

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

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární biologie, genetik a virologie



Bc. Karin Oroszová

Vyšetrenie chromozómových aberácií v mozaike rôznymi metódami
Analysis of mosaic chromosomal aberrations using various methods

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Jana Drábová, Ph.D.

Praha, 2019

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, 29. dubna 2019

.....
Bc. Karin Oroszová

Pod'akovanie

Touto cestou by som chcela vyjadriť moju vďaku školiteľke Mgr. Jane Drábovej, Ph.D. za cenné rady, ochotu a pomoc pri písaní diplomovej práce. Pod'akovanie taktiež patrí RNDr. Drahuši Novotnej za čas, ktorý mi venovala pri zaúčaní sa v cytogenetických metodách. Pod'akovanie patrí aj Mgr. Zuzane Slámovej za prínosné odborné rady. Ďakujem pracovníkom Oddělení lékařské cytogenetiky Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol, ktorí mi poskytli technickú podporu pri spracovaní vzoriek.

Abstrakt

Mozaika představuje dvě nebo více chromozómově odlišné buněčné linie u jedince. Mozaiky jsou nejčastěji způsobeny selháním chromozomů během mitózy, což vede k získání nebo ke ztrátě chromozomů, známé pod názvem aneuploidie, avšak strukturální aberace se také mohou vyskytovat v mozaice. Práce byla provedena na srovnání účinnosti metod FISH, array CGH a klasických cytogenetických technik pro detekci mozaiky.

Praktická část se zaměřuje na srovnávání výsledků u 45 pacientů, u nichž byly identifikovány mozaiky aneuploidie gonozomů (26 pacientů) a mozaiky aneuploidie autozomů (19 pacientů). Získané údaje ukazují, že se liší vyšetření karyotypu a FISH z periferní krve u 20 z 36 (55 %) pacientů. Objevil se případ, kde karyotyp nezachytil mozaiku a metoda FISH odhalila mozaiku s abnormálními buněčnými liniemi s procentuálním zastoupením menším než 5 %. Metoda array CGH potvrdila podobné výsledky u 10 z 12 (83 %) pacientů s metodou FISH v rámci vyšetření z periferní krve.

Práce se zabývá i výsledky vyšetření arteficiálně vyrobených suspenzí se známým stupněm mozaicizmu. Z výsledků vyplývá, že metoda FISH má přesnější procentuální záchyt mozaiky ve srovnání s karyotypem.

Ukázalo se, že použití všech tří technik paralelně umožňuje v klinické praxi dosáhnout vysoké citlivosti a specifity na správné vyhodnocení cytogenetického základu abnormálních klinických znaků u pacientů s mozaikovou formou aberací.

Klíčova slova

Mozaicizmus, chromozómová aberace, karyotypování, FISH, array CGH, diagnostika

Abstract

Mosaicism is represented by two or more chromosomally different cell lines in an individual. Mosaics are most often caused by chromosome malsegregation during mitosis, resulting in the gain or loss of chromosomes, known as aneuploidy, but structural aberrations can also occur in mosaic form. The problem is the limitation of detection with standart cytogenetic methods. The present study was carried out to compare the efficiency of FISH, array CGH and cytogenetic techniques in detection of mosaicism.

In the practical part the results of 45 patients with mosaicisms of aneuploidy of gonosomes (26 patients) and mosaicisms of autosomes (19 patients) were compared. The data show that we have different peripheral blood karyotype and FISH results in 23 of 37 patients (62%). There was a case of failure of detection of the mosaicism on the karyotype and the FISH method revealed a abnormal cell lines with a percentage of less than 5%. The array CGH method confirmed the karyotype and FISH results in 10 out of 12 patients (83%) in peripheral blood tests.

The work also dealt with artificially made mosaics. From the results, it is obvious that the FISH method has a more accurate percentage of mosaic capture compared to the karyotype.

The results indicate that using the techniques in parallel allow in clinical practice to achieve high sensitivity and specificity for the correct evaluation of the cytogenetic basis of abnormal clinical features in mosaic patients.

Keywords

Mosaicism, chromosome aberrations, karyotyping, FISH, array CGH, diagnostics

Obsah

1	Úvod	10
2	Prehľad literatúry	11
2.1	Charakteristika mozaicizmu	11
2.2	História mozaicizmu	12
2.3	Typy mozaicizmu.....	13
2.3.1	Somatický mozaicizmus	15
2.3.2	Mozaika zárodočnej línie	16
2.4	Výskyt mozaicizmu	17
2.4.1	Tkanivovo-špecifická mozaika	17
2.4.2	Molekulárne mechanizmy vzniku mozaicizmu.....	18
2.4.3	Mozaicizmus spôsobený jedinou genetickou zmenou	19
2.4.4	Mechanizmy, ktoré vedú k aneuploidii v mozaike	19
2.4.5	Mechanizmy, ktoré vedú k mozaike pre štrukturálne anomálie	20
2.5	Klinické prejavy mozaiky	20
2.5.1	Mozaicizmus: mechanizmy zlučiteľné so životom.....	20
2.5.2	Miernejší fenotyp pri mendelovských chorobách	21
2.5.3	Miernejší fenotyp chromozómových aberácií.....	22
2.5.4	Zmeny v mozaikovej forme	23
2.5.5	Mozaicizmus v skorom embryu	25
2.6	Somatické mutácie a starnutie	26
2.6.1	Strata X chromozómu a starnutie.....	26
2.7	Identifikácia mozaicizmu.....	28
2.7.1	Cytogenetické metódy	28
2.7.2	Analýza mozaiky karyotypom.....	29
2.7.3	FISH.....	30
2.7.4	Analýza chromozómov pomocou techniky mikroarray (CMA)	31
2.7.5	Array CGH.....	32
2.7.6	SNP array	34
2.7.7	NGS.....	35
2.8	Problémy pri identifikácii mozaicizmu	36
2.8.1	Úskalia pri detekcii mozaiky s nízkou mierou aneuploidie	36
2.8.2	Obmedzenia pri identifikácii mozaicizmu.....	37
2.8.3	Problémy pri porovnávaní úrovni mozaiky s pozorovaným fenotypom.....	37
3	Ciele práce.....	39
4	Materiál a metódy	40
4.1	Súbor pacientov	40

4.2	Arteficiálne vyrobené mozaiky	42
4.3	Sondy pre analýzu FISH.....	43
4.4	Kultivácia buniek pre cytogenetické a molekulárne vyšetrenie.....	44
4.4.1	Prístroje na kultiváciu buniek.....	44
4.4.2	Reagencie a roztoky na kultiváciu buniek	44
4.5	Príprava preparátov a farbenie G-pruhovaním pre vyšetrenie karyotypom	47
4.5.1	Prístroje na prípravu preparátov a farbenie G-pruhovaním pre vyšetrenie karyotypom.....	47
4.5.2	Reagencie a roztoky na prípravu preparátov a na farbenie G-pruhovaním pre vyšetrenie karyotypom	47
4.6	Príprava preparátov pre vyšetrenie metódou FISH	51
4.6.1	Prístroje na prípravu preparátov pre metódu FISH	51
4.6.2	Reagencie a roztoky na prípravu preparátov – pre vyšetrenie metódou FISH.....	51
4.7	Vyšetrenie metódou FISH	52
4.7.1	Prístroje na vyšetrenie metódou FISH	52
4.7.2	Reagencie a roztoky na vyšetrenie metódou FISH.....	52
4.8	Vyšetrenie metódou array CGH	55
4.8.1	Prístroje na vyšetrenie metódou array CGH.....	55
4.8.2	Reagencie a roztoky na vyšetrenie metódou array CGH.....	55
5	Výsledky	63
5.1	Výsledky karyotypu	63
5.2	Výsledky metódy FISH	66
5.2.1	Percentuálny záchyt mozaiky (karyotyp vs. FISH).....	73
5.2.2	Percentuálny záchyt mozaiky metódou FISH (mitózy vs. jadrá).....	75
5.3	Výsledky array CGH	77
5.4	Výsledky biologických materiálov	79
5.5	Výsledky arteficiálne vyrobených mozaik	81
5.5.1	Vyšetrenie arteficiálne vyrobených mozaik karyotypom	81
5.5.2	Vyšetrenie arteficiálne vyrobených mozaik metódou FISH.....	81
6	Diskusia	83
6.1	Porovnávanie výsledkov karyotyp vs. FISH	83
6.1.1	Zhrnutie porovnávania karyotyp vs. FISH.....	88
6.2	Porovnávanie získaných výsledkov s metódou array CGH	90
6.2.1	Zhrnutie porovnávania výsledkov s metódou array CGH	96
6.3	Porovnávanie výsledkov z rôznych biologických materiálov	97
6.3.1	Zhrnutie porovnávania výsledkov z rôznych biologických materiálov.....	99
6.4	Porovnávanie výsledkov z arteficiálne vyrobených mozaik.....	100

6.4.1 Zhrnutie porovnávania výsledkov z arteficiálne vyrobených mozaik.....	100
6.5 Starnutie a strata X chromozómu.....	101
6.6 Splnené ciele práce	102
7 Záver.....	104
Zoznam použitej literatúry.....	105
Zoznam obrázkov a tabuliek.....	116
Zoznam obrázkov.....	116
Zoznam tabuliek.....	116
Príloha 1	- 1 -

Zoznam skratiek

ADA – gén kódujúci adenosín deaminázu (*adenosine deaminase*)

Array CGH – array komparatívna genómová hybridizácia (*array comparative genomic hybridization*)

CCD – zariadenie s viazanými nábojmi (*charge-coupled device*)

cen – centroméra

CMA – analýza chromozómov pomocou techniky mikroarray (*chromosomal microarray analysis*)

CNS – centrálna nervová sústava (*central nervous system*)

CNV – zmeny v počte kópií (*copy number variation*)

Cy3-dUTP – cyanínom 3 značený deoxyuridíntrifosfát (*cyanin3-deoxyuridinetriphosphate*)

Cy5-dUTP – cyanínom 5 značený deoxyuridíntrifosfát (*cyanin5-deoxyuridinetriphosphate*)

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

del – delécia

der – derivovaný chromozóm

dNTP – deoxyribonukleotid (*deoxyribonucleotidetriphosphate*)

FISH – fluorescenčná *in situ* hybridizácia (*fluorescent in situ hybridization*)

i - izochromozóm

inv dup – invertovaná duplikácia

ISCN – Medzinárodný systém pre nomenklatúru ľudskej cytogenomiky (*International System for Human Cytogenomic Nomenclature*).

KS – Klinefelterov syndróm (*Klinefelter syndrome*)

mar – marker chromozóm

MEM – minimálne esenciálne médium (*minimum essential medium*)

MLPA – multiplexová, na ligácii závislá, amplifikačná metóda (*multiplex ligation-dependent probe amplification*)

MR – mentálna retardácia (*mental retardation*)

N/A – výsledok nie je k dispozícii (*not available*)

NF1– neurofibromatóza 1 (*neurofibromatosis type 1*)

NF2 – neurofibromatóza 2 (*neurofibromatosis type 2*)

NGS – sekvenovanie novej generácie (*next generation sequencing*)

p – krátke rameno chromozómu

PAR – pseudoautozomálne oblasti (*pseudoautosomal regions*)

PAS – poruchy autistického spektra (*autistic spectrum*)

PBS – fosfátový pufof (*phosphate buffered saline*)

PCR – polymerázová reťazová reakcia (*polymerase chain reaction*)

PIK3CA – fosfatidyl-inositol-4,5-bisfosfát 3-kinázová katalytická podjednotka α izoformy (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform*)

PKS – Pallister-Killianov syndróm (*Pallister-Killian syndrome*)

PMR – psychomotorická retardácia (*psychomotor retardation*)

PMV – psychomotorický vývoj

pter – terminálna oblasť ramena p

q – dlhé rameno chromozómu

qter – terminálna oblasť ramena q

r – kruhový chromozóm

rpm – otáčok za minútu (*revolutions per minute*)

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute medium*

SA – spontánny potrat (*spontaneous abortion*)

SD – smerodajná odchýlka (*standard deviation*)

SHOX – homeoboxový gén pre malý vzrast (*short stature homeobox gene*)

SNP – jednonukleotidový polymorfizmus (*single nucleotide polymorphism*)

SNV – jednonukleotidová varianta (*single nucleotide variant*)

SRY – oblasť Y rozhodujúca o pohlaví (*sex-determining region Y*)

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

sSMC – malé nadpočetné markerové chromozómy (*small supernumerary marker chromosomes*)

t – translokácia

TE – Tris-EDTA (*tris-ethylenediaminetetraacetic acid*)

TS – Turnerov syndróm (*Turner syndrome*)

TSC – tuberózna skleróza (*tuberous sclerosis complex*)

TSC1 – *tuberous sclerosis 1*

TSC2 – *tuberous sclerosis 2*

ÚBLG 2. LF UK a FN Motol – Ústav biologie a lekárske genetiky 2. lekárske fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní Nemocnice v Motole

UPD – uniparentálna dizómia (*uniparental disomy*)

UZ – ultrazvuk

VCC – vrodená srdcová vada (*vitium cordis congenitum*)

VVV – vrodená vývojová vada

1 Úvod

Mosaicizmus je definovaný ako prítomnosť dvoch alebo viacerých bunkových línií, ktoré sú geneticky odlišné a vznikajú z jednej zygoty. V ľudskom tele je podceňovaný, keďže genotypy s mozaikou sú v rôznom pomere a tým najmä prípady mozaicizmu s nízkou úrovňou zostávajú neobjasnené. Chromozómový mozaicizmus môže byť príčinou genetických ochorení, potratov, rakoviny a má svoj význam aj v prípade starnutia.

Hlavné mechanizmy, ktoré sa podieľajú na vzniku somatickej mozaiky, budú stručne opísané pomocou príkladov klinicky definovaných porúch. Druhá kapitola bude pojednávať o tom, ako vysoko výkonné technológie zlepšujú mieru detekcie mozaiky, rovnako ako význam identifikácie mozaiky v klinickej praxi.

Mozaicizmus bol skúmaný pomocou metód karyotypu, FISH a array CGH. Vyšetřili sa rôzne typy mutácií, jednalo sa o monozómie, trizómie, delécie, duplikácie, translokácie, prstencové chromozómy a izochromozómy. Klasická cytogenetická metóda je schopná detekovať všetky typy numerických a štrukturálnych chromozómových aberácií, ale citlivosť metódy pri diagnostike mozaiky je nízka. Metóda array CGH dokáže odhaliť malé delécie alebo duplikácie, ktoré nie sú identifikované karyotypom alebo metódou FISH. Array CGH má mnoho potenciálnych výhod oproti iným metódam, ktoré sú v súčasnosti k dispozícii na vyšetřenie mozaiky. Očakávame významné rozdiely medzi výsledkami získanými pri aplikácii všetkých troch metód.

Cieľom bolo taktiež zistiť percentuálne zastúpenie arteficiálne vyrobenej mozaiky, ktorej výsledky slúžia na porovnanie záchytu mozaiky použitými metódami a na odhalenie príčin nepresnosti merania.

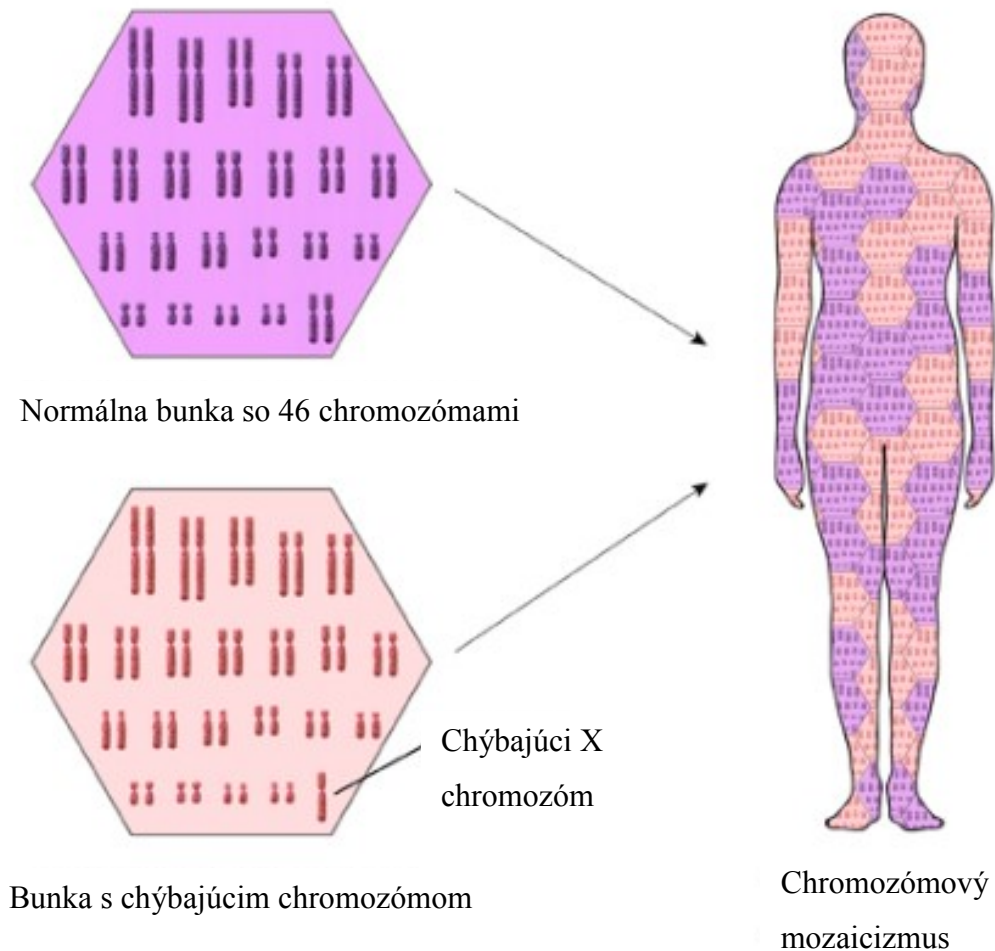
Prínosom tejto štúdie bolo stanoviť detekčný limit pre záchyt mozaicizmu uvedenými metódami na základe porovnávania výsledkov od jednotlivých pacientov. Značnú úlohu pri identifikácii mozaiky zohráva aj tkanivová špecifita. Výsledky sú prínosné aj z hľadiska optimalizácie metód na detekciu mozaicizmu a výberu najvhodnejšej metódy pre záchyt mozaiky. Cieľom je nájsť metódu, ktorá umožňuje presnú identifikáciu mozaicizmu a je schopná analyzovať aj numerické aj štrukturálne odchýlky chromozómov v mozaike.

