v mnoha oblastech testování DNA a to včetně analýzy delecí, mutací a analýzy polymorfismů (Markoulatos, Siafakas, and Moncany 2002). Multiplex PCR lze také použít detekci změn koncentrace jednotlivých molekul mRNA. Hovoříme tak o semi-kvantitativní detekci (Baumforth et al. 1999).

**PCR spojená s reverzní transkripcí (RT-PCR)** představuje metodu při které je reakce reverzní transkriptázy následována amplifikací formou PCR. Jedná se o jednu z nejsensitivnějších a nejuniverzálnějších metodou vyvinutou pro analýzu genové exprese v buňkách a tkáních. Průběh analýzy spočívá v iniciální konverzi RNA na komplementární DNA (cDNA) pomocí reverzní transkriptázy, nejčastěji izolované z virů (například ptačí myeloblastový virus, AMV). Výsledná jednořetězcová cDNA je posléze pomocí Taq-polymerázy při standardní PCR amplifikována na dvouřetězcovou cDNA, která se pak amplifikuje dále při dalších cyklech. Existuje mnoho strategií pro získání iniciální jednořetězcové cDNA: za pomoci reakce s reverzní transkriptázou, použití náhodného hexameru jako antisense PCR primeru, nebo připojení oligo d(T) primerů na poly(A) konec mRNA. Dnes jsou již k dispozici sety, které umožňují provádět reakci reverzní transkriptázy a následnou PCR ve stejném pufru, což výrazně snižuje riziko kontaminace. Využití nachází zejména zejména v onkologii pro detekci mRNA kódující nádorové antigeny (Yamaguchi et al. 2000).

Analýza sekvencí nukleových kyselin má důležitou roli v mnoha oblastech biologického výzkumu. K tomuto účelů slouží **kvantitativní RT-PCR**, která a je v mnoha případech jedinou metodou *of vivo* schopnou přesné kvantifikace mRNA (Huggett et al. 2005; Heid et al. 1996). Zmínit v tomto případě lze experiment zaměřený na kvantifikaci specifické antigenní mRNA prostaty onkologických pacientů (Gelmini et al. 2001).

Výsledky klasické analýzy PCR mají kvalitativní charakter. Množství amplifikovaného produktu na konci reakce lze obecně určit dle intenzity pruhu získaného elektroforézou, ale přesnou hodnotu je možné určit pouze pomocí **kvantitativní PCR (qPCR)**.

Tato metoda umožňuje kvantifikaci množství cílové sekvence v celém vzorku. Velkého úspěchu se pomocí qPCR podařilo dosáhnout například v detekci lidského genu HER2-neu, který je amplifikován ve 30 % případů karcinomu prsu. Experiment tak dokázal spojitost amplifikace genu s několika parametry tohoto onemocnění včetně lepší prognózy (Slamon et al. 1987).

Jedná se taktéž o velmi spolehlivou metoda pro detekci trizomií, která nahrazuje konvenční cytogenetickou analýzu zejména v případech, kdy je vyšetření prováděno z důvodů zvýšeného rizika vzniku aneuploidií chromosomů 13, 18, 21 a pohlavních chromosomů (Langlois and Duncan 2011).

**Alelově specifická PCR (AS-PCR)** je využívána pro detekci předem známé alely, či mutace. Pokud templátová DNA hledanou sekvenci obsahuje, na konci PCR reakce vzniká namnožený produkt. AS-PCR se proto používá pro testování trombofilních mutací jako jsou Leidenské mutace a mutace G20210A (Hertzberg 2005). Nově také pro retrospektivní studie mutace IDH1 genu, který je řazen k novým nejslibnějším diagnostickým a prediktivním biomarkerům gliových nádorů (Loussouarn et al. 2012).

**Nested PCR (nPCR)** je určena k minimalizaci nespecifických vazeb produktu na primer v průběhu amplifikace. K využití metody se přistupuje zejména v případech, kdy zkoumaná DNA obsahuje velké množství paralogních genů. Pro potřeby nPCR je nutné použít dvě sady primerů

## **5.2. MAPH (Multilocus amplifiable probe hybridization)**

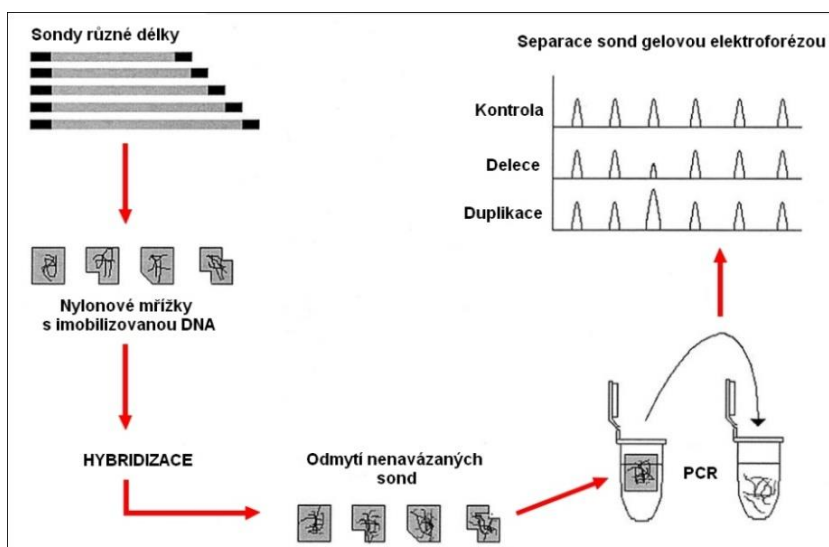
MAPH je metoda odvozená od PCR, a tak zahrnuje přísnou přípravu a optimalizaci sond i dalších složek reakce (Patsalis et al. 2005). Sondy mohou být cíleny velmi specificky na jakoukoliv oblast chromosomu, celý chromosom a dokonce i celý lidský genom. Velikost sond pro MAPH se pohybuje v rozmezí 140-600 nt a poskytuje tak extrémně vysoké rozlišení a je schopna detekovat i velmi malé delece či duplikace. Délka jednotlivých sond musí být rozdílná, jelikož slouží k rozdělení sond při závěrečné elektroforéze.

Hybridizace probíhá na nylonových mřížkách, kde je denaturovaná templátová DNA imobilizována (Sellner and Taylor 2004; J. a Armour et al. 2000). Celkové množství templátové DNA potřebné k analýze (0,5-1 µg) je srovnatelné s množstvím potřebným například pro komparativní genomovou hybridizaci, se kterou je MAPH často porovnávána (Rooms, Reyniers, and Kooy 2005). Při hybridizaci se naváží pouze sondy komplementární se sekvencemi imobilizované DNA. Ostatní, nenavázané, sondy jsou po proběhlé hybridizaci

důkladně odmyty a na vzorku tak zůstávají sondy specificky navázané. Nedostatečně omytí nespecificky vázaných sond vede často ke kontaminaci reakce, proto tomuto kroku potřeba věnovat dostatečnou pozornost (Sellner and Taylor 2004). Navázané jsou amplifikovány pomocí PCR a kvantifikovány gelovou elektroforézou. Všechny sondy jsou ohraničeny stejnou sekvencí, a tak lze pro jejich amplifikaci použít PCR pouze s jedním párem primerů (Sellner and Taylor 2004). Tato amplifikační schopnost sond je pro MAPH klíčová. Množství jednotlivých amplifikovaných sond jsou přímo úměrné počtu kopií sekvencí analyzované DNA a slouží tak ke konečnému vyhodnocení experimentu (J. A. L. Armour et al. 2002).

Limitujícím prvkem MAPH může v některých případech být skutečnost, že závěrečná detekce gelovou elektroforézou je schopna vyhodnotit v průměru pouhých 40 vzorků. Tento problém řeší nahrazení gelové elektroforézy technologií mikročipů. Obnovené a amplifikované specifické sondy jsou znovu hybridizovány na mikročipu s komplementárními sekvencemi, naskenovány microarray skenerem a vyhodnoceny počítačovým softwarem. ArrayMAPH je tak kombinací vysoké citlivosti a specifity a možnosti analýzy velkého množství sekvencí DNA. Nabízí se tak potencionální alternativa k analýze arrayCGH (Patsalis et al. 2005).

Klasická technika MAPH není náročná na přípravu ani provedení a komplikace v průběhu reakce nejsou časté. Úspěch zaznamenává MAPH zejména ve screeningu subtelomerických oblastí chromosomů. Tyto oblasti jsou obecně vysoce polymorfní a s nejvyšší hustotou genů. Chromosomální přestavby těchto oblastí často stojí za vznikem poruch učení, hematologických malignit či opakovaných potratů. Analýza MAPH těchto oblastí značně převyšuje analýzu FISH zejména ve schopnosti analýzy výrazně většího počtu vzorků najednou, ale i v citlivosti a přehlednosti metody (Hollox et al. 2002; Pickard et al. 2004).



▲ Obr. 13. Schematické znázornění analýzy MAPH

- upraveno dle Sellner & Taylor 2004

### 5. 3. MLPA (Multiplex ligase-dependent probe amplification)

MLPA spočívá v použití dvou oligonukleotidových sond pro každou jednotlivou sekvenci. Každá ze sond se skládá ze dvou částí. První sonda je složena ze specifické cílové sekvence o délce 20-30 nukleotidů a univerzální sekvence primeru. Druhá sonda je složena z delší specifické cílové sekvence (25-43 nukleotidů) a univerzální sekvence primeru na straně druhé. Mezi dvě části druhé sondy je navíc vložen náhodný fragment o variabilní délce, který slouží k rozlišení jednotlivých sond. Dlouhé sondy jsou od M13 bakteriofágu derivované oligonukleotidy. Krátké sondy jsou syntetické. Stejně jako u MAPH, má každá z použitých sond rozdílnou délku, aby mohly být vzájemně rozlišitelné při závěrečné kapilární elektroforéze (Schouten et al. 2002).

Sondy jsou posléze hybridizovány s cílovou (předem denaturovanou) DNA a zároveň je přidán pufovací roztok s obsahem ligázy. Pokud naleznе sonda v analyzované DNA komplementární sekvenci, dochází k ligační reakci. Díky zmíněnému rozdělení sond jsou ligovány pouze ty sondy, které hybridizují s cílovými sekvencemi vyšetřované DNA a tak pouze tyto sondy mohou být amplifikovány metodou PCR (Rooms, Reyniers, and Kooy 2005). Před spuštěním PCR je nutné tepelně inaktivovat přidanou ligázu. Samozřejmostí je také přidání PCR primerů. Pro lepší orientaci je počátek jednoho z primerů fluorescenčně značen.

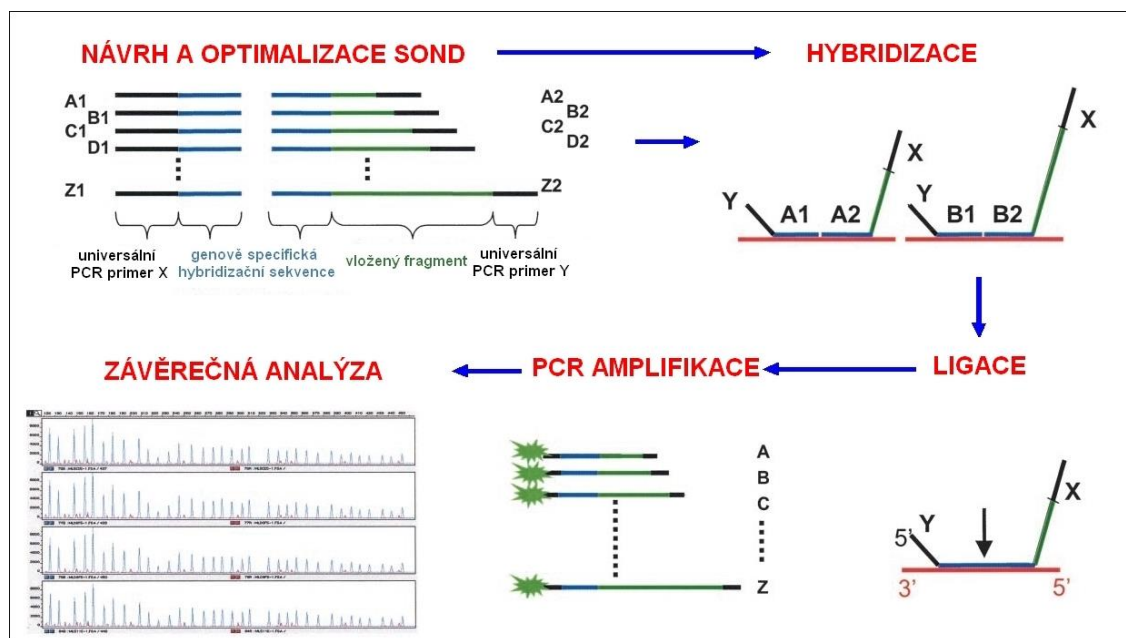
Množství amplifikovaného produktu je přímo úměrné množství detekované cílové DNA ve vzorku, lze proto provést snadnou kvantifikaci vzorku kapilární elektroforézou (Sellner and Taylor 2004).