2 Prehľad literatúry

2.1 Charakteristika mozaicizmu

Genetické choroby sú spôsobené zmenami sekvencie DNA, zmenami počtu kópií alebo zmenami rozmiestnenia genómu (štrukturálne zmeny), čo môže viesť k zmenám v expresii génov alebo vo funkcii proteínov. Zmeny DNA môžu byť dedičné alebo sa môžu objaviť *de novo* v priebehu meiózy, počas vytvárania zárodočných buniek alebo po oplodnení buď v štádiu vývoja alebo v už diferencovanej bunke. Keď sa genetické zmeny vyskytujú somaticky, človek sa skladá z buniek s aspoň dvomi odlišnými genotypmi, tento stav je známy ako mozaika a je znázornený na Obrázok 1. Chromozómový mozaicizmus je definovaný ako prítomnosť dvoch alebo viacerých chromozómovo odlišných bunkových línií u jedinca. Príčinou chromozómovej mozaiky sú najčastejšie chyby počas mitózy, kedy dochádza k aneuploidiam, ktoré sa vyznačujú buď získaním alebo stratou chromozómov. V mozaike sa môžu objaviť aj štrukturálne aberácie.

Chromozómový mozaicizmus je spájaný s genetickými ochoreniami, potratmi a s preimplantačným odumretím embryí (HASSOLD A HUNT 2001). Mozaicizmus je prítomný aj v prípade rakoviny (LENGAUER *et al.* 1998) a jeho zvýšený výskyt je preukázaný aj pri známej trizómii 21 (KOVALEVA 2010), dokonca sa jeho význam dokazuje aj v spojitosti so starnutím (LY *et al.* 2000). Neexistuje presná hranica, pri ktorej mozaika je z klinického hľadiska irelevantná alebo relevantná. Vzhľadom na prevalenciu a význam mozaiky u ľudí je dôležité porozumieť pôvodu, mechanizmu a výskytu mozaiky počas vývoja. Cieľom tejto kapitoly je vysvetliť rôzne typy mozaiky, mechanizmy, ktorých výsledkom je mozaicizmus, výskyt mozaiky v priebehu vývoja, klinické dôsledky a význam chromozómovej mozaiky.



Obrázok 1. Somatický mozaicizmus. Človek sa skladá z buniek s najmenej dvoma odlišnými bunkovými líniami. Na hornom obrázku je znázornená bunka, ktorá má normálny počet chromozómov: 46,XX, na dolnom obrázku je bunka s chýbajúcim X chromozómom: 45,X - Turnerov syndróm. Tento stav je známy ako mozaika (upravené podľa <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/mosaicism>).

2.2 História mozaicizmu

Koncept mozaiky nie je jedinečný pre ľudskú genetiku a bol pôvodne objavený u modelových organizmoch vrátane *Drosophily*. Známy genetik STERN (1936) preukázal, že mitotický *crossing over* by mohol viesť k vzniku mozaiky. Mozaiky, ktoré sa vyskytujú somaticky môžu tiež viesť k bunkovým zmenám vedúcim k rakovine, čo pôvodne navrhol vedec Boveri v roku 1929. Ten naznačil, že rakovina nastáva, keď sa mutácia vyskytne v jednej bunke, ktorá sa potom replikuje s ďalšími genetickými zmenami, ktoré majú za následok rakovinový fenotyp.

Ľudská cytogenetika prišla v roku 1956 s objavom, že správny počet chromozómov u ľudí je 46 a lekárska genetika priniesla v roku 1959 odhalenie, že Downov syndróm je spôsobený tromi kópiami chromozómu 21 (TJIO A LEVAN 1956, LEJEUNE *et al.* 1959). Krátko potom boli identifikované príklady chromozómovej mozaiky.

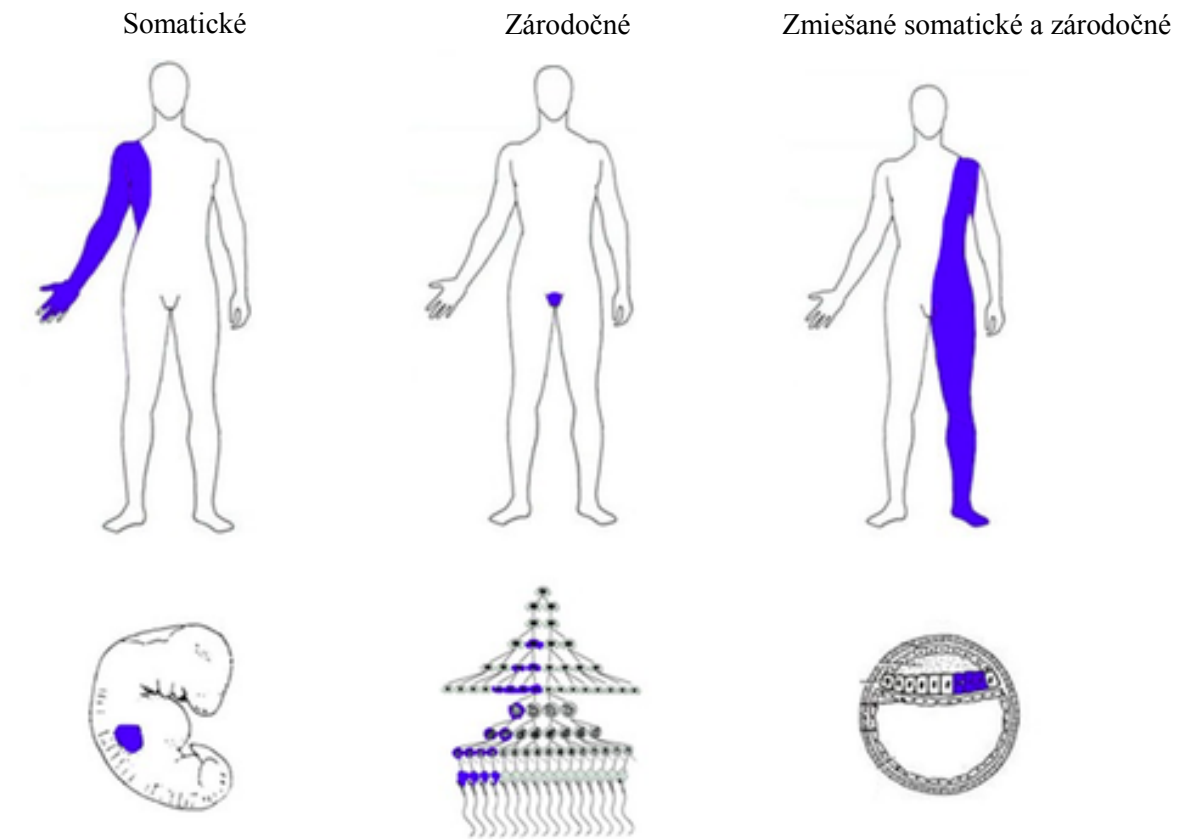
V roku 1960 bola objavená prvá chromozómová mozaika, keď sa identifikoval jedinec s fenotypom intersex, ktorý mal 45,X/46,XY mozaicizmus (HIRSCHHORN *et al.* 1960). Neskôr bolo objavených mnoho ďalších príkladov mozaiky.

V nasledujúcich kapitolách budú definované typy mozaicizmu s krátkym prehľadom jeho hlavných mechanizmov, ktoré sa podieľajú na vzniku somatickej mozaiky, pričom budú stručne popisované tieto mechanizmy pomocou príkladov klinicky definovaných porúch. Spomenutý bude prínos vysoko výkonných technológií a ich zlepšenie miery detekcie somatickej mozaiky.

2.3 Typy mozaicizmu

Z hľadiska ľudskej genetiky existujú tri hlavné typy mozaiky (viď Obrázok 2):

1. Somatické: vyskytujú sa iba v telových bunkách, ale mimo zárodočnej línie;
2. Zárodočné: vyskytujú sa iba v zárodočných bunkách alebo ich prekurzoroch, ale nenachádzajú sa inde v tele;
3. Zmiešané zárodočné a somatické: vyskytujú sa v telových bunkách a v bunkách zárodočnej línie.



Obrázok 2. Typy chromozómovej mozaiky. Spodné obrázky ukazujú možné mutácie v neskorom embryu, počas spermatogézy a v skorom embryu (upravené podľa SPINNER A CONLIN 2014).

Je náročné rozlíšiť mieru zasiahnutia jednotlivých tkanív (vrátane zárodočných), pretože to vyžaduje vyšetrenie viacerých typov buniek, čo zvyčajne nie je možné. Tiež je ťažké predpovedať klinické dôsledky mozaiky, pretože typy a distribúcia abnormálnych buniek sa môžu značne líšiť v závislosti od doby kedy sa mutácia objaví.

Zárodočná (alebo gonadálna) mozaika sa týka genetických variácií genómov buniek zárodočnej línie v rámci jedinca, ktorá sa preniesie na jeho potomkov, u ktorých sa táto zmena prejaví. Na fenotyp svojho nositeľa spravidla nemá vplyv (výnimku tvoria aberácie ovplyvňujúce plodnosť resp. majúce vplyv na funkciu gamét). U somatického mozaicizmu, podľa dávnejších poznatkov, mutácie vzniknuté v skorom embryonálnom vývoji môžu byť nájdené v somatických aj v zárodočných bunkách a spôsobiť genotypovú a fenotypovú heterogenitu medzi tkanivami (HOLSTEGE *et al.* 2014).

2.3.1 Somatický mozaicizmus

V každom bunkovom delení sa môže vyskytnúť chyba, ktorá je pozorovaná prítomnosťou zmiešaných bunkových línií v jednom alebo vo viacerých tkanivách (somatická mozaika) (SESHADRI *et al.* 1987). Vzhľadom k tomu, že mozaika môže vzniknúť akýmkoľvek typom postzygotickej zmeny je zrejmé, že každý má v tele aspoň jednu bunku, ktorá sa líši od ostatných, a tým každý človek je v skutočnosti mozaika (DE 2011, FRANK 2014). Somatické mutácie môžu byť detekované u zdravých dvojíc monozygotných dvojčiat, čo podporuje myšlienku, že somatické mutácie sa vyskytujú od počiatku života, a preto je pravdepodobné, že sa nahromadí podiel somatických mutácií po celú dobu života, čím sa zvýši vlastná genetická variácia (LI *et al.* 2014). Podobne, takto môžu byť všetky ženy považované za mozaiky kvôli inaktivácii chromozómu X (AVNER A HEARD 2001).

Somatický mozaicizmus ovplyvňuje rôzne tkanivá na rôznych úrovniach, v závislosti na čase, kedy nastala zmena, na postihnutom géne a na tom, či je v danom tkanive exprimovaný, a na schopnosti prežitia mutantných buniek. Pokiaľ zárodočná línia jedinca obsahuje mutantné bunky (mozaiku zárodočnej línie), môžu byť predané do ďalšej generácie. Podozrenie na zárodočnú mozaiku sa objaví, pokiaľ sa zdravým rodičom narodí viacej potomkov s dominantne sa prejavujúcim znakom (ktorý u rodičov nie je prítomný), naopak toto podozrenie je možné vylúčiť v prípade preukázaného somatického mozaicizmu u potomka (NGAI *et al.* 2010).

Klinicky môže byť prehliadnutá somatická mozaika kvôli drobným fyzickým známkam často pripisovaným normálnym rozdielom medzi jedincami (YOUSSOUFIAN A PYERITZ 2002). Môže prispieť k fenotypovým nezrovnalostiam u monozygotných dvojčiat, rovnako ako k premenlivej expresivite pri monogenných poruchách (GOTTLIEB *et al.* 2001). Dlho sa predpokladalo, že niektoré poruchy môžu prežiť iba v mozaikovej forme (HAPPLE 1987). Somatická mozaika sa predpokladá, v prípade keď jedinec vykazuje výrazné rozdiely v telesnej symetrii alebo zmenenú pigmentáciu iba v určitých častiach jeho tela, ktoré neboli predtým zaznamenané v jeho rodine (NGAI *et al.* 2010). Mierne prejavy takýchto rozdielov sú pravdepodobne spôsobené vystavením rôznemu prostrediu. Jedná sa o prejavy ako je zmena farby kože v dôsledku expozície ultrafialovým žiarením. Najviac študovaným príkladom somatickej mozaiky je rakovina, kedy všetky nádory predstavujú podmnožinu buniek vnútri jedinca, ktorá má nahromadené mutácie, čo vedie k nekontrolovanému deleniu buniek a výhodám pre prežitie (KNUDSON 2001).

2.3.2 Mozaika zárodočnej línie

Zárodočná mozaika sa prejaví narodením viacerých postihnutých súrodencov rodičom bez príznakov. Predpokladá sa, že mutácia sa vyskytla počas vytvárania zárodočnej línie, kde boli ovplyvnené bunky obmedzené na zárodočnú líniu, bez postihnutých somatických buniek od rodičov. V skutočnosti nie je možné určiť načasovanie vzniku mutácie. Dokonca aj v prípade jedného dieťaťa so zjavne dominantnou poruchou bez mozaiky, ktoré sa narodilo zdravým rodičom, nevieme, či sa mutácia objavila *de novo* počas gametogenézy, meiózy alebo počas mitózy počas skorého vývoja postihnutého dieťaťa. Mozaicizmus zárodočnej línie bol zaznamenaný u mnohých typov genetických porúch, chromozómových a jedno-nukleotidových.

Súhrnné údaje viedli k odhadu rizika ich výskytu na základe empirických nálezov. Bol zaznamenaný zjavný mozaicizmus zárodočnej línie s frekvenciou menej ako 1% u niektorých porúch (ako je Apertov syndróm) až po 30% u Duchennovovej svalovej dystrofie (ZLOTOGORA 1998). Vysvetlenie rozdielov vo frekvenciách nie je známe, aj keď sú pravdepodobne spojené s prevládajúcimi typmi mutácií pre každú poruchu a s klinickými účinkami somatickej mozaiky. V snahe lepšie porozumieť načasovaniu *de novo* mutáciám a ich potenciálnemu návratu prostredníctvom mozaiky zárodočnej línie, štúdia CAMPBELL *et al.* (2014) skúmala časovanie mutácie na skupine 100 jedincov s rozličnými *de novo* zmenami v počte kópií (delécie). Navrhli analýzu na hľadanie mozaiky s nízkou frekvenciou z periférnej krvi rodičov. Táto štúdia použila analýzu na základe PCR, ktorá bola navrhnutá tak, aby použité primery identifikovali len skôr odhalenú deletovanú alelu, ktorá by mohla byť detekovaná v nízkych hladinách (<1%). Štyria zo 100 skúmaných probandov mali rodičov, ktorí preukazovali nízku úroveň mozaiky, čo dokazuje, že tieto mutácie sa v skutočnosti vyskytovali aj somaticky u rodičov detí skôr než iba v zárodočnej línii alebo skôr než vznikli v skorom štádiu vývoja dieťaťa. Zistenie parentálnej mozaiky má dôsledky na prenos týchto mutácií a naznačuje, že existuje potenciál pre ich znovuobjavenie.