I přes to, že je MLPA metodou velmi mladou (poprvé představenou v roce 2002), je již běžně využívána jak ve výzkumných projektech, tak i klinické praxi. Pro valnou většinu častých lidských onemocnění jsou v dnešní době komerčně dostupné kity, které zásadním způsobem celou metodu zjednodušují. Nejčastěji slouží k detekci genetických nádorových markerů například BRCA1 a BRCA2 (Hogervorst et al. 2003; Bunyan et al. 2004) či onkogenů jako je N-myc (Vícha and Eckschlager 2008).

Často je MLPA využívána také jako screeningový nástroj prenatální diagnostiky (Gouas et al. 2015) či různých poruch jako jsou mentální retardace (Mandal et al. 2009).

Za zmínku taktéž stojí uplatnění MLPA v detekci delecí dystrofinového genu, které zapříčiňují vznik svalových dystrofií nebo dilatační kardiomyopatie (Janssen et al. 2005).

Návrh a optimalizace sond je proces často velmi zdlouhavý a náročný, v dnešní době lze však využít dostupných softwarů či webových serverů, které jsou schopny pomocí různých algoritmů navrhnout sondu v rapidním čase a s vysokou přesností (Pantano et al. 2008).



▲ Obr. 14. Schematické znázornění analýzy MLPA  
- upraveno dle Hogervorst et al. 2003

## 6. Závěr

Vývoj cytogenetických technik zásadně ovlivnil historii molekulárních věd a humánní medicíny, kde zavedení každé nové metody vedlo k detekci stále většího počtu větších či menších chromosomálních abnormalit, spojených s různými onemocněními. Ačkoliv cytogenetika zaznamenává neustálé zdokonalování především na molekulární úrovni, své pevné místo mají i metody klasické. Moderní přístupy pak stírají rozdíly mezi konvenční a moderní cytogenetikou. Klasické metody stále zůstávají zlatým standardem a nové molekulární metody je mnohdy nahradit ani nemohou. Ačkoliv máme k dispozici velmi citlivé metody detekce, samostatně jsou využívány jen zřídka. Ve většině klinických aplikací cytogenetických metod dochází ke vzájemnému prolínání a kombinaci nových a starých přístupů cytogenetické analýzy. Klíčovými prvky jsou tak výběr správné strategie a kombinace různých technik. Konvenční metody jako je například pruhování chromosomů většinou jen naznačí oblast, na kterou má být aplikována další metoda. Právě tyto kombinace umožňují obsáhlou analýzu i komplexních chromosomových přestaveb. Další vývoj dnes známých technologií se bude pravděpodobně odehrávat na poli automatizace jednotlivých procesů. Naopak vývoj zcela nových technologií bude pravděpodobně záviset na lepším poznání struktur a funkcí jednotlivých chromosomů.

Základní charakteristiky a možnosti využití cytogenetických metod popsanych v této práci jsou shrnuty v Tabulce 1.

### Tabulka 1. Porovnání cytogenetických metod

(Lichtenbelt et al. 2011; Salman et al. 2004; Speicher & Carter 2005; Schouten et al. 2002; Su et al. 2015; Pang et al. 2015; Talkowski et al. 2011)

Metoda	Rozlišení	Komplexita analýzy	Pokrytí genomu	Numerické odchylky	Strukturní aberace			Analýza interfázních jader	Konkrétní využití
		Samostatná/doplňková		Polyploidie/aneuploidie	Nebalancované delece/duplikace	Balancované inverze/translokace	Marker chromosomy		
Pruhovací techniky	5-8Mb	S/D	kompletní	●/●	●	●	● <sup>1</sup>	NE	základní cytogenetická analýza
FISH konvenční	>0,5 kbp	D	specifické sondy	●/●	●	●	●	ANO <sup>2</sup>	široké spektrum využití
M-FISH/SKY COBRA FISH	2-3 Mb	D	kompletní	●/● ●	● <sup>3</sup> /● ●	●	●/● ●	NE	onkocytogenetika, analýzy složitých translokací
fiber-FISH	>1000 bp	D	?	●	●	●	●	NE	vizualizace genů a drobných elementů
M-BAND	5-10Mb	D	kompletní	●	●	●	●	NE	komplexní chromosomální přestavby
I-FISH	?	S/D	specifické sondy	●/●	●	●	●	ANO	onkocytogenetika, drobné aberace
CGH konvenční	3-10 Mb	S	kompletní	●	●	○	●	ANO	onkocytogenetika
Array CGH	1kb-1Mb <sup>4</sup>	S/?	kompletní	○/●	●	○	●	ANO	onkocytogenetika, mikrolece
PCR	10kpb-100pb	S/D	kompletní	●	●	● <sup>5</sup>	●	ANO	široké spektrum využití
MAPH	>100 pb	S/D	kompletní	●	●	○	●	ANO	široké spektrum využití
MLPA	>100 pb (1pb)	S/D	kompletní	●	●	○	●	ANO	široké spektrum využití

● schopnost detekce    ○ neschopnost detekce    ? není známo, nelze určit, nepoužívá se

<sup>1</sup> velmi limitně; <sup>2</sup> centromerické a lokus specifické sondy; <sup>3</sup> ne inzerce; <sup>4</sup> v závislosti na typu mikročipu (BAC/oligonukleotid); <sup>5</sup> pouze long-range PCR

## Seznam použitých zkratek:

ALL	acute lymphoblastic leukemia	akutní lymfoblastická leukemie
AML	acute myeloid leukemia	akutní myeloidní leukemie
AS-PCR	allele-specific PCR	alelově specifická PCR
BAC	bacterial artificial chromosome	umělé bakteriální chromosomy
BRCA1/2	breast cancer 1/2	karcinom prsu typ 1/2
CCD	charge-coupled device	zařízení s vázanými náboji
cDNA	complementary DNA	komplementární DNA
CGH	comparative genomic hybridisation	komparativní genomová hybridizace
COBRA FISH	combined binary ratio labeling FISH	
CO-FISH	chromosome orientation FISH	
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	2-(4-amidinofenyl)-1H-indol-6-carboxamidin
dATP	deoxyadenosine triphosphate	deoxyadenosintrifosfát
dCTP	deoxycytidine triphosphate	deoxycytidintrifosfát
dTTP	deoxythymidine triphosphate	deoxycytidinmonofosfát
dGTP	deoxyguanosine triphosphate	deoxyguanosintrifosfát
DOP PCR	degenerate oligonucleotide-primed PCR	
FISH	fluorescent in situ hybridisation	fluorescenční in situ hybridizace
FITC	fluorescein isothiocyanate	fluorescein-5-isothiokyanát
MYH11	myosin heavy chain 11	
Her-2/neu	human epidermal growth factor receptor 2	
I-FISH	interphase FISH	interfázní FISH
qRT-PCR	quantitative reverse transcription PCR	
MAPH	multilocus amplifiable probe hybridization	
MCB/mBAND	multicolor banding	mnohobarevné pruhování
M-FISH	multiplex FISH	vícebarevná FISH
MLPA	multiplex ligase-dependent probe amplification	
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PDG	preimplantation genetic diagnosis	preimplantační genetické vyšetření
PHA	phytohaemagglutinin	fytohemaglutinin
PNA	peptide nucleic acid	peptidová nukleová kyselina
PWS	Prader-Willis syndrome	Prader-Williho syndrom
Q-FISH	quantitative FISH	kvantitativní FISH
qPCR	quantitative PCR	kvantitativní PCR
RT-PCR	reverse transcription PCR	
SKY	spectral karyotyping	
SMS	Smith-Magenis syndrome	Smith-Magenisův syndrom
TRITC	tetramethylrhodamine	tetramethylrhodamin-5-isothiokyanát
VKF syndrom	velo kardio facial syndrome	
YAC	yeast artificial chromosome	umělé kvasinkové chromosomy

## Seznam citované literatury:

- Aida J, Izumiyama-Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, M Terai M, Matsuda Y, Aida S, T Arai, and K Takubo. 2014.** "Determination of Telomere Length by the Quantitative Fluorescence in Situ Hybridization (Q-FISH) Method." *American Journal of Analytical Chemistry* 05 (12): 775–83.
- Anders JM, Moores EC, Emanuel R. 1966.** "Chromosome Preparation from Leucocyte Culture: A Simplified Method for Collecting Samples by Post." *Journal of Medical Genetics* 3 (74): 74–75.
- Argüello-Miranda O, Sáenz-Arce G. 2008.** "Interchromatid Central Ridge and Transversal Symmetry in Early Metaphasic Human Chromosome One." *Journal of Molecular Recognition* 21 (3): 184–89.
- Armour J, Sismani C, Patsalis PC, Cross G. 2000.** "Measurement of Locus Copy Number by Hybridisation with Amplifiable Probes." *Nucleic Acids Research* 28 (2): 605–9.
- Armour J, Barton DE, Cockburn DJ, Taylor GR. 2002.** "The Detection of Large Deletions or Duplications in Genomic DNA." *Human Mutation* 20 (5): 325–37.
- Baerlocher GM, Vulto I, de Jong G, Lansdorp PM. 2006.** "Flow Cytometry and FISH to Measure the Average Length of Telomeres (Flow FISH)." *Nature Protocols* 1 (5): 2365–76.
- Baj A, Bettaccini AA, Casalone R, Sala A, Cherubino P, Toniolo AQ. 2005.** "Culture of Skeletal Myoblasts from Human Donors Aged over 40 Years: Dynamics of Cell Growth and Expression of Differentiation Markers." *Journal of Translational Medicine* 3 (1): 21.
- Banasik M, Stanislawski-Sachadyn A, and Sachadyn P. 2016.** "A Simple Modification of PCR Thermal Profile Applied to Evade Persisting Contamination." *Journal of Applied Genetics*.
- Barcia JJ. 2007.** "The Giemsa Stain: Its History and Applications." *International Journal of Surgical Pathology* 15 (3): 292–96.
- Batanian JR, Cavalli LR, Aldosari NM, Ma E, Sotelo-Avila C, Ramos MB, Rone JD, Thorpe CM, Haddad BR. 2002.** "Evaluation of Paediatric Osteosarcomas by Classic Cytogenetic and CGH Analyses." *Molecular Pathology: MP* 55 (6): 389–93.
- Baumforth KR, Nelson PN, Digby JE, Murray PG, O'Neil JD. 1999.** "The Polymerase Chain Reaction." *Advances in Physiology Education* 52: 1–10.
- Bickmore W. 2001.** "Karyotype Analysis and Chromosome Banding." *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–7.
- Bint SM, Davies AF, Ogilvie CM. 2013.** "Multicolor Banding Remains an Important Adjunct to Array CGH and Conventional Karyotyping." *Molecular Cytogenetics* 6: 1–9.
- Blakeslee AF, Avery AG. 1937.** "Methods of Inducing Doubling of Chromosomes in Plants." *Journal of Heredity* 28 (398-411).
- Bunyan DJ, Eccles DM, Sillibourne J, Wilkins E, Thomas NS, Shea-Simonds J, Duncan PJ. 2004.** "Dosage Analysis of Cancer Predisposition Genes by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification." *British Journal of Cancer* 91: 1155–59.
- Bystřická D, Zemanová Z, Březinová J, Gančarčíková M, Grosová L, Šárová I, Izáková S, Berková A, and Michalová K. 2010.** "The Assessment of Array Comparative Genomic Hybridization in Complex Karyotype Analyses." *Folia Biologica* 56 (5): 223–30.
- Cummins RJ, O'Grady A, Sabah M, Kay E, Leader M. 2003.** "Comparative Genomic Hybridization: Emphasis on Use of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue." *Current Diagnostic Pathology* 9: 173–78.
- Dvořáčková J, Žmolíková J, Mužík J, Uvířová M. 2013.** "Využití Fluorescenční in Situ Hybridizace v Diagnostice Melanocytárních Lézí." *Onkologie* 7 (2): 74–77.
- Engels H, Ehrbrecht A, Zahn S, Bosse K, Vrolijk H, White S, Kalscheuer V. 2003.** "Comprehensive Analysis of Human Subtelomeres with Combined Binary Ratio Labelling Fluorescence in Situ Hybridisation." *Eur J Hum Genet* 11 (9): 643–51.
- Eom SH, Wang J, Steitz TA. 1996.** "Structure of Taq Polymerase with DNA at the Polymerase Active Site." *Nature* 382 (6588): 278–81.
- Ersfeld K. 2004.** "Fiber-FISH: Fluorescence in Situ Hybridization on Stretched DNA." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 270: 395–402.
- Falconer E, Chavez EA, Henderson A, Poon S, McKinney S, Brown L, Huntsman DG, Lansdorp PM. 2010.** "Identification of Sister Chromatids by DNA Template Strand Sequences Ester." *Nature* 463 (7277): 93–97.
- Fauth C, Speicher MR. 2001.** "Classifying by Colors: FISH-Based Genome Analysis." *Cytogenetics and Cell Genetics* 10 (93): 1–10.
- Ford CE, Polani PE, Briggs JH, Bishop PM. 1959.** "A Presumptive Human XXY/XX Mosaic." *Nature* 183 (4667): 1030–32 ST – A presumptive human XXY/XX mosaic.
- Ford, CE, Hamerton JL. 1956.** "The Chromosomes of Man." *Nature* 177: 1020–23.
- Gelmini S, Tricarico C, Vona G, Livi L, Melina AD, Serni S, Cellai E. 2001.** "Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for the Measurement of Prostate-Specific Antigen mRNA in the Peripheral Blood of Patients with Prostate Carcinoma Using the Taqman Detection System." *Clin. Chem. Lab Med.* 39 (1434-6621 SB - IM): 385–91.
- Gojová L, Kozák L. 2006.** "Možnosti Využití DNA Čipů v Molekulární Diagnostice Dědičných Onemocnění." *Klinická Biochemie a Metabolismus* 14 (2): 89–95.
- Gouas L, Kémény S, Beaufrère AM, Eymard-Pierre E, Pebrel-Richard C, Tchirkov A, Lemery D, Laurichesse-Delmas H, Vago P, Goumy C. 2015.** "Prenatal Screening of 21 Microdeletion/Microduplication Syndromes and