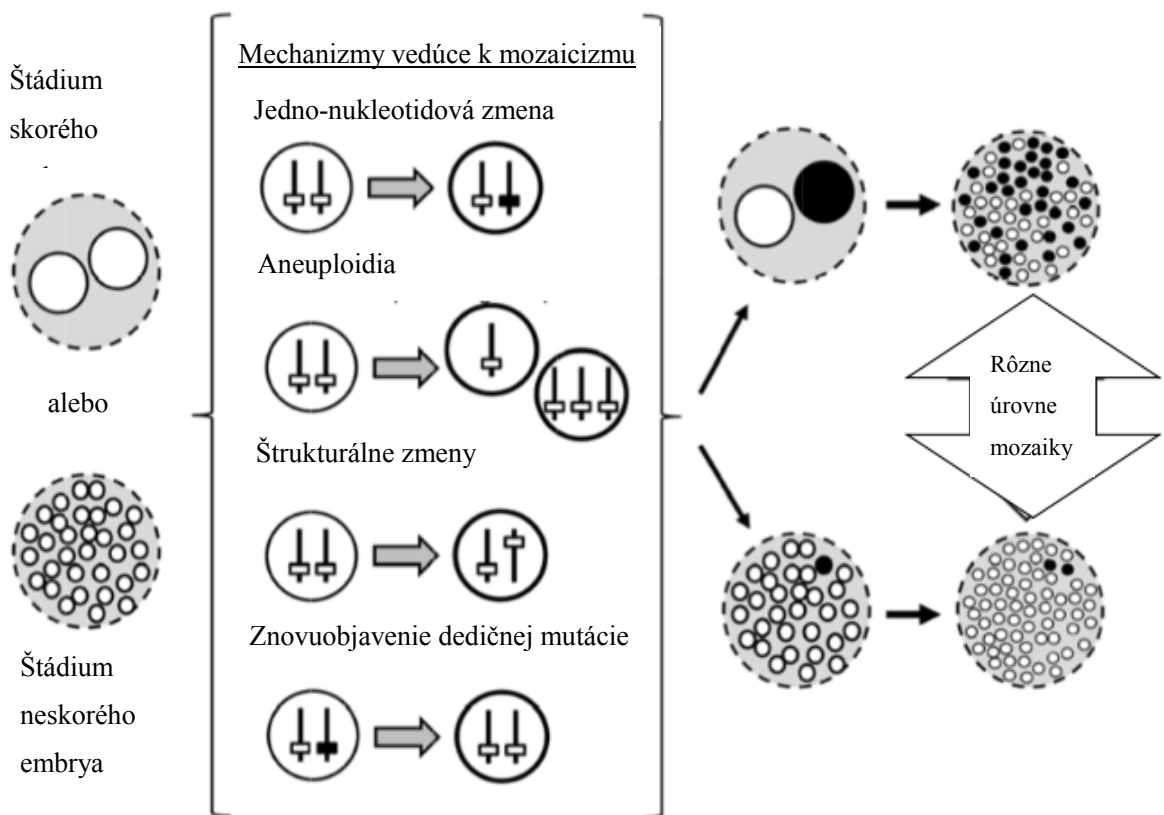
2.4 Výskyt mozaicizmu

2.4.1 Tkanivovo-špecifická mozaika

Detekcia mutácie sa zvyčajne vykonáva, keď klinické výsledky naznačujú skrytú genetickú poruchu. Štandardný spôsob ako odhaliť genetické mutácie je analýza DNA z periférnej krvi, z ktorej sa ľahko identifikujú vrodené mutácie. Problém nastáva a táto identifikácia by bola neúčinná, ak by mutácie boli obmedzené na iné tkanivo a v periférnej krvi by boli prítomné v nízkej hladine. Záchyt mozaiky je náročný, pretože vyžaduje buď bližšie preskúmanie sledovaných tkanív, alebo analýzu širšieho odberu vzoriek tkanív. V niektorých prípadoch môže klinický lekár pochybovať o prítomnosti mozaiky, a preto požaduje ďalšie analýzy, ktoré buď majú vyššiu citlivosť detekcie v jednom tkanive alebo môže požadovať vzorky ďalších tkanív. Nie je vždy ľahké predvídať tkanivá, ktoré by mohli byť zasiahnuté. Stále častejšie sa využívajú genomické vyšetrenia, vrátane array CGH (komparatívna genómová hybridizácia), ktorý umožňuje objektívny test genómu pri vysokom rozlíšení, array SNP (jednonukleotidový polymorfizmus) (CONLIN *et al.* 2010), ktoré sú citlivé na zmeny v genotype v rámci chromozómových regiónov a sekvenovanie budúcej generácie (NGS) (LINDHURST *et al.* 2011), ktorý umožňuje detekciu alelovo – špecifických nukleotidových zmien v stovkách až miliónov fragmentov DNA. Používanie týchto techník zabezpečilo, že detekcia mozaiky s nízkou frekvenciou je oveľa presnejšia a zlepšilo sa naše chápanie pre rozsah a zložitosť mozaiky. Poruchy, ktoré postihujú mozog sú obzvlášť náročné na diagnostiku mozaiky, pretože k analýze mozgového tkaniva nie je možné rutinne pristupovať. Avšak dokázalo sa získať mozgové tkanivo od jedincov s rôznymi malformáciami mozgu a ukázala pomocou techník analýzy jednotlivých buniek, že sa v mozgu vyskytujú somatické zmeny v počte kópií (CNV). Tieto zmeny pravdepodobne súvisia s malformáciami u týchto jedincov. Preukázalo sa, že sa na zistených zmenách podieľa niekoľko neurónov a tieto klonálne zmeny by mohli viesť k mozgovej patológii, a to aj v prípade, ak nie je ovplyvnený celý mozog (CAI *et al.* 2014).

2.4.2 Molekulárne mechanizmy vzniku mozaicizmu

Somatická mozaika môže vzniknúť akýmkoľvek typom mutácie, od chromozómových až po jednonukleotidové zmeny. Chromozómový mozaicizmus zahŕňa aj numerické a štrukturálne aberácie a je zvyčajne detekovaný štandardnými cytogenetickými technikami, zatiaľ čo molekulárne zmeny vyžadujú detekciu s vyššou rozlišovacou schopnosťou. Rôzne molekulárne mechanizmy vedú k rôznym typom somatických mozaik. Obrázok 3 ukazuje schematické zobrazenie toho, ako každý mechanizmus celkovo vedie k somatickému mozaicizmu.



Obrázok 3. Schematické zobrazenie rôznych mechanizmov vedúcich k somatickým mozaikám. Bodkované kruhy predstavujú embryá v post-zygotickom štádiu. Plné kruhy predstavujú jednotlivé bunky. Biely kruh predstavuje nezmenené bunky a čierne kruhy predstavujú pozmenené bunky, takže zmes bielych a čiernych kruhov reprezentuje zmes bunkových populácií, samotnú definíciu somatickej mozaiky. Chromozómy vnútri buniek sú reprezentované pevnými vertikálnymi čiarami a malý box predstavuje jeden gén. Biele boxy predstavujú štandardnú alelu a čierny box predstavuje zmutovanú alelu (upravené podľa COHEN *et al.* 2015).

2.4.3 Mozaicizmus spôsobený jedinou genetickou zmenou

Podľa definície somatická mozaika môže byť spôsobená jedinou somatickou zmenou. Neurofibromatóza 1 (NF1) a neurofibromatóza 2 (NF2) sú spôsobené dominantnými mutáciami v nádorových supresorových génoch *NF1* a *NF2* (ASTHAGIRI *et al.* 2009). Medzi príznaky patria uzly *Lisch* (WELEBER A ZONANA 1983), fibromatózne nádory kože a náchylnosť k rakovine. Väčšina prípadov NF1 a NF2 je vrodených, ale sú známi jedinci so somatickými mutáciami (KEHRER-SAWATZKI *et al.* 2004, ASTHAGIRI *et al.* 2009, ERICKSON 2010). Takéto mutácie sú prítomné iba u sady buniek, čo vedie k zmene farby pokožky so vzorom ako škvrny a k léziám, ako sú *café-au-lait* škvrny (ASTHAGIRI *et al.* 2009). Podobne, bolo dokázané, že jedna mutácia v géne *PIK3CA* spôsobí prerastanie len v somatických tkanivách obsahujúcich mutáciu (LINDHURST *et al.* 2012, COHEN *et al.* 2014). Tieto lokalizovane pozorovateľné fenotypové znaky zostávajú najlepšie prediktory somatickej mozaiky.

2.4.4 Mechanizmy, ktoré vedú k aneuploidii v mozaike

Chromozómové aberácie zahŕňajú zmenu počtu chromozómov, jednoduché alebo komplexné chromozómové prestavby zahŕňajúce delécie, duplikácie, inzercie, inverzie a translokácie a malé nadpočetné markerové chromozómy (sSMC). Mozaicizmus sa často spája s týmito chromozómovými mutáciami. Zistilo sa, že pomer buniek mozaiky môže ovplyvniť závažnosť fenotypu (KAMINKER *et al.* 1985, LIEHR *et al.* 2013).

Zmeny v počte chromozómov najčastejšie vznikajú kvôli chybe v distribúcii chromozómov pri delení buniek. Získanie alebo strata celých chromozómov sa môže vyskytnúť ako dôsledok nondisjunkcie, *anaphase lagging* ako autozómu, tak aj pohlavného chromozómu (COONEN *et al.* 2004) a chromozómovým ziskom označovaným ako endoreduplikácia (TAYLOR *et al.* 2014).

Väčšina prípadov je spôsobená meiotickými chybami v rodičovskej zárodočnej línii. Chyby v segregácii sa však môžu vyskytnúť postzygoticky, čo vedie k somatickému mozaicizmu (ROBINSON *et al.* 1999, YOUSSEFIAN A PYERITZ 2002). Zistilo sa, že aneuploidné bunky majú zníženú bunkovú proliferáciu a zmenené metabolické dráhy, čo môže vysvetľovať prečo sa väčšina trizomických embryí nevyvinie (WILLIAMS *et al.* 2008).

Príležitostne sa môže objaviť neskoršia somatická udalosť s cieľom obnovy počtu chromozómov, čo je známe ako *chromosomal rescue*. Zmes oboch aneuploidných buniek a buniek po záchrane chromozómov vedie ku karyotypu mozaiky (ROBINSON *et al.* 1993). *Chromosomal rescue* je náhodná a ako taká vedie k zvýšenému riziku uniparentálnej dizómie (UPD), pričom obidve kópie páru chromozómov pochádzajú od rovnakých rodičov (ROBINSON *et al.* 1997, NIEMITZ A FEINBERG 2004). UPD má svoje vlastné klinické následky, pričom zvyšuje šancu na homozygotnosť recesívnej mutácie a zasahuje do genómového imprintingu. Ďalej spôsobuje rozdielne značenie medzi materskými a otcovskými alelami, kde je jedna alela exprimovaná a druhá je umlčaná (ROBINSON 2000). Somatická mozaika, ktorá zahŕňa UPD pridáva ďalšiu hladinu variability pozorovaných fenotypov.

2.4.5 Mechanizmy, ktoré vedú k mozaike pre štrukturálne anomálie

Štrukturálna mozaika sa môže vyskytnúť počas mitózy v dôsledku mechanizmov, ako je nealelická homológna rekombinácia a nehomologické spájanie koncov. V prípade oboch bude výsledkom zmes buniek obsahujúcich pôvodnú alebo opravenú sekvenciu. Ďalšie poznatky o týchto mechanizmoch, vrátane klinických príkladov, sa nachádzajú v iných prehľadoch (SASAKI *et al.* 2010, LIEBER 2010).

2.5 Klinické prejavy mozaiky

2.5.1 Mozaicizmus: mechanizmy zlučiteľné so životom

Mnohé poruchy boli opísané iba v mozaikových formách a prežívanie je možné len vtedy, keď sú prítomné aj normálne bunky (ROBINSON *et al.* 1993). Klasické príklady zahŕňajú McCune-Albrightov syndróm, Proteusov syndróm a Sturge-Weberov syndróm.

Ak zvažujeme autozomálnu aneuploidiu zlučiteľnú so životom, tak sú len tri úplné trizómie: Trizómia 13, 18 a 21 (HASSOLD A JACOBS 1984, ROBINSON *et al.* 1999). Boli opísané aj zriedkavé prípady úplnej trizómie 22, ale tieto deti zomreli krátko po pôrode (NAICKER A ALDOUS 2014). Vrodená autozomálna monozómia je mimoriadne zriedkavá,

čo naznačuje embryonálna letalita (HASSOLD A HUNT 2001). Zdá sa, že monozómia 21 je životaschopná, aj keď sú opísané iba 3 prípady u živonarodených detí, pričom majú závažné zdravotné komplikácie (BURGESS *et al.* 2014). BURGESS *et al.* (2014) naznačujú, že tieto prípady pravdepodobne nepredstavujú skutočnú monozómiu 21, ale skôr nedostatočné zájdenie do hĺbky v analytických metódach. Vývoj technológií, ktoré sú k dispozícii na molekulárne vyšetrenie, pravdepodobne vrhá svetlo na toto tvrdenie. Napriek tomu sú iné autozomálne aneuploidie životaschopné vo forme mozaiky (TORAL-LOPEZ *et al.* 2012). Napríklad mozaiková trizómia 8, tiež známa ako Warkanov syndróm, je zriedkavým stavom charakterizovaným mentálnou retardáciou (MR), kostnými malformáciami, faciálnymi dysmorfizmami, oneskoreným vývinom, predispozíciou rakoviny a srdcovými anomáliami (RICCARDI 1977). Ďalšie hlásené mozaikové trizómie zahŕňajú trizómiu 14, 16 a 17 (BENN 1998, DABER *et al.* 2011, FAGERBERG *et al.* 2012).

2.5.2 Miernejší fenotyp pri mendelovských chorobách

Mozaicizmus pri ľudských mendelovských chorobách bol objavený pozorovaním miernejších klinických fenotypov (HIRSCHHORN 2003). Skutočnú frekvenciu mozaiky pri monogénnych poruchách je ťažko odhadnúť v dôsledku variability fenotypov pozorovaných dokonca aj pri mutáciách zárodočnej línie, k tomu mozaicizmus nízkej úrovne často vedie k veľmi miernym účinkom, ktoré sa pravdepodobne nezistia.

Jedným z príkladov mendelovskej poruchy pozorovanej v mozaikovej forme je dedičná tyrozinémia typu I spôsobená dedičnými mutáciami v géne enzýmu fumarylacetoacetáthydrolyázy. Porucha sa prenáša v autozomálnom recesívnom stave. Klinické príznaky zahŕňajú poškodenie pečene a obličiek, neurologické poškodenie a hepatóm. Pacienti s touto metabolickou poruchou môžu mať mozaiky pečene s mutantnou a revertantnou populáciou hepatocytov (KING *et al.* 2006). Revertantné hepatocyty tvoria pečeneňové uzliny a majú rastovú výhodu oproti mutantným bunkám (KING *et al.* 2006).

Ťažká kombinovaná imunodeficiencia spôsobená deficitom adenosín deaminázy je ďalšia autozomálne recesívna porucha. Fenotyp ochorenia zahŕňa početné vírusové, plesňové a bakteriálne infekcie na začiatku života a neschopnosť prežiť (KVITTINGEN *et al.* 1994). Gén *ADA* kóduje adenosín deaminázu, ktorá eliminuje deoxyadenosín generovaný pri rozpade DNA (KOCH A SHOWS 1980). Táto mutácia znižuje enzymatickú aktivitu, čo vedie

k akumulácii deoxyadenozínu na toxické hladiny (KOCH A SHOWS 1980). Revertantné lymfocyty majú rastovú výhodu, čo vedie k miernejším fenotypom (HIRSCHHORN *et al.* 1996).

2.5.3 Miernejší fenotyp chromozómových aberácií

Somatická mozaika môže prispieť k fenotypovému prejavu syndrómu, najmä zahŕňajúca aneuploidie. Aneuploidie pohlavných chromozómov sú bežnejšie pozorované u živo narodených detí ako autozomálne aneuploidie (ERICKSON 2010) a postzygotické získanie alebo strata X alebo Y chromozómov vedie k somatickému mozaicizmu.

Klinefelterov syndróm (KS), charakterizovaný karyotypom 47,XXY (KAMISCHKE *et al.* 2003), je najčastejšou aneuploidizáciou pohlavných chromozómov u mužov, ktorá postihuje 1 z 500 detí (NIELSEN A WOHLERT 1991). U pacientov s KS sa vyskytujú zväčšené prsia, minimálne ochlpenie tela, malé semenníky a často majú jazykové deficity (KAMISCHKE *et al.* 2003, DEMALIAJ *et al.* 2012). Pacienti s mozaikou KS sú veľmi ťažko klinicky diagnostikovateľní, pretože ich fenotyp sa pohybuje od normálnej inteligencie až po MR, ako aj plodnosť až úplnú neplodnosť - klinickú indikáciu, ktorá by sa vyšetrovala až v dospelosti.

Turnerov syndróm (TS) je genetická porucha, ktorá postihuje ženy a je spôsobená čiastočnou alebo úplnou absenciou druhého X chromozómu (SYBERT A MCCAULEY 2004). Pacientky s TS majú zvyčajne nízky vzrast a často sa im nedarí reprodukovať. TS bol opísaný s karyotypmi ako 45,X; 45,X/46,XX a 45,X/47,XXX (SYBERT A MCCAULEY 2004, DEMALIAJ *et al.* 2012). Je dôležité poznamenať, že niektorí jedinci s TS môžu niesť chromozóm Y, čo vedie k mozaike so 45,X/46,XY alebo 45,X/46,XX/46,XY karyotypom. Títo jedinci, aj napriek tomu, že sú mozaiky, majú často ďalšie komplikácie zahŕňajúce pohlavný a gonádový vývoj oproti osobám bez mozaiky TS (HERSMUS *et al.* 2012).

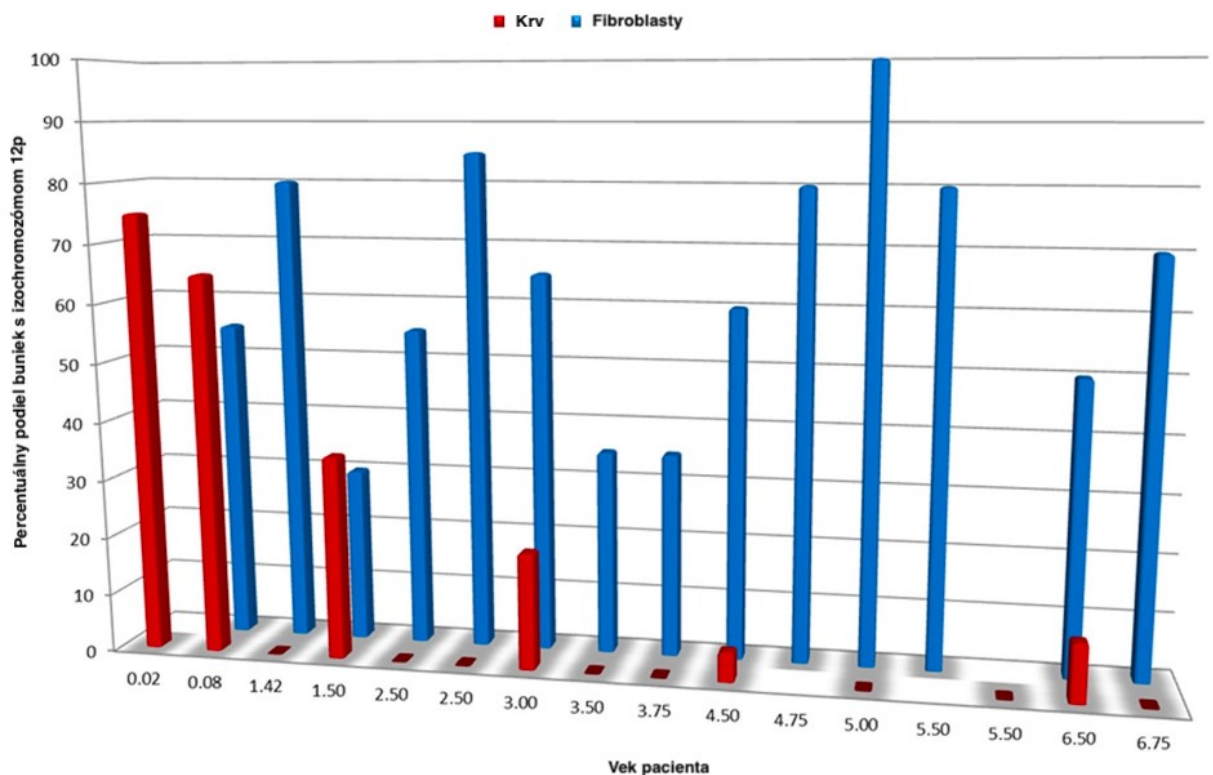
Ďalším príkladom chromozómovej aberácie je somatický mozaicizmus v prípade sSCM (LIEHR *et al.* 2013). Somatická mozaika sa našla u nosičov sSMC, v rôznych pomeroch mozaiky, ktoré môžu byť pod 5% študovaných buniek (LIEHR *et al.* 2013). Napriek tomu, že u väčšiny pacientov nemal somatický sSMC mozaicizmus žiadny priamy klinický účinok, existovali aj prípady so zmenenými klinickými účinkami v dôsledku mozaiky (LIEHR *et al.* 2013).

2.5.4 Zmeny v mozaikovej forme

Väčšina genetických zmien, ktoré sa vyskytujú v stave mozaiky, sa našla aj u jedincov bez mozaiky. Existujú mnohé zmeny, ktoré sa dajú nájsť iba v mozaike. Napríklad všetky chromozómové aneuploidie sú pomerne zriedkavé, okrem chromozómov 13, 18, 21, X a Y, ktoré sa dajú nájsť ako trizomické vo všetkých bunkách. Mozaika s trizómiou pre chromozómy 8, 9, 14, 17 a 22 sa taktiež našla u živonarodených detí (SCHINZEL 2001). Vyskytujú sa niektoré prípady prenatálne diagnostikovanej mozaiky trizómie 5, ktorá vedie k potomstvu s normálnym fenotypom, čo naznačuje nízku úroveň mozaiky, ale našli sa aj prípady spojené s viacerými vrodenými anomáliami, kardiovaskulárnymi malformáciami a intrauterinným rastovým oneskorením (REITTINGER *et al.* 2017). Sú známe prenatálne diagnostikované mozaiky trizómie 16, ktorá má väčšinou dobrý postnatálny výsledok. Avšak, nález mozaiky v plodovej vode a prítomnosť vážnych vrodených anomálií, súvisí so zvýšeným rizikom vývojového oneskorenia (LANGLOIS *et al.* 2006). Trizómia 20 je jednou z najčastejšie identifikovaných porúch v amniocytoch, pričom v postnatálnej analýze sa ju podarí odhaliť len zriedkavo (BARG *et al.* 2009). Uvádza sa aj nájdený karyotyp 69,XXX/47,XX,+15, ktorý predstavuje mozaiku trizómie 15 (DEAN *et al.* 1997). Predpokladá sa prítomnosť selekcie proti trizómii vo všetkých bunkách na začiatku embryonálneho vývoja, zatiaľ čo u terminálne diferencovaných tkanív je tolerovaná. V súlade s touto hypotézou je frekvencia trizómií bez mozaiky omnoho častejšia u spontánných potratov v porovnaní so živonarodenými jedincami. Tvrdenie sa netýka chromozómu 1 (HASSOLD 1982).

Štrukturálne chromozómové aberácie sú taktiež nájdené iba v stave mozaiky, z ktorých je najlepšie preskúmaný izochromozóm 12p (i(12p)) spojený s Pallister-Killianovým syndrómom (PKS). PKS sa vyznačuje viacerými dysmorfickými znakmi, ťažkým intelektuálnym postihnutím a tkanivovo špecifickým mozaicizmom. Izochromozóm 12p sa zvyčajne nepozoruje v kultivovaných lymfocytoch T-buniek periférnej krvi analyzovaných pomocou karyotypu, ale môže sa identifikovať v kultivovaných kožných fibroblastoch v stave mozaiky. Izochromozóm bol tiež preukázaný vo vysokom percentuálnom zastúpení u buniek pri priamej analýze kostnej drene, pri nižších hladinách v kultúre kostnej drene a vo fibroblastoch z rôznych tkanív (WARD *et al.* 1988). Keď sa vynechá kultivácia, izochromozóm je možné detekovať buď metódou array CGH alebo interfáznu FISH (SCHUBERT *et al.* 1997; CHIESA *et al.* 1998). Predpokladá sa, že pri delení lymfocytov existuje proti tomuto izochromozómu selekcia, a preto je nezvyčajné ho identifikovať z kultivovanej periférnej krvi. Keď sa začali skúmať periférne krvinky od pacientov s PKS

pomocou cytogenetických metód založených na array CGH, detekcia izochromozómu 12p z periférnej krvi bola zjavne vylepšená a približne u polovice (46 %) pacientov s PKS sa zistilo, že majú izochromozóm 12p. Na porovnanie, vyšetrenie založené na array CGH takmer vždy detekuje izochromozóm 12p vo vzorkách z fibroblastov, kedy je potvrdená klinická diagnóza PKS (CONLIN *et al.* 2012, HODGE *et al.* 2012). Analýzy izochromozómu i(12p) 15 pacientov s PKS, u ktorých boli študované obidva lymfocyty aj fibroblasty, ukázali, že frekvencia izochromozómu 12p sa znížila s vekom pacienta v lymfocytoch, ale nie vo fibroblastoch, čo naznačuje Obrázok 4. Analýzou série pacientov s PKS sa ukázalo, že izochromozóm vznikol v rôznych štádiách meiózy u rôznych pacientov, ale vo väčšine prípadov vznikol izochromozóm počas alebo po meióze II (SPINNER A CONLIN 2014). Zvyčajne sa vyskytuje ako náhodná udalosť počas vzniku pohlavných buniek u rodičov postihnutého jedinca. Chybou v delení buniek nazývanou nondisjunkcia sa vytvára izochromozóm 12p a dieťa môže mať dve normálne kópie chromozómu 12 spolu s izochromozómom 12p. Keď sa bunky delia počas skorého vývoja, niektoré bunky strácajú izochromozóm 12p, zatiaľ čo iné bunky si zachovávajú abnormálny chromozóm, čo spôsobuje mozaiky. Takmer všetky prípady mozaiky PKS sú spôsobené mozaikou izochromozómu 12p (IZUMI A KRANTZ 2014).



Obrázok 4. Detekcia izochromozómu 12p u pacientov s Pallister-Killianovým syndrómom (upravené podľa SPINNER A CONLIN 2014).

Sú známe jedno-nukleotidové varianty jedného génu, ktoré sa vyskytujú iba v stave mozaiky. Aktivácia mutácií génu *AKT3*, ktorý sa vyskytuje len somaticky, spôsobuje Proteusov syndróm, poruchu charakterizovanú prehustením kostí, kože a iných tkanív. Predpokladá sa, že ak sa mutácia vyskytla konštitučne a bola prítomná v každej bunke, tento nárast proteínovej funkcie by mal za následok embryonálnu letalitu (LINDHURST *et al.* 2011). Ostatné poruchy jedného génu, ktoré sa vyskytujú iba v stave mozaiky, zahŕňajú McCuneov-Albrightov syndróm (charakterizovaný abnormálnym rastom fibrózneho tkaniva v kostiach, *café au lait* škvŕn a endokrinných aberácií), Schimmelpenningov syndróm (syndróm lineárneho sebaceózneho névu) a keratinocytárne epidermálne névy (MACHIELA A CHANOCK 2013).

2.5.5 Mozaicizmus v skorom embryu

Prerušenie počas skorého vývoja dieťaťa je dobre známe a odhaduje sa len 30 % tehotenstiev, ktoré vedú k narodeniu živého dieťaťa (MACKLON *et al.* 2002). Počas tehotenstva ostáva rizikom výskyt chromozómových aberácií, a sú prítomné s oveľa vyššou frekvenciou u plodov, ktoré sú spontánne potratené. Platí to pre aberácie, ktoré sa vyskytujú v každej bunke (konštitučné aberácie) aj mozaiky (HASSOLD *et al.* 1980, BENKHALIFA *et al.* 2005). Vysoká frekvencia aberácií chromozómov u spontánnych potratov je známa od šesťdesiatych rokov, potom ako bolo zavedené vyšetrenie plodov cytogenetickými metódami (BOUÉ A BOUÉ 1976). Použitie metódy array CGH umožnilo analýzu veľmi skorých embryí získaných pred implantáciou. Odhalila sa mimoriadne vysoká miera chromozómových aberácií v mozaikovej forme identifikovanou u embryí v štádiu rýhovania. Väčšina zistených aneuploidii je obmedzená na jednu bunku embrya, čo naznačuje, že chromozómové zmeny sa objavujú často počas skorých štádií bunkového delenia. Tento prekvapivo vysoký počet aberácií odhaľuje, ako sú chromozómové chyby bežné, a poskytuje vysvetlenie nízkeho počtu úspešných tehotenstiev a vysokej miery spontánnych potratov (VANNESTE *et al.* 2009, MERTZANIDOU *et al.* 2013). Zistilo sa, že embryá s aneuploidiami vrátane trizómií pre chromozómy 13, 15, 16, 18, 21 a 22 majú nižšiu pravdepodobnosť dosiahnuť štádium blastocysty (RUBIO *et al.* 2007).

2.6 Somatické mutácie a starnutie

DNA sa v našich bunkách delí počas celého nášho života a nie je prekvapením, že sa priebežne vyskytujú mutácie a akumulujú sa v priebehu času. Bolo preukázané, že akumulácia somatických chromozómových zmien môže byť spojená so zvýšeným výskytom rakoviny, hoci sa mutácie akumulujú so zvýšenou frekvenciou v celej populácii po dosiahnutí veku 50 rokov (JACOBS *et al.* 2012, LAURIE *et al.* 2012). Analýza somatických mutácií nahromadených u ženy, ktorá žila 115 rokov ukázala pozoruhodný výsledok mutačného zaťaženia. Sekvenovanie DNA z periférnej krvi odhalilo v jej nerepetitívnom genóme (približne 77 % jej celkového genómu) viac ako 420 somatických jednonukleotidových zmien. Vzhľadom na vek pacientky, žiadna z nájdených mutácií nebola v kritických génoch, čo umožnilo stálu akumuláciu mutácií bez smrti alebo bez transformácie týchto buniek na rakovinový fenotyp (HOLSTEGE *et al.* 2014). Nazbierané dáta zo štúdií o somatických mutáciách a starnutí naznačujú, že mutácie sú bežné a ak je ovplyvnený kritický gén, môže byť ovplyvnená morbidita a mortalita, ale ak nie, veľké nahromadenie mutácií je zlučiteľné s dlhovekosťou.

2.6.1 Strata X chromozómu a starnutie

Detekciu bunkovej línie 45,X s nízkou hladinou mozaiky, ktorá sa vyšetruje klasickou cytogenetickou analýzou u dospelých žien, môže byť ťažké interpretovať. Vytvorilo sa grafické znázornenie, ktoré naznačuje Tabuľka 1. Poskytuje hladiny mozaiky pri strate X chromozómu súvisiace s vekom (GUTTENBACH *et al.* 2007). Malo by to pomôcť diagnostickým cytogenetickým laboratóriám na určenie významnosti 45,X bunkových línií zistených u žien všetkých vekových skupín. Porovnávaním frekvencií bunkových línií 45,X u žien, u ktorých bol zaznamenaný aspoň jeden spontánny potrat (SA), so ženami bez SA sa nezistili žiadne významné rozdiely. To znamená, že našej populácii prítomnosť 45,X buniek nie je spojený s neželaným ukončením tehotenstva (RUSSELL *et al.* 2007).

Tabuľka 1. Výskyt straty X chromozómu u žien v závislosti od veku (upravené podľa GUTTENBACH *et al.* 2007)

Vek (roky)	Počet pacientov	Priemerný vek (roky)	Jadrá (%) s monozómiu X
0-5	5	2.6	1.58
6-10	6	8.8	2.82
11-15	5	13.0	2.50
16-20	4	19.0	2.30

21-25	8	22.5	2.23
26-30	5	27.8	2.00
31-35	5	32.6	3.32
36-40	6	37.2	2.95
41-45	5	42.8	2.52
46-50	4	47.5	3.13
51-55	4	54.0	3.20
56-60	5	57.2	4.35
61-65	5	62.8	3.68
66-70	5	67.5	4.94
71-75	7	72.0	4.17
76-80	4	78.3	4.58
81-85	6	84.0	4.73
>85	1	91.0	5.10

Aneuploidné bunky vznikajú, keď sa chromozómy nedokážu správne oddeliť počas meiózy alebo mitózy. Spojenie chronologického starnutia a aneuploidie v kultivovaných ľudských krvných lymfocytoch je javom, ktorý bol prvýkrát popísaný pred 58 rokmi (JACOBS *et al.* 1961). Neskôr, z celkovej populácie bol charakterizovaný chromozómový základ aneuploidie. Metafázy u žien prevažne stratili chromozóm skupiny C a u mužov chromozóm G-skupiny (JACOBS *et al.* 1963). Podiel monozomických buniek s rastúcim vekom sa ukázal byť vyšší u žien ako u mužov. Údaje u žien dostali kvadratickú krivku s prudším nárastom pozorovaným medzi 45 a 64 rokmi, zatiaľ čo údaje mužského pohlavia vykazovali lineárny charakter (JACOBS *et al.* 1963).

Karyotypom sa pozorovali bunky v štádiu metafázy na zistenie pôvodu chýbajúcich chromozómov. Preukázalo sa, že X chromozóm sa prednostne stratil u žien, zatiaľ čo chromozóm Y sa najčastejšie stratil u mužov (GALLOWAY A BUCKTON 1978). Strata chromozómov X je viac ako desaťnásobná v porovnaní so stratou autozómov (GALLOWAY A BUCKTON 1978, MARTIN *et al.*, 1980, NOWINSKI *et al.* 1990). Inaktívny X chromozóm bol u starších žien stratený preferenčne (ABRUZZO *et al.* 1985, HANDO *et al.* 1997). Vyskytol sa prípad, kedy sa nezistili žiadne rozdiely medzi frekvenciou straty neaktívneho a aktívneho chromozómu X v aneuploidných bunkách (SURRELLS *et al.* 1996). Uvažuje sa o tom, že strata inaktívnej X nemá žiadny vplyv na životaschopnosť periférnych lymfocytov, pretože inaktívny X neobsahuje žiadne známe aktívne gény rozhodujúce pre prežitie lymfocytov (HANDO *et al.* 1997). Na začiatku osemdesiatych rokov niekoľko štúdií zaznamenalo zvýšený výskyt aneuploidie chromozómu X v periférnych kultúrach u žien s anamnézou opakovaných SA (STALLARD *et al.* 1981, DIEDRICH *et al.* 1983, HOLZGREVE *et al.* 1984). Mutácie súvisia s chybami v meióze, a preto sa vyskytujú SA s trizómiou (HECHT *et al.* 1984, WENGER *et al.* 1984).