- Subtelomeric Imbalances by MLPA in Fetuses with Increased Nuchal Translucency and Normal Karyotype." *Cytogenetic and Genome Research* 146: 28–32.
- Hadjidekova S, Rukova B, Avdjieva-Tzavella D, Nesheva D, Tincheva R, Toncheva D. 2011.** "Comparison of Two Microarray CGH Platforms for Genomewide Copy Number Profiling: Oligo-Based Arrays versus Bacterial Artificial Chromosome Arrays." *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 25 (3): 2499–2504.
- Harper ME, Ullrich A, Saunders GF. 1981.** "Localization of the Human Insulin Gene to the Distal End of the Short Arm of Chromosome 11." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (7): 4458–60.
- Harper PS. 2006.** "The Discovery of the Human Chromosome Number in Lund, 1955 – 1956," 226–32.
- Heid C, Stevens J, Livak K, Williams PM. 1996.** "Real Time Quantitative PCR." *Genome Research* 6: 986–93.
- Hertzberg MS. 2005.** "Genetic Testing for Thrombophilia Mutations." *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*.
- Hogervorst FB, Nederlof PM, Gille JJ, McElgunn CJ, Grippeling M, Pruntel R, Regnerus R, van Welsem T, van Spaendonk R, Menko FH, Kluij I, Dommering C, Verhoef S, Schouten JP, van't Veer LJ, Pals G. 2003.** "Large Genomic Deletions and Duplications in the BRCA1 Gene Identified by a Novel Quantitative Method Advances in Brief Novel Quantitative Method," 1449–53.
- Hollox EJ, Atia T, Cross G, Parkin T, Armour JA. 2002.** "High Throughput Screening of Human Subtelomeric DNA for Copy Number Changes Using Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation (MAPH)." *J Med Genet* 39 (11): 790–95.
- Hsu T. 1952.** "Mammalian Chromosomes in Vitro." *The Journal of Heredity* 43: 167–72.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. 2005.** "Real-Time RT-PCR Normalisation; Strategies and Considerations." *Genes and Immunity* 6 (4): 279–84.
- Chen CP, Peng CR, Chern SR, Kuo YL, Wu PS, Town DD, Pan CW, Yang CW, Wang W. 2014.** "Interphase Fluorescence in Situ Hybridization Characterization of Mosaicism Using Uncultured Amniocytes and Cultured Stimulated Cord Blood Lymphocytes in Prenatally Detected Pallister-Killian Syndrome." *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology* 53 (4): 566–71.
- Chudoba I, Plesch A, Lörch T, Lemke J, Claussen U, Senger G. 1999.** "High Resolution Multicolor-Banding: A New Technique for Refined FISH Analysis of Human Chromosomes." *Cytogenetics and Cell Genetics* 84 (3-4): 156–60.
- Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F. 1994.** "Analysis of Changes in DNA Sequence Copy Number by Comparative Genomic Hybridization in Archival Paraffin-Embedded Tumor Samples." *The American Journal of Pathology* 145 (6): 1301–8.
- Janssen B, Hartmann C, Scholz V, Jauch A, Zschocke J. 2005.** "MLPA Analysis for the Detection of Deletions, Duplications and Complex Rearrangements in the Dystrophin Gene: Potential and Pitfalls." *Neurogenetics* 6 (1): 29–35.
- Kakazu N, Abe T. 2006.** "Multicolor Banding Technique, Spectral Color Banding (SCAN): New Development and Applications." *Cytogenetic and Genome Research* 114 (3-4): 250–56.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. 1992.** "Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors." *Science* 258 (5083): 818–21.
- Kearney L, Horsley SW. 2005.** "Molecular Cytogenetics in Haematological Malignancy: Current Technology and Future Prospects." *Chromosoma* 114 (4): 286–94.
- Kosyakova N, Weise A, Mrasek K, Claussen U, Liehr T, Nelle H. 2009.** "The Hierarchically Organized Splitting of Chromosomal Bands for All Human Chromosomes." *Molecular Cytogenetics* 2: 4.
- Kottler MJ. 1974.** "From 48 to 46: Cytological Technique, Preconception and the Counting of the Human Chromosomes." *Bulletin of the History of Medicine*, no. 48(4): 465–502.
- Koutna I, Kozubek S, Zaloudik J, Kozubek M, Lukasova E, Matula P, Bartova E, Skalnikova M, Cafourkova A, Jirsova P. 2000.** "Topography of Genetic Loci in Tissue Samples: Towards New Diagnostic Tool Using Interphase FISH and High-Resolution Image Analysis Techniques." *Analytical Cellular Pathology* 20 (4): 173–85.
- Langlois S, Duncan A. 2011.** "Use of a DNA Method, QF-PCR, in the Prenatal Diagnosis of Fetal Aneuploidies." *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* 33 (September): 955–60.
- Lawrence JB, Singer RH, Villnave CA, JStein JL, Stein GS. 1988.** "Intracellular Distribution of Histone mRNAs in Human Fibroblasts Studied by in Situ Hybridization." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (2): 463–67.
- Lee JJ, Cho SS, Kil EJ, Kwon ST. 2010.** "Characterization and PCR Application of a Thermostable DNA Polymerase from *Thermococcus Pacificus*." *Enzyme and Microbial Technology* 47 (4). Elsevier Inc.: 147–52.
- Lejeune J, Gautier M, Turpin R. 1959.** "Etude Des Chromosomes Somatiques de Neuf Enfants Mongoliens (Study of the Somatic Chromosomes of Nine Mongoloid Idiot Children)." *Comptes Rendus Des lAcademie Des Sciences* 248: 1721–22.
- Levan A, Östergren G. 1943.** "The Mechanism of C-Mitotic Action Observations on the Naphthalene Series." *Hereditas* 29 (3-4): 381–442.
- Liehr T, Starke H, Weise A, Lehrer H, Claussen U. 2004.** "Multicolor FISH Probe Sets and Their Applications." *Histology and Histopathology* 19 (1): 229–37.
- Liu P, Tarlé SA, Hajra A, Claxton DF, Marlton P, Freedman M, Siciliano MJ, Collins FS. 1993.** "Fusion between Transcription Factor CBF beta/PEBP2 Beta and a Myosin Heavy Chain in Acute Myeloid Leukemia." *Science (New York, N.Y.)* 261 (5124): 1041–44.
- Lorenz TC. 2012.** "Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies." *Journal of Visualized Experiments*, no. 63: e3998.