2.7 Identifikácia mozaicizmu

Identifikácia mozaiky v celej populácii by prispela k získaniu znalostí o normálnom ľudskom vývoji. Avšak kvôli etickým úvahám to je náročné, ak sa uvažuje o vykonávaní invazívnych testov u zdravých jedincov. Z tohto dôvodu sa výskum zdravých kontrol vykonáva na tkanivách, ktoré sú k dispozícii, ako je krv a/alebo sliny, čo spôsobí, že prípadný somatický mozaicizmus sa často nezachytí. Získané znalosti pochádzajú najmä z vyšetrenia somatického mozaicizmu pri ľudských chorobách. Bežne používané technológie pre klinický výskum, ako sú FISH, karyotyp sa vyznačujú obmedzeniami pri detekcii mozaiky s nízkou frekvenciou. Nástup NGS však spôsobil revolúciu v metódach detekcie chromozómových aberácií. Táto nová technologická éra podporuje detekciu somatickej mozaiky až na 1 bázový pár, rovnako ako na úrovni 1 % (LINDHURST *et al.* 2011, LEE *et al.* 2012), čo vedie k lepšiemu pochopeniu jej úlohy v ľudských chorobách.

2.7.1 Cytogenetické metódy

V neskorých 50-tych rokoch sa odhalilo, že ľudia nesú 46 chromozómov. Následne bol zavedený karyotyp ako nástroj pre diagnostiku pacientov s MR a vrodenými chybami, pričom sa zistilo spojenie niektorých aneuploíd so špecifickými fenotypmi. Klasické cytogenetické vyšetrenie patrí dlhé roky k základnej diagnostickej metóde na odhalenie chromozómových aberácií (FORD A HAMERTON 1956, FORD *et al.* 1959, JACOBS A STRONG 1959, TJIO A LEVAN 2010). Na začiatku sa prevádzali vyšetrenia chromozómov s použitím jednoduchých techník farbenia, ktoré umožňovali len detekciu celých skupín chromozómov. Stupeň presnosti sa zvýšil v sedemdesiatych rokoch minulého storočia zavedením techník prúžkovania chromozómov. Tieto techniky umožnili detekciu jednotlivých chromozómov (CASPERSSON *et al.* 1970, DRETS A SHAW 1971) a viedli k identifikácii viacerých syndrémov spojených so špecifickými chromozómovými aberáciami (YUNIS 1976).

Na začiatku vyšetrenia sa robí príprava na analýzu, ktorá môže byť odlišná na základe určitého materiálu alebo typu vyšetrenia. Najčastejšie sa používajú lymfocyty z periférnej krvi. Kultivácia periférnej krvi sa robí v rastovom médiu, ktoré obsahuje fytohemaglutinín. Neskôr (po 72 hodinách) sa kolcemidom umožní zastavenie bunkového delenia v mitóze v štádiu metafázy. Bunky sa ďalej vystavia hypotonickému prostrediu, kedy bunka naberá vodu a tým sa umožní rozostúpenie chromozómov. V nasledujúcom kroku je potrebné bunky fixovať

pomocou zmesi matanolu a kyseliny octovej. Nakoniec sa na podložné sklíčka naniesie bunková suspenzia, v tejto fáze nastane rozbitie bunkovej steny, tým vyliatie chromozómov a možnosť ich fixácie na sklo. Nasleduje farbenie preparátov (KOČÁREK *et al.* 2010), pričom najčastejšie využívanou farbiacou metódou je G-pruhovanie, kedy sa chromozómy vystavia účinku trypsínu a následne sú nafarbené pomocou Giemsovho roztoku. Posledným krom je vizualizácia a samotná analýza chromozómov.

2.7.2 Analýza mozaiky karyotypom

Cytogenetická analýza je vhodná na objavenie mozaiky s pomerne vysokou frekvenciou výskytu. Z dôvodu, že každá bunka sa počíta individuálne a rozdiely na karyotype by sa dali ľahko rozpoznať. Výhodou je, že nie je špecifická len pre určité typy aberácií, keďže sa hodnotí celý genóm a hodnotenie je na chromozómovej úrovni (MILLER *et al.* 2010). Nevýhodou je nízke rozlíšenie tejto metódy, čo zabraňuje detekcii submikroskopických zmien.

Identifikácia mozaiky s nízkou frekvenciou môže byť náročná, tým že sa bežne počíta len obmedzený počet buniek. Štandardná analýza chromozómov zvyčajne zahŕňa analýzu 20 buniek z periférnej krvi, pričom bolo vypočítané, že pri tejto analýze sa podarí záchyt 14% mozaiky. Ak sa spočíta viac buniek, teoreticky sa môžu detekovať nižšie frekvencie mozaiky (počítanie 30 buniek 10% mozaiky, počítanie 50 buniek 6% mozaiky a počítanie 100 buniek 3% mozaiky). Napr., aby sa vylúčila 10% mozaika alebo väčšia s 95% spoľahlivosťou musí sa vyhodnotiť minimálne 30 metafáz (HOOK 1977). Zatiaľ čo iné tabuľky naznačujú potrebu vyhodnotiť aspoň 35 buniek, čo je v skutočnosti číslo potrebné na vylúčenie 10% mozaiky s 97,5% spoľahlivosťou (WOLFF *et al.* 2010).

V prípade, že chceme získať metafázne bunky je potrebné, aby sa jednalo o tkanivo, ktoré je schopné deliť sa a ktoré sme schopní kultivovať. Vyšetrenie len jedného tkaniva je problém všetkých metód, ale v prípade karyotypu je výber vhodného tkaniva vo väčšej miere obmedzený na deliace sa bunky. Napr. ster z bukálnej sliznice je možný vyšetriť len za pomoci metódy FISH pretože ide o odumreté bunky, ktoré sa už nebudú deliť. Ďalšou bariérou záchytu mozaiky prostredníctvom cytogenetickej analýzy je, že za normálnych okolností sa skúma iba jedno tkanivo, zatiaľ čo mozaiky sa môžu vyskytovať v inom tkanive.

Karyotyp je považovaný za "zlatý štandard" na detekciu mikroskopických chromozómových aberácií. Ale patrí k nemu množstvo nevýhod:

1. kultivácia buniek trvá 2 - 10 dní;
2. rozlíšenie karyotypu je obmedzené na 5 – 10 megabáz v závislosti od:
 - a. polohy v genóme,
 - b. kvality chromozómového preparátu,
 - c. schopnosti a skúsenosti cytogenetika;
3. závisí od kvality spracovania, farbenia aj od rozlišovacej schopnosti mikroskopu;
4. mnohé faktory, vrátane zlyhania bunkovej kultúry, selektívny rast abnormálnych alebo normálnych buniek, zlá morfológia chromozómov a subjektívna chyba technikov, by mohli ovplyvniť mieru úspešnosti alebo presnosť konvenčného karyotypovania (MENASHA *et al.* 2005).

2.7.3 FISH

Zavedením fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) sa umožnila detekcia submikroskopických chromozómových aberácií. Dokáže merať vyvážené a nevyvážené genómové prestavby. Vo väčšine prípadov nie je závislá od metafáznych chromozómov a je široko používaná v klinickej diagnostike. FISH umožňuje analýzu veľkého počtu interfáznych buniek pre CNV s veľkosťou až 50 kb. Identifikácia mozaiky je možná na základe počítania vizualizovaných buniek, pri diagnostike mozaiky sa vyžaduje počítanie stovky buniek.

V prípade metódy FISH sa značené DNA sondy hybridizujú s jadrami alebo metafáznymi chromozómami (mitózami) na detekciu prítomnosti, počtu a rozmiestnenia malých (submikroskopických) oblastí chromozómov. FISH sa bežne používa na identifikáciu, potvrdenie a charakterizáciu chromozómových aberácií (SPEICHER A CARTER 2005). FISH, ktorá využíva hybridizáciu špecificky značených sond na cieľovú DNA v interfáznych bunkách (jadrách), môže prekonať obmedzenia, ktoré sa vyskytli pri klasických cytogenetických metódach. Táto technika má významný prínos z hľadiska detekcie chromozómového

mozaicizmu, pretože v krátkom časovom intervale je možné analyzovať minimálne 100 buniek (KAUR *et al.* 2004).

Účinnosť detekcie interfáznej FISH závisí od špecifickosti a citlivosti použitých sond. Centromérne sondy sú najvhodnejšie a široko používané sondy na detekciu aneuploidie pomocou interfáznej FISH. Tieto sondy sa hybridizujú s vysoko repetitívnymi sekvenciami DNA, ktoré sú orientované v centromérnych oblastiach ľudských chromozómov a produkujú silné a intenzívne fluorescenčné signály na ich špecifických cieľových miestach.

Analýza FISH s použitím sondy na centroméry X a Y poskytuje citlivé, špecifické, rýchle a informatívne prostriedky na identifikáciu nízkofrekvenčnej mozaiky aneuploidií chromozómov X a Y u pacientov. Hoci analýza 200 buniek poskytuje úroveň spoľahlivosti 95% pri detekcii bunkovej línie vyskytujúcej sa v 2 %, mali by sa vyhodnotiť ďalšie bunky v prípade, ak sú výsledky nejednoznačné (HOOK 1977). Analýza 500 buniek by teoreticky identifikovala 1% mozaicizmus s 99% spoľahlivosťou.

Jednou z hlavných výhod FISH oproti klasickej cytogenetickej analýzy je schopnosť identifikácie v nedeliacich sa a deliacich sa bunkách – použitie dvomi spôsobmi: (1) detekcia celkových chromozómových zmien a (2) štrukturálne aberácie zahŕňajúce amplifikáciu, deléciu alebo translokáciu špecifických oblastí chromozómu.

2.7.4 Analýza chromozómov pomocou techniky mikroarray (CMA)

Klasická cytogenetická analýza a FISH, má potenciál pri identifikácii mozaiky na úrovni chromozómov, ak sa testuje dostatočné množstvo buniek zo správneho tkaniva (MILLER *et al.* 2010). Analýza sa uskutočňuje na jednotlivých bunkách v metafáze a pri pohľade na chromozómy ako celok, ale nie na úrovni sekvencie DNA. Tieto techniky sa stále používajú na klinike, ale pomaly sa nahrádzajú analýzou CMA. Na rozdiel od bežných cytogenetických techník môže CMA detekovať CNV a nevyžaduje, aby boli bunky v štádiu špecifického bunkového cyklu. CMA sa vo všeobecnosti rozdeľuje na komparatívnu genomovú hybridizáciu (array CGH) a analýzu jednonukleotidových polymorfizmov (SNP). Zatiaľ čo array CGH porovnáva dve nezávislé vzorky, SNP array vyžaduje iba jednu vzorku, ktorá sa porovnáva s referenčnou vzorkou *in silico* na základe stoviek kontrolných vzoriek (PINTO *et al.* 2011). Štúdie ukazujú, že array CGH dokáže detekovať mozaiky s hladinou 10-20%, zatiaľ čo SNP array je citlivejšia a môže odhaliť mozaiky s hladinou pod 5 % (CONLIN *et al.*

2010). Metódy CMA však nedokážu odhaliť balancované prestavby (MILLER *et al.* 2010). Okrem toho sú pri analýzach pomocou CMA zahrnuté iba vybrané SNP markery s rozmermi približne 1 kb vzdialené od seba, takže nie sú detekované jednonukleotidové varianty (SNV) a indely ležiace mimo markerov.

Prístup CMA využíva extrahovanú DNA, ktorá predstavuje skutočný stav tkaniva, prekonáva veľa obmedzení bežnej cytogenetickej analýzy, zvyšuje úspešnosť vyšetrenia a zlepšuje čas analýzy a detekciu submikroskopických chromozomálnych aberácií. Môže poskytnúť komplexné a podrobné výsledky pri vysokom rozlíšení na úrovni celého genómu (BENKHALIFA *et al.* 2005).

2.7.5 Array CGH

V roku 1992 bola zavedená technológia umožňujúca celogenómovú detekciu aberácií počtu kópií s názvom komparatívna genómová hybridizácia (CGH) (KALLIONIEMI *et al.* 1992). Na bežné zistenie zmien v diagnostickej praxi je potrebná efektívna a robustná technológia, ktorá umožňuje kontrolu celého genómu pre detekciu aberácií počtu kópií s rozlíšením nad úrovňou svetelného mikroskopu (5-10 Mb). Technológia CGH založená na array meria submikroskopické CNV a umožňuje mapovanie týchto zmien na úrovni genómu s vysokým rozlíšením (SOLINAS-TOLDO *et al.* 1997a, PINKEL *et al.* 1998a, SNIJDERS *et al.* 2001).

V prípade CGH sa vyšetované a referenčné DNA značia rôznymi fluorochrómmi a potom sa ko-hybridizujú na normálne metafázové chromozómy. Po hybridizácii sa chromozómy skenujú na meranie intenzity fluorescencie pozdĺž dĺžky normálnych chromozómov, aby sa zistili rozdiely v pomeroch intenzity, ktoré následne určujú genómovú nerovnováhu. Intenzita fluorescencie hybridizovanej (vyšetrovanej) DNA bude všade rovnomerná, pokiaľ vyšetovaná DNA nemá v určitých regiónoch zisky alebo straty počtu kópií. V regiónoch so získaným počtom kópií sa intenzita zvýši. Podobne pri strate počtu kópií sa intenzita zníži. Očakáva sa, že zmeny intenzity budú lineárne súvisieť s CNV. CNV sa dajú spoľahlivejšie stanoviť meraním pomeru fluorescenčnej intenzity vyšetrovanej DNA k fluorescencii normálnej/referenčnej DNA. Jej hlavné nevýhody spočívajú v tom, že veľkosť najmenej možnej zistenej oblasti zisku alebo straty počtu kópií je relatívne veľká (~ 10 Mb), presnosť mapovania takýchto oblastí je pomerne nízka a vyšetrenie je technicky náročné.

Celkovo je rozlíšenie, pri ktorom je možné pomocou týchto techník zistiť CNV, len o niečo vyššie v porovnaní s klasickým karyotypom a všetky vyšetrenia sú pracné a časovo náročné. Tieto nedostatky boli hlavnou motiváciou pre vývoj CGH založeného na array. Hlavnou výhodou array CGH techniky je jej schopnosť merať CNV v celom genóme v rámci jedného vyšetrenia bez potreby získavania metafáznych buniek zo vzorky tkaniva.

Nahradením metafáznych chromozómov mapovanými DNA sekvenciami alebo oligonukleotidmi usporiadanými na sklíčkach ako hybridizačných sond by sa dali tieto obmedzenia prekonať. Po hybridizácii rozdielne značených vyšetovaných a referenčných (genómových) DNA s cieľovými sekvenciami na array sa sklíčko skenuje na meranie intenzity fluorescencie na každom array. Normalizovaný fluorescenčný pomer pre vyšetované a referenčné DNA sa potom vynesie do pozície sekvencie pozdĺž chromozómov. Zisky alebo straty v genóme sú identifikované hodnotami zvýšenými alebo zníženými z pomeru 1: 1 (\log_2 hodnota 0). Rozlíšenie detekcie závisí iba od veľkosti a počtu sond na array a ich pozície (ich distribúcia) na genóme. Táto metóda bola prvýkrát opísaná v roku 1997 a je nazývaná matrix alebo array CGH (SOLINAS-TOLDO *et al.* 1997, PINKEL *et al.* 1998). Array CGH sa najprv používala na analýzu počtu kópií v nádoroch s cieľom identifikovať gény zúčastňujúce sa na patogenéze kanálikov (CAI *et al.* 2002, ALBERTSON A PINKEL 2003). Neskôr sa však táto metóda optimalizovala a aplikovala na odhaľovanie nevyvážených preskupení (VISSERS *et al.* 2003, SHAW-SMITH *et al.* 2004).

Využitie diagnostického vyšetrenia založeného na array CGH má niekoľko výhod oproti použitiu cytogenetiky:

1. na prípravu DNA sa používa celá krv, čo vedie k analýze viacerých bunkových typov bez kultúrnych artefaktov;
2. analyzujú sa rôzne typy buniek;
3. bunky sa analyzujú vo všetkých fázach bunkového cyklu, nielen v metafáze;
4. vzorky nevyžadujú kultiváciu, čo by samo o sebe mohlo spôsobiť mutácie.

Nevýhody array CGH:

1. je možné analyzovať viacero buniek súčasne, tým pádom nemusí aberantné línie mozaiky zachytiť;

2. array CGH nedokáže zachytiť balancované prestavby, bodové mutácie, nízkofrekvenčné mozaiky a ďalej aberácie menšie než 200 kb v niektorých oblastiach.

2.7.6 SNP array

V súčasnosti aplikácia CMA, ako sú jednonukleotidové polymorfizmy (SNP) založené na array, zvyšuje mieru detekcie genómových aberácií u jedincov s vývojovými poruchami alebo vrodenými anomáliami. SNP array má výhodu, ktorou je detekcia homozygotnosti, ktorá môže predstavovať izodizomickú UPD. V prípade *trisomy rescue* môže byť identifikovaná asociovaná heterodizomická UPD aj vtedy, keď je sprevádzaná oblasťou izodizómie (MILLER *et al.* 2010). Táto jedinečná vlastnosť robí SNP array zvlášť užitočnou pri určovaní pôvodu, mapovaní rekombinantných miest a presnej kvantifikácii mozaiky. Nielen načasovanie nondisjunkcie má vážny vplyv na embryonálny vývoj a tvorbu UPD v dizomickej línii, ale aj vedomosť o tom, či nondisjunkcia vznikla pri meióze alebo mitóze má klinické dôsledky na predpovedanie rizika recidívy trizómie (DE SOUZA *et al.* 2009).

SNP array predstavuje rýchlu a citlivú metódu na kvantifikáciu somatickej mozaiky v celom genóme (MARKELLO *et al.* 2012). Použitie SNP array umožňuje detekciu mozaiky, ktorá má frekvenciu 5% (CONLIN *et al.* 2012), čo by zvyčajne vyžadovalo počítanie približne 100 metafáznych buniek.

Celogenómové SNP array analýzy využívajú data o intenzite v kombinácii s údajmi genotypovania, ktoré poskytujú prostriedky s vysokým rozlíšením na diagnostiku genómových aberácií, ktoré spôsobujú klinické ochorenia. Tým môže byť mozaika lepšie detekovaná a matematicky odhadnutá mozaika s nízkym percentom výskytu (CONLIN *et al.* 2010). Použitie tejto celogenómovej analýzy umožňuje vyhodnotenie počtu kópií na detekciu ziskov a strát v mozaike a izodizomickej UPD. V prípade heterodizmov sa môže vyhodnotiť diagnóza UPD pomocou SNP array, v prípade že sa analyzuje parentálna DNA.

Analýza pomocou SNP array poskytuje niekoľko výhod detekcie mozaiky v porovnaní s analýzou chromozómov:

1. je možné hľadať veľké množstvo buniek naraz, pretože DNA je získaná z mnohých buniek;

2. sú analyzované ako interfázové, tak aj bunky v metafáze;
3. celogenómové SNP array s vysokým rozlíšením v kombinácii so SNP a oligonukleotidovými sondami nielen poskytujú informáciu o počte kópií, ale tiež identifikujú triploidiu, stratu heterozygotnosti, UPD a mozaicizmus s nízkou frekvenciou.

2.7.7 NGS

Od prvej úspešnej aplikácie NGS pri objavovaní genetickej príčiny Millerovho syndrómu v roku 2010 (NG *et al.* 2010) bolo vytvorených mnoho ďalších ochorení/gén asociácií (LINDHURST *et al.* 2011, LEE *et al.* 2012, LINDHURST *et al.* 2012, GIBSON *et al.* 2012, KUREK *et al.* 2012, SHIRLEY *et al.* 2013). Táto moderná technika umožňuje detekciu malých genetických zmien, ako sú SNV a indely v celom exóme alebo genóme a s oveľa vyššou hĺbkou sekvenovania. Odkedy NGS umožňuje manuálnu kontrolu každého čítania v digitálnom formáte môže sa použiť na identifikáciu somatickej mozaiky.

Somatická mozaika, najmä na nízkych úrovniach, sa často nedetekuje Sangerovým sekvenovaním, ktoré zostáva štandardnou sekvenačnou technológiou na skrining jedného alebo niekoľkých génov. Je to preto, že na rozdiel od digitálneho výstupu z NGS technológií sú výsledky Sangerovho sekvenovania reprezentované ako priemer signálov z elektroferogramu a mozaicizmus, ak je viditeľný, sa prejaví ako znížený vrchol, ktorý sa dá ťažko odlíšiť od šumu pozadia (ROHLIN *et al.* 2009).

NGS je obzvlášť užitočné na vyšetovanie exómov alebo genómov jedincov s definovanou klinickou diagnózou, najmä keď už boli vyšetované známe gény pre poruchu. Somatická mozaika je považovaná za jeden z hlavných prispievateľov k tomuto stavu. Príklad, ktorý to ilustruje bol publikovaný na tuberóznej skleróze (TSC). TSC je autozomálne dominantná porucha spôsobená známymi mutáciami v génoch *TSC1* a *TSC2*. Avšak u 10 až 15 % pacientov sa nevyskytli práve takéto mutácie. V 95 % zachytených oblastiach a viac ako 200 čítaní NGS štúdia identifikovala dve somatické mutácie v géne *TSC2* v 5 % čítaní u nepříbuzných pacientov, čím sa preukázala úloha mozaiky v TSC (QIN *et al.* 2010).

Navyše je NGS užitočné pri identifikácii mutácií, ktoré sú základom rakoviny (KOBOLDT *et al.* 2013). Rakovina je stavom mozaiky v dvoch rovinách:

1. mozaika je dosiahnutá akumuláciou mutácií, kedy prenášajú mutantné bunky výhodu prežitia a spôsobujú vznik nádorov (KNUDSON 2001);
2. každá mutantná bunka akumuluje ďalšie genetické zmeny, kvôli nedostatku kontrolných bodov bunkového cyklu a mechanizmov opravy DNA, čím vytvára mozaiky v nádoroch (heterogénnosť nádoru) (WOODRUFF 1983).

Viaceré NGS štúdie úspešne identifikovali tieto dva typy mozaiky, čo vedie k lepšiemu pochopeniu rôznych molekulových subtypov rakoviny a umožňuje cieľnú terapiu každého špecifického nádoru a/alebo pacienta (MARUSYK *et al.* 2012).

Celkovo digitálna povaha analýzy NGS umožňuje citlivejšiu a presnejšiu detekciu mozaiky, najmä na nízkych úrovniach, zatiaľ čo Sangerovo sekvenovanie zostáva nákladovo neefektívnou metódou validácie (ROHLIN *et al.* 2009).

2.8 Problémy pri identifikácii mozaicizmu

2.8.1 Úskalia pri detekcii mozaiky s nízkou mierou aneuploidie

Nízky počet živonarodených prípadov autozomálnej monozómie môže nielen odrážať vplyv na životaschopnosť, ale aj zlyhanie detekcie. Mozaicizmus možno zistiť klasickými cytogenetickými metódami, ak by sa skúmal dostatočne veľký počet buniek. Súčasnú, medzinárodne akceptované praktické usmernenia pre klinickú cytogenetiku uvádzajú, že by sa malo skontrolovať minimálne 30 metafáz (HOOK 1977). Ďalším komplikujúcim faktorom je možnosť prítomnosti selekcie proti monozomickým bunkám počas kultivácie. Navyše monozómový mozaicizmus nízkej kvality je nedetekovateľný pomocou techník založených na mikroskopických technológiách (CHEUNG *et al.* 2007, CONLIN *et al.* 2010, BRUNO *et al.* 2011). Odborné smernice pre používanie array CGH odporúčajú, aby laboratória boli schopné detekovať 30% mozaicizmus v rutínnej diagnostike (VERMEESCH *et al.* 2012). Pre SNP array je detekcia možná, ak existuje 7-8 % monozomických buniek (CONLIN *et al.* 2010, BRUNO *et al.* 2011).

2.8.2 Obmedzenia pri identifikácii mozaicizmu

Napriek tomu, že aplikácia vysoko výkonných technológií (NGS) pri detekcii mozaiky je úspešná, stále sa pri nich vyskytujú určité obmedzenia. Detekcia mozaiky vyžaduje hlboké sekvenovanie, často s viac ako so 100 násobným pokrytím v porovnaní s priemerným 30 násobným pokrytím, ktoré sa používa pri rutinnom sekvenovaní celého exómu (LINDHURST *et al.* 2012, SHIRLEY *et al.* 2013). V skutočnosti sa stávajú čoraz populárnejšími, keďže dosahujú pokrytie základňou nad 1000 násobok, čo umožňuje detekciu nižších úrovní mozaiky (COHEN *et al.* 2014). Tieto metódy sú už dnes aplikovateľné v klinickej diagnóze.

Ďalšia otázka, ktorú je potrebné zvážiť sú skresľujúce zistenia. Percento mozaicizmu sa pravdepodobne bude líšiť medzi tkanivami. V súčasnej praxi sa zvyčajne testujú vzorky krvi a/alebo slín jednoducho preto, lebo sú ľahšie dostupné. Hladina mozaiky v krvi pravdepodobne neodrzkadlí hladinu v ostatných tkanivách (PAPAVASSILIOU *et al.* 2009) a môže viesť k falošne negatívnym výsledkom (LEE *et al.* 2012). Dobrým príkladom je mozaika trizómie 21: pri narodení sú leukocyty, ktoré majú navyše chromozóm 21 pozorované vo vyššom množstve ako neskôr v živote (TAYSI *et al.* 1970). Je to spôsobené tým, že aneuploidné bunky majú problémy s prechodom cez kontrolné body mitotických buniek; tieto bunky často podstupujú apoptózu a kvôli vysokej rýchlosti obratu v periférnych bunkách dochádza v dospelosti k takmer 100 % normálnym leukocytom (WILLIAMS *et al.* 2008). Avšak v iných tkanivách, kde rýchlosť obratu nie je taká vysoká, množstvo trizómie 21 zostáva rovnaké ako pri narodení, takže prítomnosť trizómie 21 v týchto tkanivách je pravdepodobnejšia ako príčina pozorovaného fenotypu (PAPAVASSILIOU *et al.* 2009, TAYSI *et al.* 1970). Preto je dôležité vyšetriť viac ako jedno tkanivo, a najmä akékoľvek postihnuté tkanivá, ktoré sú k dispozícii, aby sa získal lepší prehľad o úrovniach mozaiky (NAZARENKO *et al.* 1999).

2.8.3 Problémy pri porovnávaní úrovni mozaiky s pozorovaným fenotypom

Vzhľadom k tomu, že mozaika sa stala čoraz častejším pozorovaným javom, vyskytlo sa veľa problémov, ktorým musia lekári čeliť, aby mohli liečiť a poradiť pacientom správne. V prvom rade bol mozaicizmus v rámci populácie podceňovaný. Jednotlivci akumulujú počas svojho života mutácie, ktoré nemusia mať fenotypový účinok. Takže by sa očakávalo, že

nájde mozaicizmus u fenotypicky normálnych jedincov (CHENG A CHO 2012). Podobne, strata chromozómu X je pozorovaná u normálnych žien, čo je spôsobené vekom (RUSSELL *et al.* 2007) a neznamena, že mať 45,X bunky v nízkom zastúpení značí TS. Identifikácia mozaiky nesúvisí s príčinou skúmaného fenotypu. Navyše percento mozaicizmu nemusí nutne korelovať so závažnosťou fenotypu, pretože mozaicizmus môže mať väčší vplyv na fenotyp, ak je exprimovaný v jednom tkanive než by bolo v prípade druhého (NAZARENKO *et al.* 1999). Okrem toho, ak mutantné bunky nemajú rastovú výhodu oproti normálnym bunkám, ako v prípade trizómie 21 (2.8.2 Obmedzenia pri identifikácii mozaicizmu), môžeme vidieť znížené percento detekovanej mozaiky spojenej so závažnejším fenotypom (TAYSI *et al.* 1970, PAPAVALASSILOU *et al.* 2009). To súvisí so skutočnosťou, že somatická mutácia vyskytujúca sa skôr počas vývoja pravdepodobne bude mať väčší vplyv na pozorovaný fenotyp (SHIRLEY *et al.* 2013). Preto sa nevyšetruje každá bunka z každého tkaniva v tele, nie je možné presne kvantifikovať percento mozaiky u jedinca a aj keby to bolo možné, nebolo by to dostačujúce na odvodenie očakávaného fenotypu.

3 Ciele práce

- Zistiť detekčný limit pre záchyt mozaiky metódami ako sú FISH, array CGH. Výsledky budú navzájom medzi sebou porovnávané
- Zistiť faktory, ktoré ovplyvňujú možnosť záchytu mozaiky
- Optimalizácia metód na detekciu mozaicizmu a výber najvhodnejšej metódy pre záchyt mozaiky
- Stanovenie vplyvu voľby referenčnej vzorky na detekčnú schopnosť metódy array CGH v prípade mozaik aneuploidie gonozómov

4 Materiál a metódy

Vyšetrenia boli prevádzané podľa štandardných operačných postupov Ústavu biologie a lekárskej genetiky FN Motol (IISOP_8UBLG_16/2013, IISOP_8UBLG_17/2013, IISOP_8UBLG_03/2015) a príslušných laboratórnych protokolov.

4.1 Súbor pacientov

Každý pacient bol indikovaný k molekulárne cytogenetickej analýze buď metódou karyotypovania, FISH alebo array CGH na Ústave lekárskej biologie a genetiky 2. lekárskej fakulty a fakultní nemocnice Motol (ÚBLG). Vyšetrení pacienti sú zahrnutých v Tabuľka 2, v ktorej je celkom 45 pacientov. Tabuľka je rozdelená na mozaiky s aberáciami gonozómov a s aberáciami autozómov. Z Tabuľka 2 je možné vidieť, že sa jednalo o 26 prípadov pacientov s mozaikou gonozómov a o 19 pacientov s mozaikami autozómov. Z toho je 30 žien a 15 mužov vo veku 0 – 56 rokov.

Zo všetkých pacientov má 45 pacientov vyšetrenie prevádzané zo vzorky periférnej krvi, z tohto materiálu má 43 pacientov urobený karyotyp, 39 pacientov je vyšetrených metódou FISH a 15 pacientov má array CGH. Ďalším materiálom, ktorý bol použitý na vyšetrenie chromozómových aberácií bol bukálny ster z ústnej sliznice. Z čoho bolo vyšetrených 9 pacientov metódou FISH. K použitým materiálom patrili aj kožné fibroblasty, pričom 1 pacient má z tohto materiálu karyotyp a 2 pacienti majú urobenú metódu FISH. Samostatne som analyzovala 34 pacientov, z toho som uskutočnila 19 vyšetrení karyotypom, 19 pacientov metódou FISH a 5 pacientov pomocou array CGH. Ostatné výsledky boli použité z databázy ÚBLG. Pripravila som a analyzovala samostatne všetky výsledky arteficiálne vyrobených mozaik.

Tabuľka 2. Súbor všetkých pacientov

Mozaiky gonozómov				
Poradie	Pohlavie	Vek (roky)	Indikácia	Číslo pacienta
1	Ž	2	Mozaika Turnerovho syndrómu	G1
2	Ž	0	Mozaika Turnerovho syndrómu	G2
3	Ž	33	Neplodnosť, oligomenorea	G3
4	Ž	6	Malý vzrast, faciálna stigmatizácia	G4
5	Ž	5	Malý vzrast	G5
6	Ž	53	Otoskleróza, progresívna porucha sluchu, 1x trombóza, 1x SA	G6
7	Ž	29	Poruchy reprodukcie, neplodnosť	G7
8	Ž	37	Prekoncepčná starostlivosť, u syna autizmus, 2x SA v anamnéze	G8
9	Ž	14	Gonozomálny mozaicizmus	G9
10	Ž	43	Otoskleróza	G10
11	Ž	38	Gravidita - u syna mikrocefália	G11
12	Ž	39	Poruchy reprodukcie, neplodnosť	G12
13	Ž	48	45,XX,t(13;14)(q10;q10) u dcéry	G13
14	Ž	43	Neplodnosť	G14
15	Ž	34	Nález na karyotype: 45,X[4]/47,XXX[3]/46,XX[43]	G15
16	Ž	22	Mozaika Turnerovho syndrómu, malý vzrast	G16
17	Ž	36	Nález na karyotype: 45,X[3]/47,XXX[1]/46,XX[56]	G17
18	Ž	8	Prenatálne preukázaný Turnerov syndróm	G18
19	Ž	40	Poruchy reprodukcie, infertilita, polycystické ovária, nepočujúca	G19
20	M	12	PAS - Aspergerov syndróm, nevyvážený kognitívny profil	G20
21	M	2	Atrézia pažeráka	G21
22	Ž	56	Poruchy reprodukcie	G22
23	Ž	12	Turnerov syndróm	G23
24	Ž	31	M. Down v rodine	G24
25	Ž	7	Malý vzrast	G25
26	M	1	45,X/46,Xder(Y) z vyšetrenia fetálnej krvi	G26
Mozaiky autozómov				
Poradie	Pohlavie	Vek (roky)	Indikácia	Číslo pacienta
27	Ž	4	Rázštep podnebia, hypotónia, VCC, PMR	A1
28	M	35	Autistické prejavy, epilepsia, stigmatizácia, vysoká postava, kladivkovité prsty na nohách	A2
29	Ž	0	Gravidita (nález na UZ), u probandky - malý vzrast, mikrocefália, brachydaktylia, stigmatizácia	A3
30	Ž	7	PMR nejasná etiológia, malý vzrast, obezita, stigmatizácia	A4
31	M	7	Agénéza corpus callosum, VVV CNS, motýľovité stavce	A5
32	M	1	Anorektálna atrézia; preimplantačné genetické testovanie - mozaika trizómie chromozómu 14	A6
33	Ž	12	Porucha autistického spektra, vývojová dysfázia, nerovnomerný PMV	A7
34	M	8	PAS – DA/SF, komorbidná hyperkinetická porucha, MR, dysmorfia, dystopická oblička	A8
35	Ž	42	Gravidita, UZ nález u plodu, hydronefróza	A9
36	M	10	45,X (80 %)/46,XY (20 %), 1x zachytená 17 % mozaika M. Down	A10
37	M	9	Obmedzený nárast zubov	A11
38	Ž	22	Neurofibromatosis von Recklinghausen NF 1, marker chromozóm	A12
39	M	11	Autistické rysy, porucha správania	A13
40	M	7	Mozaika marker chromozómu 5p15.33 - triplikácia	A14
41	M	51	Neurofibromatóza 2. typu	A15
42	M	12	Malý vzrast, makrocefália, vrodená srdcová vada	A16
43	M	6	Vrodená sluchová vada	A17
44	M	20	PMR, obezita	A18
45	Ž	5	Mongoloidná facies, mozaika M.Down	A19

M – muž; Ž – žena; SA – spontánny potrat; PAS – poruchy autistického spektra; VCC – vrodené srdcové vady; PMR – psychomotorická retardácia; UZ – ultrazvuk; VVV – vrodená vývojová vada; CNS – centrálna nervová sústava; PMV – psychomotorický vývoj; MR – mentálna retardácia

4.2 Arteficiálne vyrobené mozaiky

Bolo vytvorených 5 arteficiálnych mozaik (A-E) zmiešaním dvoch suspenzií od náhodne vybranej zdravej ženy (46,XX) a zdravého muža (46,XY) s rovnakým mitotickým indexom. Mitotický index buniek bol počítaný podľa zdroja (GUNETTI *et al.* 2012). Následne sa počítala hustota buniek v plastovej počítacej dosičke Fast - Read 102. Riedenia sa pripravili napodobňovaním 10%, 20%, 25%, 50%, 85% hladín mozaiky, ktoré naznačuje Tabuľka 3.