- Loussouarn D, Le Loupp AG, Frenel JS, Leclair F, Von Deimling A, Aumont M, Martin S, Campone M, Denis MG. 2012.** "Comparison of Immunohistochemistry, DNA Sequencing and Allele-Specific PCR for the Detection of IDH1 Mutations in Gliomas." *International Journal of Oncology* 40 (6): 2058–62.
- Lu XY, Harris CP, Cooley L, Margolin J, Steuber PC, Sheldon M, Rao PH, Lau CC. 2002.** "The Utility of Spectral Karyotyping in the Cytogenetic Analysis of Newly Diagnosed Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia." *Leukemia* 16 (11): 2222–27.
- Lundin C, Heidenblad M, Strombeck B, Borg A, Hovland R, Heim S, Johansson B. 2007.** "Tiling Resolution Array CGH of dic(7;9)(p11 Approximately 13;p11 Approximately 13) in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Reveals Clustered Breakpoints at 7p11.2 Approximately 12.1 and 9p13.1." *Cytogenetic and Genome Research* 118 (1): 13–18.
- Macville M, Veldman T, Padilla-Nash H, Wangsa D, O'Brien P, Schröck E, Ried T. 1997.** "Spectral Karyotyping, a 24-Colour FISH Technique for the Identification of Chromosomal Rearrangements." *Histochemistry and Cell Biology* 108 (4-5): 299–305.
- Maierhofer C, Jentsch I, Lederer G, Fauth C, Speicher MR. 2002.** "Multicolor FISH in Two and Three Dimensions for Clastogenic Analyses." *Mutagenesis* 17 (6): 523–27.
- Mandal K, Boggula VR, Borkar M, Agarwal S, Phadke SR. 2009.** "Use of Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) in Screening of Subtelomeric Regions in Children with Idiopathic Mental Retardation." *Indian Journal of Pediatrics* 76 (10): 1027–31.
- Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. 2002.** "Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach." *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 16 (1): 47–51.
- Mazánek P, Bajčiová V, Šterba J, Kuglík P, Veselská R. 2008.** "Novinky v Diagnostice a Léčbě Neuroblastomu." *Onkoloógia (Bratislava)* 3 (4): 257–61.
- Mezzelani A, Castiglioni B, Eggen A, Ferretti L. 1996.** "T-Banding Pattern of Bovine Chromosomes and Karyotype Reconstitution with Physically Mapped Cosmids." *Cytogenet Cell Genet* 73 (3): 229–34.
- Michalová K, Zemanová Z. 2005.** "Klasická a Molekulární Cytogenetika v Klinické Praxi." *Klinická Biochemie a Metabolismus* 13 (2): 63–67.
- Mullis KB. 1990.** "The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction." *Scientific American*, no. April: 56–65.
- O'Connor C. 2008.** "Karyotyping for Chromosomal Abnormalities." *Nature Education* 1 (1): 27.
- Özkinay C, Mitelman F. 1979.** "A Simple Trypsin-Giemsa Technique Producing Simultaneous G- and C-Banding in Human Chromosomes." *Hereditas* 90 (4): 3–6.
- Painter TS. 1923.** "The Spermatogenesis of Man." *J. Exp. Zool.*, no. 37: 291–321.
- Pantano L, Armengol L, Villatoro S, Estivill X. 2008.** "ProSeeK: A Web Server for MLPA Probe Design." *BMC Genomics* 9: 573.
- Patsalis PC, Kousoulidou L, Sismani C, Männik K, Kurg A. 2005.** "MAPH: From Gels to Microarrays." *European Journal of Medical Genetics* 48 (3): 241–49.
- Pellestor F, Paulasova P. 2004.** "The Peptide Nucleic Acids (PNAs), Powerful Tools for Molecular Genetics and Cytogenetics." *European Journal of Human Genetics* 12 (9): 694–700.
- Perner S, Brüderlein S, Hasel C, Waibel I, Holdenried A, Ciloglu N, Chopurian H. 2003.** "Quantifying Telomere Lengths of Human Individual." *American Journal of Pathology* 163 (5): 1751–56.
- Pickard BS, Hollox EJ, Pat MP, Porteous DJ, Blackwood DHR, Armour JL, Muir WJ. 2004.** "A 4q35.2 Subtelomeric Deletion Identified in a Screen of Patients with Co-Morbid Psychiatric Illness and Mental Retardation." *BMC Medical Genetics* 5: 21.
- Pietrzak J, Mrasek K, Obersztyn E, Stankiewicz P, Kosyakova N, Weise A, Cheung SW, Cai WW, von Eggeling F, Mazurczak T, Bocian E, Liehr T. 2007.** "Molecular Cytogenetic Characterization of Eight Small Supernumerary Marker Chromosomes Originating from Chromosomes 2, 4, 8, 18, and 21 in Three Patients." *Journal of Applied Genetics* 48 (2): 167–75.
- Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Seagraves R, Lucas J, Gray J. 1988.** "Fluorescence in Situ Hybridization with Human Chromosome-Specific Libraries: Detection of Trisomy 21 and Translocations of Chromosome 4." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (23): 9138–42.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. 1986.** "Cytogenetic Analysis Using Quantitative, High-Sensitivity, Fluorescence Hybridization." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (9): 2934–38.
- Raj GV, Moreno JG, Gomella LG. 1998.** "Utilization of Polymerase Chain Reaction Technology in the Detection of Solid Tumors." *Cancer* 82 (8): 1419–42.
- Rickert CH, Paulus W. 2004.** "Comparative Genomic Hybridization in Central and Peripheral Nervous System Tumors of Childhood and Adolescence." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 63 (5): 399–417.
- Ried T, Schröck E, Yi Ning Y, Wienberg J. 1998.** "Chromosome Painting: A Useful Art." *Human Molecular Genetics* 7 (10): 1619–26.
- Rooms L, Reyniers E, Kooy RF. 2005.** "Subtelomeric Rearrangements in the Mentally Retarded: A Comparison of Detection Methods." *Human Mutation* 25 (6): 513–24.
- Salman M, Jhanwar SC, Harry Ostrer H. 2004.** "Will the New Cytogenetics Replace the Old Cytogenetics?" *Clinical Genetics* 66 (4): 265–75.
- Sandberg AA, Meloni-Ehrig AM. 2010.** "Cytogenetics and Genetics of Human Cancer: Methods and Accomplishments." *Cancer Genetics and Cytogenetics* 203 (2). Elsevier Inc.: 102–26.
- Seabright M. 1971.** "A Rapid Banding Technique for Human Chromosomes." *The Lancet*.
- Sellner LN, Taylor GR. 2004.** "MLPA and MAPH: New Techniques for Detection of Gene Deletions." *Human Mutation* 23 (5): 413–19.

- Shaffer LG, Beudet AL, Brothman AR, Hirsch B, Levy B, Martin CL, Mascarello JT, Rao KW. 2007.** "Microarray Analysis for Constitutional Cytogenetic Abnormalities." *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 9 (9): 654–62.
- Shen Y, Irons M, Miller DT, Cheung SW, Lip V, Sheng X, Tomaszewicz K, Shao H, Fang H, Tang HS, Irons M, Walsh CA, Platt O, Gusella JF, Wu BL. 2007.** "Development of a Focused Oligonucleotide-Array Comparative Genomic Hybridization Chip for Clinical Diagnosis of Genomic Imbalance." *Clinical Chemistry* 53 (12): 2051–59.
- Shinawi M, Cheung SW. 2008.** "The Array CGH and Its Clinical Applications." *Drug Discovery Today* 13 (17-18): 760–70.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. 2002.** "Relative Quantification of 40 Nucleic Acid Sequences by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification." *Nucleic Acids Research* 30 (12): e57.
- Schreck RR, Distèche CM. 2001.** "Chromosome Banding Techniques." *Current Protocols in Human Genetics* Chapter 4 (1994): Unit4.2.
- Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. 1996.** "Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes." *Science* 273: 494–97.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. 1987.** "Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/neu Oncogene." *Science* 235 (4785): 177–82.
- Slijepcevic P. 2001.** "Telomere Length Measurement by Q-FISH." *Methods in Cell Science* 23 (1-3): 17–22.
- Smeets DF. 2004.** "Historical Prospective of Human Cytogenetics: From Microscope to Microarray." *Clinical Biochemistry* 37: 439–46.
- Sochivko DG, Fedorov AA, Varlamov DA, Kurochkin VE, Petrov RV. 2016.** "Mathematics Analysis of Polymerase Chain Reaction Kinetic Curves." *Journal of Biochemistry and Biophysics* 466 (1): 13–16.
- Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, Burkhardt HM, Meyer RG, Seelig SA, King W. 2000.** "The Development of a Multitarget, Multicolor Fluorescence in Situ Hybridization Assay for the Detection of Urothelial Carcinoma in Urine." *Journal of Molecular Diagnostics* 2 (3): 116–23.
- Speicher MR, du Manoir S, Schröck E, Holtgreve-Grez E, Schoell B, Lengauer C, Cremer T, Ried T. 1993.** "Molecular Cytogenetic Analysis of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Solid Tumors by Comparative Genomic Hybridization after Universal DNA-Amplification." *Hum Mol Genet* 2 (11): 1907–14.
- Speicher MR, Ballard SG, Ward DC. 1996.** "Computer Image Analysis of Combinatorial Multi-Fluor FISH." *Bioimaging* 4 (2): 52–64.
- Speicher MR. 2001.** "Multiplex-FISH (M-FISH) in Clinical Cytogenetics and Research Applications." *E.C.A. Newsletter*, no. 7: 3–7.
- Speicher MR, Carter NP. 2005.** "The New Cytogenetics: Blurring the Boundaries with Molecular Biology." *Nature Reviews. Genetics* 6 (10): 782–92.
- Su S, Chueh H, Li CH, Chang Y. 2015.** "Interphase Fluorescence in Situ Hybridization Assisting in Prenatal Counseling for Amniocentesis Karyotyping - Detected Fetal Mosaicism." *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology* 54 (5): 588–91.
- Sun NC, Chu EHY, Chang CC. 1974.** "Staining Method for the Banding Patterns of Human Mitotic Chromosomes." *Caryologia* 27 (3): 315–24.
- Szuhai K, Sandhaus E, Kolkman-Uljee SM, Lemaitre M, Truffert JC, Dirks RW, Tanke HJ, Fleuren GJ, Schuurin E, Raap AK. 2001.** "A Novel Strategy for Human Papillomavirus Detection and Genotyping with SybrGreen and Molecular Beacon Polymerase Chain Reaction." *Am J Pathol* 159 (5): 1651–60.
- Szuhai K, Bezrookove V, Wiegant J, Vrolijk J, Dirks RW, Rosenberg C, Raap AK, Tanke HJ. 2000.** "Simultaneous Molecular Karyotyping and Mapping of Viral DNA Integration Sites by 25-Color COBRA-FISH." *Genes Chromosomes and Cancer* 28 (1): 92–97.
- Szuhai K, Tanke HJ. 2006.** "COBRA: Combined Binary Ratio Labeling of Nucleic-Acid Probes for Multi-Color Fluorescence in Situ Hybridization Karyotyping." *Nature Protocols* 1 (1): 264–75.
- Tachdjian G, Aboura A, Lapierre JM, Viguié F. 2000.** "Cytogenetic Analysis from DNA by Comparative Genomic Hybridization." *Annales de Génétique* 43 (3-4): 147–54.
- Talkowski ME, Ernst C, Heilbut A, Chiang C, Hanscom C, Lindgren A, Kirby A, Liu S, Muddukrishna B, Ohsumi TK, Shen Y, Borowsky M, Daly MJ, Morton CC, Gusella JF. 2011.** "Next-Generation Sequencing Strategies Enable Routine Detection of Balanced Chromosome Rearrangements for Clinical Diagnostics and Genetic Research." *American Journal of Human Genetics*: 88(4): 469–481.
- Tanke HJ, Wiegant J, van Gijlswijk RP, Bezrookove V, Pattenier H, Heetebrij RJ, Talman EG, Raap AK, Vrolijk J. 1999.** "New Strategy for Multi-Colour Fluorescence in Situ Hybridisation: COBRA: COmbined Binary RAtio Labelling." *European Journal of Human Genetics: EJHG* 7 (1): 2–11.
- Teixeira, M R, H Tsarouha, S M Kraggerud, N Pandis, E Dimitriadis, J A Andersen, R A Lothe, and S Heim. 2001.** "Evaluation of Breast Cancer Polyclonality by Combined Chromosome Banding and Comparative Genomic Hybridization Analysis." *Neoplasia* 3 (3): 204–14.
- Thureson, A. C., M. L. Bondeson, C. Edeby, P. Ellis, C. Langford, J. P. Dumanski, and G. Annerén. 2007.** "Whole-Genome Array-CGH for Detection of Submicroscopic Chromosomal Imbalances in Children with Mental Retardation." *Cytogenetic and Genome Research* 118 (1): 1–7.
- Tibiletti, M. G. 2004.** "Specificity of Interphase Fluorescence in Situ Hybridization for Detection of Chromosome Aberrations in Tumor Pathology." *Cancer Genetics and Cytogenetics* 155 (2): 143–