Tabuľka 3. Arteficiálne vyrobené mozaiky (A-E) namiešané v danom pomere

Typ mozaiky	% pomer mozaiky
Arteficiálna mozaika A	25% XX a 75% XY
Arteficiálna mozaika B	10% XX a 90% XY
Arteficiálna mozaika C	20% XX a 80% XY
Arteficiálna mozaika D	85% XX a 15% XY
Arteficiálna mozaika E	50% XX a 50% XY

4.3 Sondy pre analýzu FISH

Tabuľka 4. Zoznam všetkých použitých sond. Zvýraznenie červenou farbou značí červený fluorochróm, modrou (modrý fluorochróm), zelenou (zelený fluorochróm). A.m. – arteficiálne vyrobená mozaika.

Číslo pacienta	Sonda	Firma
G1, G2, G3, G5, G4, G6, G7, G8, G9, G10, G11, G12, G13, G14, G15, G16, G17, G18, G19, G20, G22, G24, G25, G26, A16, a.m.E	SHOX (SHOX , Xcen , Yqh)	Cytocell
G4, G25	FAST FISH X, Y a 18 (Xcen , Ycen , 18cen)	Cytocell
G9, G26	SRY (SRY , Yqh , Xcen)	Cytocell
G23	Centromerická sonda X (Xcen)	Cytocell
G26, a.m. A,B,C,D,E	Centromerická sonda XY (Xcen , Ycen)	Cytocell
A1, A5	Centromerická sonda 8 (8cen)	Cytocell
A2	Subtelomerické sondy 2pter , 2qter	Cytocell
A4	Centromerické sondy 1 (1cen), 15 (15cen), 19 (19cen)	Cytocell
A6	Centromerické sondy 14 a 22 (14/22cen), 15 (15cen)	Cytocell
A7	Centromerická sonda 3 (3cen)	Cytocell
A8	Centromerická sonda 8 (8cen), subtelomerická sonda 8qter	Cytocell
A9	Lokus špecifickej sondy 7q11.22 , 7q11.23 (BlueGnome), subtelomerické sondy 7pter , 7qter , centromerická sonda 7 (7cen) (Cytocell)	BlueGnome/Cytocell
A10	Subtelomerické sondy XYpter , 21qter , sonda SRY (SRY , Yqh , Xcen)	Cytocell
A14	Sonda Cri-du-chat a SOTOS (5p15.31 , 5p15.2 , 5q35)	Cytocell
A15	Sonda DiGeorge (22q11.2 , 22q13.3)	Cytocell
A16	Subtelomerické sondy 18pter , 18qter	Cytocell
A17	Subtelomerické sondy 3pter , 3qter	Cytocell
A18	Subtelomerické sondy 5pter , 5qter	Cytocell
A19	Lokus špecifickej sondy 13q14.2 , 21q22.13	BlueGnome
a.m. A,B,C,E	Centromerická sonda X (Xcen)	Cytocell
a.m. D	Lokus špecifickej sondy Xq27.1	BlueGnome

4.4 Kultivácia buniek pre cytogenetické a molekulárne vyšetrenie

4.4.1 Prístroje na kultiváciu buniek

Tabuľka 5. Prístroje na kultiváciu buniek používané na ÚBLG

Názov prístroja	Výrobca
Laminárny box Biohazard BIOAIR TOPSAFE 1.2	BioAir, Taliansko
Laminárny box Biohazard BIO II Telstar	Telstar industrial, Španielsko
Inverzný optický mikroskop Telaval s objektívom 10x	Carl Zeiss spol, ČR
Preparačný mikroskop Technival s objektívom 10x	Carl Zeiss spol, ČR
CO ₂ inkubátor Forma Scientific	Thermo orma, USA
CO ₂ inkubátor SalvisLAB	SalvisLab, Švajčiarsko
Centrifúga NF-800R Nüve (ø rotoru – 25,5 cm)	Nüve Sanayi Malzemeleri, Turecko

4.4.2 Reagencie a roztoky na kultiváciu buniek

Tabuľka 6. Reagencie na kultiváciu buniek používané na ÚBLG

Názov reencie	Výrobca
Kultivačné médium AmnioMax™ Gibco© (AmnioMax™ C-100 Basal Medium + AmnioMax™ C-100 Supplement a obohatené o antibiotikum gentamicín (20 mg/ml) o objeme 1 ml na 1 liter média)	Life Technologies, USA
Preparačné médium MEM Gibco©	Life Technologies, USA
Kultivačné médium RPMI Gibco© s AmnioMax™ (1x koncentrované médium RPMI Gibco© s AmnioMax™ o objeme 130 ml bolo doplnené o 19 ml fetálneho bovinného séra a 0,15 ml gentamicínu (20 mg/ml).	Life Technologies, USA
Sterilný gentamycín	SANDOS, Slovinsko
Sterilný fytohematoglutinín Gibco©	Life Technologies, USA

Sterilný heparín	Zentiva Group, Česká republika
KaryoMAX® Colcemid® Solution Gibco® o koncentrácii 1 µg/ml (riedený PBS na koncentráciu 10 µg/1 ml)	Life Technologies, USA
Sterilný versen (EDTA; „Ethylendiaminetetraacetid“)	Lékárna FN Motol
Sterilný trypsín 2,5% Gibco®	Life Technologies, USA

- roztok versen-trypsínu sa nariedi zmiešaním 6 ml trypsínu 2,5% Gibco spolu so 400 ml sterilného versenu a je zahriaty na 37 °C

Kultivácia tkanív (fibroblasty):

1. odoberie sa tkanivo do skúmavky s preparačným médiom MEM (*minimum essential medium*) a s prídavkom heparínu, tkanivo sa očistí od krvných zrazenín a tukov v preparačnom médiu MEM
2. následne po vypreparovaní sa tkanivo fragmentuje, rozruší sa a v kultivačnom médiu sa ďalej kultivuje
3. materiál sa rozdelí do 2 kultivačných flaštičiek s veľkosťou plochy 25 cm², pričom v každej sa nachádzajú 2 ml kultivačného média AmnioMax™, závit flaštičky sa necháva pootvorený
4. kultivácia sa robí v dvoch inkubátoroch pri teplote 37 °C a 5% koncentrácii CO₂
5. následne po pár dňoch od začiatku kultivácie, v prípade, že farba média (lososová) naznačuje hodnotu pH 7,2 až 7,4, kultivačné médium sa môže doplniť do objemu 4 až 5 ml a môžu sa utiahnuť zátky
6. piaty až siedmy deň kultivácie sa pod inverzným mikroskopom sleduje rast kolónií a urobí sa kompletná výmena kultivačného média
7. rast kolónií sa denne kontroluje a v prípade hustého pokrytia dna misky sa spraví pasážovanie, kedy bunky sú pomocou roztoku versen-trypsínu uvoľnené do suspenzie a rozdelené do dvoch alebo viacerých flaštičiek

8. hneď ako sú kolónie dostatočne narastené je kultivácia ukončená kolcemidovou blokádou, to znamená pridaním 0,1 ml kolcemidu
9. nakoniec sa miska prenesie do inkubátora na 3 hodinovú blokádu delenia, alebo sú bunky odovzdané priamo na vyšetrenie metódou array CGH

Kultivácia krvi:

1. vzorky krvi (cca 3 ml) sa odoberajú do skúmaviek s heparínom, kultúra sa zakladá po 24 hodinách
2. 1 ml heparinizovanej krvi sa dá do kultivačných flaštičiek s 10 ml média RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium*) a pridá sa 0,2 ml fytohemaglutinínu, ktorý zabezpečí proliferáciu lymfocytov
3. kultivácia trvá po dobu 72 hodín pri teplote 37 °C a 5% koncentrácii CO₂
4. ukončenie kultivácie sa uskutočňuje kolcemidovou blokádou (pridaním 0,1 ml nariadeného roztoku kolcemidu)

Kultivácia bukálneho steru:

Vzorka bukálneho steru sa po odbere natrie na podložné sklo a pokvapká fixačným roztokom (roztok metanolu a kyseliny octovej v pomere 3: 1) alebo sa odberová tyčinka premyje priamo vo fixačnom roztoku, ktorý posluží k príprave preparátu.

4.5 Príprava preparátov a farbenie G-pruhovaním pre vyšetrenie karyotypom

4.5.1 Prístroje na prípravu preparátov a farbenie G-pruhovaním pre vyšetrenie karyotypom

Tabuľka 7. Prístroje na prípravu preparátov a na farbenie G-pruhovaním pre vyšetrenie karyotypom používané na ÚBLG

Názov prístroja	Výrobca
Laminárny box s odsávaním BioAir- Aura Mini (s UV)	Bioair Division - Euroclone SpA, Taliansko
Digestor chemická Cruma 870 GA	Cruma material de laboratorio, Španielsko
Centrifuga Nüve NF 800	Nüve Sanayi Malzemelery, Turecko
Centrifúga Megafuge 2. OR Heraeus (ø rotora – 18,8 cm)	Heraeus Instruments - Kaitrade, ČR
Inverzný mikroskop Meopta	Carl Zeiss, ČR
Optický mikroskop Zeiss (Axioskop) s objektívmi 10x alebo 12x alebo 16x, imerzný objektív 100x	Carl Zeiss, ČR
Optický mikroskop Leica (DMBL, DM2500, DM500) s objektívmi 10x alebo 12x alebo 16x, imerzný objektív 100x	Leica Microsystems AG MIKRO, ČR
PC s komerčným softwarom s karyotypovacím programom MetaSystems Ikaros 2011	Alogo, Česká republika

4.5.2 Reagencie a roztoky na prípravu preparátov a na farbenie G-pruhovaním pre vyšetrenie karyotypom

Tabuľka 8. Reagencie a roztoky na prípravu preparátov a na farbenie G-pruhovaním pre vyšetrenie karyotypom používané na ÚBLG

Názov reagicie	Výrobca
Sterilný versen EDTA	Lekárň FN Motol
Sterilný trypsín 2,5% Gibco©	Life Technologies, USA
Metanol	Sigma Aldrich, USA

Kyselina octová	Sigma Aldrich, USA
Eosin-methylenová modrá -Wright	Merck, Nemecko
KCl	Lekáreň FN Motol
PBS tableta (phosphate <i>buffered saline</i>)	Merck, Nemecko
Sörensenov pufor	Lekáreň FN Motol
Kultivačné médium MEM Gibco©	Life Technologies, USA
Inaktivované fetálne bovinné sérum Gibco©	Life Technologies, USA
Imerzný olej	Olympus, Japonsko

Zmesi na prípravu preparátov na farbenie G-pruhovaním pre vyšetrenie karyotypom:

- roztok versen-trypsín je pripravený zo 6 ml komerčne dodávaného 2,5% roztoku Gibco trypsínu a 400 ml versenu, ohriaty na 37 °C
- hypotonický roztok pre dlhodobé kultúry je z kultivačného média zriedeného destilovanou vodou v pomere 1: 3 v množstve 10 ml na kultúru, ohriaty na 37 °C
- fixačná zmes je pripravená zmiešaním metanolu s ľadovou kyselinou octovou v pomere 3: 1 v množstve 30 ml na kultúru, umiestnená v mrazničke
- zásobný roztok Wrightovho farbiva je pripravený v tmavej nádobe rozpustením 1,5 g komerčne dodávanej eoín-metylénovej modrej- Wright v 500 ml metanolu
- pracovný roztok Wrightovo farbiva je pripravený zmiešaním 9 ml zásobného Wrightovo roztoku s 3 ml Gurrovo pufru
- Gurrov pufor je pripravený v lekárni FN Motol rozpustením 1 tablety PBS v 1 litri vody

Príprava preparátov a farbenie G-pruhovaním pre vyšetrenie karyotypom:

Postup prípravy preparátov:

1. materiál pre uvoľnenie buniek z dna flaštičky sa preleje roztokom versen-trypsínu pri teplote 37 °C a je prenesený do centrifugačných skúmaviek (postup sa opakuje až dovtedy, kým skúmavky budú plné)
2. následne sa centrifuguje (1000 rpm, 10 min)

3. vývevou sa odsaje supernatant
4. pelet buniek je v kultivačnej flaštičke rozsuspendovaný v 2 ml hypotonického roztoku a preleje sa ich obsah do skúmaviek, pelet je resuspendovaný, na skúmavky sa umiestnia zátky
5. inkubuje sa suspenzia (37 °C, 25 min)
6. centrifuguje sa (1000 rpm, 10 min)
7. odleje sa supernatant
8. následná predfixácia pridaním 15 kvapiek fixačnej zmesi
9. centrifuguje sa (1000 rpm, 10 min)
10. postup fixácie je dvakrát zopakovaný až kým nie je supernatant čistý, dvakrát odsatie , po poslednom odsatí sa prikvapkajú 2-3 kvapky kyseliny octovej po kónus
11. inkubuje sa 30 minút pri izbovej teplote
12. skúmavky sa resuspendujú a nakvapká sa suspenzia (2-3 kvapky) na podložné sklo
13. hustota a kvalita mitóz sa hodnotí pomocou mikroskopu a suspenzie sú podľa potreby nariadené
14. dehydratuje sa horúcim vzduchom v sušičke (100 °C, 50 minút)

V prípade krvných preparátov odpadá uvoľňovanie buniek z dna kultivačných flaštičiek. Pelet buniek je rozsuspendovaný v KCl hypotónii (0,075M KCl) a prikvapáva sa niekoľko kvapiek metanoloctovej fixácie do skúmavky s hypotonickým roztokom.

Farbenie preparátov G-pruhovaním pre vyšetrenie karyotypom:

Postup farbenia preparátov:

1. chromozómy na dehydratovaných preparátoch sú natravené roztokom trypsínu a vizualizované Wrightovým farbivom

2. sklá sú ponorené do kyvety so 100 ml roztoku trypsínu (teplota 20 °C) na čas stanovený podľa posledného farbenia (upravený a vytipovaný čas farbenia a trávenia)
3. sklá sú opláchnuté v kyvete so 100 ml Sörrensonovho pufru a 0,5 ml fetálneho bovinného séra
4. sklá sú opláchnuté v ďalšej kyvete so 100 ml samotného Sörrensonovho pufru
5. vo vodorovnej polohe sú preparáty preliatie Wrightovým farbivom
6. podľa vyskúšaného času opláchnutie v destilovanej vode a vysušenie skiel na platničke

Hodnotenie preparátov - stanovenie karyotypu

Kvalitita G-pruhovania je hodnotená pomocou optického mikroskopu. V prípade nedostatočnej kvality sú upravené časy trávenia a farbenia. Vhodné mitózy sú prezerané pod 1000-násobným zväčšením za použitia imerzného objektívu. Podľa štandardného postupu je vyšetrených minimálne 20 mitóz (20 numericky, z toho aspoň 5 mitóz štrukturálne). Určuje sa morfológia a počet chromozómov. Je potreba mať jasné G-pruhovanie a pre určovanie štrukturálnych aberácií sa vyžaduje mať na chromozómoch aspoň 400 pruhov na haploidnú sadu. V prípade mozaicizmu sú prezerané ďalšie metafázy. Niekoľko mitóz z každej vzorky je nasnímaných CCD kamerou (*charge-coupled device*), uložené do počítača a pomocou komerčného programu Ikaros od firmy MetaSystems je z nich zostavený karyotyp. Výsledok karyotypu je zapísaný v súlade s platnými normami ISCN 2016 (*International System for Human Cytogenomic Nomenclature*; Medzinárodný systém pre nomenklatúru ľudskej cytogenomiky).