- Tibiletti, M. G. 2007.** "Interphase FISH as a New Tool in Tumor Pathology." *Cytogenetic and Genome Research* 118 (2-4): 229–36.
- Toraman, Ahter Dilsad Toraman, Ibrahim Kesar, Guven Luleci, and Nurdan Tunali. 2002.** "Comparative Genomic Hybridization in Ganglioneuroblastomas." *Cancer Genetics and Cytogenetics* 132: 36–40.
- Uhrig S, Schuffenhauer S, Fauth C, Wirtz A, Daumer-Haas C, Apacik C, Cohen M, Müller-Navia J, Cremer T, Murken J, Speicher MR. 1999.** "Multiplex-FISH for Pre- and Postnatal Diagnostic Applications." *American Journal of Human Genetics* 65 (2): 448–62.
- Van Der Veken LT, Buijs A. 2011.** "Array CGH in Human Leukemia: From Somatics to Genetics." *Cytogenetic and Genome Research* 135 (3-4): 260–70.
- van der Wal JE, Hermsen MA, Gille HJ, Schouten-Van Meeteren NY, Moll AC, Imhof SM, Meijer GA, Baak JP, van der Valk P. 2003.** "Comparative Genomic Hybridisation Divides Retinoblastomas into a High and a Low Level Chromosomal Instability Group." *Journal of Clinical Pathology* 56 (1): 26–30.
- Verma RS. 1975.** "A Simple R Banding Technic." *American Journal of Medical Genetics*, 110–17.
- Vícha A, Eckschlagler T. 2008.** "Utilization of MLPA to Detection of Genetic Changes in Neuroblastoma." *Klinická Onkologie : Casopis Ceske a Slovenske Onkologicke Spolecnosti* 21 (4): 149–53.
- Vissers LE, Veltman JA, van Kessel AG, Brunner HG. 2005.** "Identification of Disease Genes by Whole Genome CGH Arrays." *Human Molecular Genetics* 14 (SUPPL. 2): 215–23.
- Wang N. 2002.** "Methodologies in Cancer Cytogenetics and Molecular Cytogenetics." *American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics* 115 (3): 118–24.
- Waters JJ, Barlow AL, Gould CP. 1998.** "FISH." *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology* 51: 62–70.
- Weiss MM, Hermsen MA, Meijer GA, van Grieken NC, Baak JP, Kuipers EJ, van Diest PJ. 1999.** "Comparative Genomic Hybridisation." *Molecular Pathology : MP* 52 (5): 243–51.
- Wilton L. 2002.** "Preimplantation Genetic Diagnosis for Aneuploidy Screening in Early Human Embryos: A Review." *Prenat. Diagn.* 22 (6): 512–18.
- Yamaguchi K, Takagi Y, Aoki S, Futamura M, Saji S. 2000.** "Significant Detection of Circulating Cancer Cells in the Blood by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction during Colorectal Cancer Resection." *Annals of Surgery* 232 (1): 58–65.
- Yang H, Ganguly A, Cabral F. 2010.** "Inhibition of Cell Migration and Cell Division Correlates with Distinct Effects of Microtubule Inhibiting Drugs." *Journal of Biological Chemistry* 285 (42): 32242–50.
- Zhang Y, Li X, Zou R, Xue Y, Lou X, He M. 2014.** "Bovine Thrombin Enhances the Efficiency and Specificity of Polymerase Chain Reaction." *BioTechniques* 57 (6): 289–94.
- Zubakov D, Boersma AWM, Choi Y, van Kuijk PF, Wiemer EAC, Kayser M. 2010.** "MicroRNA Markers for Forensic Body Fluid Identification Obtained from Microarray Screening and Quantitative RT-PCR Confirmation." *International Journal of Legal Medicine* 124 (3): 217–26.