4.6 Príprava preparátov pre vyšetrenie metódou FISH

4.6.1 Prístroje na prípravu preparátov pre metódu FISH

Tabuľka 9. Prístroje na prípravu preparátov pre metódu FISH používané na ÚBLG

Názov prístroja
Chemický digestor Cruma 870 6A
Centrifuga Megafuge Heraeus (ø rotora – 18,8 cm)
Mikrocentrifuga Eppendorf Mini Spin 220U (ø rotora – 6 cm)
Inverzný optický mikroskop Telaval s objektívom 10x
Inkubátor Nüve EN 205

4.6.2 Reagencie a roztoky na prípravu preparátov – pre vyšetrenie metódou FISH

Tabuľka 10. Reagencie a roztoky na prípravu preparátov – pre vyšetrenie metódou FISH používané na ÚBLG

Názov reagicie	Výrobca
Sterilný versen (EDTA)	Lekáreň FN Motol
Sterilný trypsín 2,5% Gibco©	Life Technologies, USA
Kyselina octová	Sigma Aldrich, USA
Metanol	Sigma Aldrich, USA
Proteináza K (20 mg/ml)	Qiagen, Nemecko
Hypotonický roztok (0,075M KCl)	
Citrátová hypotónia (1,3 mM C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ , 71,4 mM KCl, pH 7,2-7,4)	

Zmesi na prípravu preparátov - pre vyšetrenie metódou FISH:

- roztok versen-trypsínu je nariadený z 5 ml komerčne dodávaného 2,5% trypsínu Gibco © do 400 ml versenu
- fixačná zmes je vyrobená zmiešaním metanolu s ľadovou kyselinou octovou v pomere 3: 1

Príprava preparátov - pre vyšetrenie metódou FISH

Postup pri príprave preparátov z tkanív a krvi je rovnaký ako pri príprave preparátov G-pruhovaním pre vyšetrenie karyotypom. Rozdiel je, že sa nevykonáva dehydratácia preparátov.

4.7 Vyšetrenie metódou FISH

4.7.1 Prístroje na vyšetrenie metódou FISH

Tabuľka 11. Prístroje na prípravu preparátov na vyšetrenie metódu FISH používané na ÚBLG

Názov prístroja
Mikroskop s fázovým kontrastom Meopta DN 816 Bi s objektívom 16x
Thermobrite™ StatSpin
Vodná kúpeľ Nüve BM 302
Fluorescenčný mikroskop Zeiss Axioimager.Z1 vybavený optickými filtrami, objektívy 10x, 40x, 64x a 100x a CCD kamerou
Počítač s operačným systémom Windows (min. 2000) a so softwarom Isis verzia 5.1 (Metasystems, Nemecko)

4.7.2 Reagencie a roztoky na vyšetrenie metódou FISH

Tabuľka 12. Reagencie a roztoky na vyšetrenie metódou FISH používané na ÚBLG

Názov reagentu
Roztok pufru 2x SSC
Roztok pufru 0,4x SSC
Etanol 80%, 96% a absolútny
Tween 20
Hybridizačný pufor
DAPI
Benzín (Fagron, Česká republika)

Lepidlo (Marabu, Nemecko)
Set značených sond DNA s hybridizačným pufrom a DAPI-Antifade (Cytocell, Veľká Británia)
Imerzný olej (Zeiss, Nemecko)

Zmesi na prípravu preparátov pre vyšetrenie metódou FISH:

- zásobný roztok 2x SSC (*saline sodium citrate*) je pripravený z 5 ml zásobného roztoku 20x SSC a so 45 ml destilovanej vody, napipetuje sa 150 µl roztoku Tween
- roztok 0,4x SSC z 1 ml zásobného roztoku 20x SSC a so 49 ml destilovanej vody

Postup metódy FISH:Príprava preparátu:

1. 50 ml čerstvého roztoku 2x SSC (pH 7 - 7,5)
2. preparát sa premyje na 2 minúty v roztoku 2x SSC
3. sklo sa nechá uschnúť a potom sa dá do alkoholového liehu 80% (2 min.), následne sa dá preparát do 96% alkoholu (2 min.) a nakoniec do absolútneho etanolu po dobu 2 minút
4. nechajú sa odstáť a uschnúť sklíčka pri izbovej teplote

Kvapkanie sondy:

1. zoberie sa malá skúmavka, kam sa pridá 3 µl hybridizačného pufru a 0,5 µl sondy, následne stočenie vo vortexe (v práci sme používali aj komerčne dodávané hybridizačné zmesi, ktoré sme nemuseli miešať)
2. na krycie sklíčko s veľkosťou 15x15 mm sa kvapne 3 µl pripraveného roztoku

Denaturácia a hybridizácia:

1. krycie sklíčko so sondou sa priklopí na podložné sklíčko na mieste, ktoré je označené krížikom, bubliny sa vytlačajú pomocou pinzety
2. následne sa sklíčko fixuje lepidlom

3. preparát sa umiestni na platničku predhriatu na 37 °C (5 min.)
4. preparát sa vloží do ThermoBrite (program 3: 75 °C, 3 min. denaturácia a hybridizácia pri 37 °C cez noc) a vo vlhkom prostredí, ktoré zabezpečí navlhčená gáza destilovanou vodou
5. preparát je v ThermoBrite až do skončenia programu

Odmývanie preparátu:

1. predhreje sa vodná kúpeľ na 75 °C, roztok 0,4x SSC má 72 °C
2. dá sa dole krycie sklo s lepidlom pomocou pipety
3. vložia sa sklíčka do vopred nahriateho roztoku SSC (2 min.)
4. umiestnia sa sklíčka do roztoku 0,4x SSC pH (7 - 7,5, 50 ml)
5. následne sa dajú sklíčka schladiť na 30 sekúnd do 2x SSC (pH 7 - 7,5, 50 ml) premyje sa v destilovanej vode a nechajú sa uschnúť

Nešpecifické zafarbenie štruktúr preparátu:

1. pripraví sa krycie sklíčko s veľkosťou 18x18 mm
2. kvapne sa na krycie sklíčko 4,5 µl roztoku DAPI, priklopí sa na podložné sklíčko v mieste, kde je križik, bubliny sa odstránia pinzetou
3. buničinou sa tlačí na preparát a odsaje sa prebytok DAPI buničinou
4. preparát sa zalakuje
5. preparát sa dá do tmy na 10 min

Hodnotenie:

Preparát sa hodnotí pomocou fluorescenčného mikroskopu vybaveného optickými filtermi s objektívmi 10x, 40x, 64x a 100x a CCD kamerou. Na snímanie obrazu a jeho úpravu sa využíva software ISIS verzia 5.1 od firmy MetaSystems. Hodnotí sa počet signálov, ktoré odpovedali použitej sonde. V prípade snímania a úpravy obrázkov sa využíva funkcia Lower threshold a Upper threshold. Štandardnou analýzu štruktúrnych a numerických aberácií v mozaike sa hodnotí minimálne 50 metafáz a 250 interfáznych jadier.

4.8 Vyšetrenie metódou array CGH

4.8.1 Prístroje na vyšetrenie metódou array CGH

Tabuľka 13. Prístroje na prípravu preparátov na vyšetrenie metódu array CGH používané na ÚBLG

Názov prístroja	Výrobca
Termocyklér Veriti	Thermo Fisher Scientific Invitrogen, USA
Skener DNA Microarray Scanner Agilent	Agilent, USA
Inkubátor Hybex SG 1057-36-2	SciGene, USA
Termoblok ClearHyb™	.BlueGnome, Veľká Británia
Hybridizačná piecka Agilent	Agilent, USA
Inkubátor INCU-Line IL53	VWR International
Koncentrátor IR Micro-Cemvac NB-503CIR	N-Biotek, J.Korea
Vortex BSV-1 plus	Biosan, Lotyšsko
Chladená centrifúga Eppendorf 5430R	Eppendorf, Nemecko
Minicentrifúga Hemrle Z100M	Hemrle, Nemecko
Magnetická miešačka VELP Magnet mikro	VELP, Taliansko
Spektrofotometer NanoDrop ND-200	NanoDrop Technologies, USA
PC s komerčným softwarom pre prácu so skenerom Agilent Scanner Control verzia A.8.5.1	Agilent, USA
PC s komerčným softwarom pre úpravu obrazu Agilent Feature Extraction verzia 10.70	Agilent, USA
PC s komerčným softwarom na vyhodnotenie výsledkov Agilent CytoGenomics verzia 4.0.3.12	Agilent, USA

4.8.2 Reagencie a roztoky na vyšetrenie metódou array CGH

Tabuľka 14. Reagencie a roztoky na vyšetrenie metódou array CGH používané na ÚBLG

Názov reagensie	Výrobca
TE pufor (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,0 – 8,0)	Lékáreň FN Motol
Kontrolná DNA žena/muž	Kreatech, Holansko
Oligo aCGH Wash Buffer 1	Agilent, USA

Oligo aCGH Wash Buffer 2	Agilent, USA
SureTag Complete DNA Labeling Kit a SureTag DNA Labeling Kit (náhodné primery, reakčný pufor, zmes dNTP, Cy3-dUTP, Cy5-dUTP, Klenowov enzým)	Agilent, USA
Purifikačné kolónky	Agilent, USA
Oligo aCGH hybridizačný kit (COT-I-Human DNA, 10x koncentrovaný blokujúci agens, 2x koncentrovaný hybridizačný pufor Hi-RPM)	Agilent, USA
Čip a krycia maska (SurePrint CGH 4x44K/8x60K/4x180K Agilent G3 ISCA), verzia V2	Agilent, USA

Postup metódy array CGH

Kvalita vzoriek:

Kvalita vzoriek DNA by mala byť vysoká, rovnako ako aj množstvo vzorky DNA. To znamená, že sa vyžaduje koncentrácia DNA približne 55 ng/μl, ak je vysoká koncentrácia DNA, pridá sa TE (*tris-ethylenediaminetetraacetic acid*) pufor na nižšiu hustotu. Vo vzorke nesmú byť prímiesy a nemôže byť degradovaná. Ak DNA obsahuje prímiesy prečistí sa proteínázou K alebo sa prečistí chromatografickou kolónkou.

Príprava vzoriek v našom experimente:

Použil sa čip Agilent – 4x44K – vyšetřovali sa 4 vzorky. Ďalej sa pripravili dve vzorky na 8x60K Agilent, kde sa vyšetřilo naraz osem vzoriek. Pracovný postup bol prevzatý z protokolu tejto firmy. Použili sa komerčne dodávaná referenčná DNA, izolovanú z periférnych lymfocytov na validáciu poľa. Vyšetřovaná DNA sa hybridizovali proti referenčnej DNA. V prípade mozaik gonozómov (pacientka A18, A19) bol profil porovnávaný proti mužskej a proti ženskej referencii, aby sa zistilo, či to má vplyv na výpočet mozaiky a detekciu všeobecne a pokiaľ áno, tak aký.

Postup prípravy vzoriek:

1. rozmrazia sa vzorky vyšetřovanej DNA a referenčnej DNA
2. koncentrácia vzorky je 55 ng/μl a objem je 20 μl

3. vortexujú sa a centigugujú sa vzorky
4. zmerajú sa parametre vzoriek na nanodrope v režime Nucleid acid DNA (sleduje sa optická denzita A260/A280), TE pufor slúži ako blank
5. zaznamenajú sa namerané hodnoty do protokolu

V prípade prítomnosti prímiesov sa robí prečistenie vzoriek chromatografickou kolónkou:

1. zoberú sa 2 skúmavky, popíše sa a dá sa na kolónku
2. pridá sa 30-35 μl DNA a 450 μl TE pufra, kolónka je mokrá a hladina je až po povrch
3. použije sa kolónkový rotor a dá sa centrifugovať na 1400 rpm, 22 °C, 10 minút
4. kolónka sa otočí na druhú stranu a dá sa centrifugovať (1400 rpm, 22 °C, 10 minút)
5. kolónka sa otočí hore hlavou a do novej skúmavky sa dá kolónka s uzáverom
6. centrifuguje sa 1 min., 1000 rpm

Fluorescenčné značenie DNA:

1. pripraví sa vodná kúpeľ (ľad + voda), dá sa na vodnú kúpeľ enzým Exo (-) Klenow, primery, dNTP, gDNA buffer
2. vzorky sa centrifugujú po dobu 1 minúty pri 6 000 x g
3. ku každej vzorke aj kontrolnej DNA sa pridá 2,5 μl náhodných primerov, aby sa získal celkový objem 15,5 μl
4. dobre sa premieša pipetovaním jemne nahor a nadol
5. preniesie sa skúmavka do cirkulujúceho vodného kúpeľa alebo do ohrievacieho bloku a dá sa denaturovať pri teplote 98 °C, 10 minút
6. potom sa preniesie do ľadovej kúpele a inkubuje sa po dobu 5 minút
7. vzorky sa centrifugujú počas 1 minúty pri 6 000 x g

8. príprava mastermixu:
 - a. sú 2 skúmavky pre červený Cy3 (vyšetrovaná DNA) a modrý Cy5 (kontrolná DNA)
 - b. do každej skúmavky sa pridá 5 μ l 5x reakčného pufru
 - c. do oboch skúmaviek sa pridá 2,5 μ l 10x dNTPs
 - d. do skúmavky označenej ako červená sa pridá 1,5 μ l cyanínu 3-dUTP
 - e. do skúmavky označenej ako modrá sa pridá 1,5 μ l cyanínu 5-dUTP
 - f. do každej skúmavky sa pridá 0,5 μ l Exo (-) Klenow
 - g. objem mastermixu pre jednu vzorku je 9,5 μ l
 - h. dobre sa premieša jemným pipetovaním nahor a nadol, premieša sa a jemne sa vortexuje a centrifuguje
 - i. dá sa na ľadový kúpeľ alebo do zamrznutej platničky
9. pridá sa do každej reakčnej skúmavky, ktorá obsahuje DNA, 9,5 μ l roztoku označeného ako mastermix do celkového objemu 25 μ l
10. prenesie sa skúmavka do termocykléru
11. programuje sa termocyklér:
 - a. krok 1: 37 °C počas 2 hodín
 - b. krok 2: 65 °C počas 10 minút
 - c. krok 3: 4 °C ponechať
12. spustí sa program

Purifikácia značenej DNA:

1. vzorka značenej DNA sa centrifuguje 1 minútu pri 6 000 x g
2. pridá sa 430 μ l 1 x TE (pH 8,0) do každej reakčnej skúmavky

3. pre každú purifikovanú vzorku DNA sa umiestni purifikačná kolónka do zbernej skúmavky s objemom 2 ml a vhodne sa označí kolónka, prenesie sa každá označená DNA do kolónky
4. kolónka sa zakryje uzáverom a centrifuguje sa 10 minút pri 14 000 x g v centrifúge pri izbovej teplote
5. zleje sa čo pretieklo a prenesie sa kolónka naspäť do zbernej skúmavky s objemom 2 ml (tak, že sa odstráni čo pretieklo a kolónka sa otočí o 180 °)
6. do každej kolónky sa pridá 480 µl 1 x TE (pH 8,0)
7. prenesie sa na mikrocentrifúgu pri izbovej teplote a centrifuguje sa 10 minút pri 14 000 x g, zleje sa čo pretieklo
8. kolónka sa prevráti do novej zbernej skúmavky s objemom 2 ml, ktorá je vhodne označená
9. centrifuguje sa 1 minútu pri 1000 x g v centrifúge pri izbovej teplote, aby sa získala vyčistená vzorka, objem na vzorku bude približne 20 až 32 µl
10. použije sa vakuová odparka (16 minút, 60 °C), aby sa objem vzorky po rozpustení DNA v TE dostal na 10 µl
11. vortexuje sa a centrifuguje sa
12. kontrolujú sa parametre na spektrofotometri v režime Microarray

Hybridizácia:

1. skombinuje sa 8 µl vzorky modrej (kontrolnej) DNA s 8 µl červenej (vyšetrovaná) DNA, zmiešajú sa dokopy kvôli hybridizácii (vzorky od rovnakého pohlavia)
2. vortexujú sa reagenty Oligo array CGH hybridizačného kitu
3. vyblokuje sa repetície (keďže je celá gDNA):
 - a. pridá sa 2 µl COT-I-Human DNA do každej skúmavky
 - b. do každej skúmavky sa pridá 4,5 µl 10x koncentrovaného blokujúceho agens

- c. do každej skúmavky sa pridá 25 μ l 2x koncentrovaného hybridizačného pufra Hi-RPM
 - d. zapnú sa stroje (teplé bloky – Hybex)
 - e. vortex na minimálne otáčky, potom sa zdvíhajú otáčky, stočí sa v mikrocentrifúge
 - f. denaturuje sa DNA pri 99 °C po dobu 3 minút v inkubátore Hybex SG 1057-36-2 (aby sa neotvorila a neodparila DNA)
 - g. inkubuje sa pri 37 °C po dobu 30 minút v termobloku ClearHyb™ (blokujúci agens a COT-I-Human DNA sa naviaže a zablokuje repetície, v DNA budú len unikátne oblasti, ktoré k sebe hybridizujú pri 37 °C)
4. zoberie sa maska na čip, vzorky sa stočia v centrifúge, vloží sa krycia maska do hybridizačného držiaka a naniesie sa 45 + 5 μ l vzorky (v prípade, ak jej je nadbytok) do stredu array na masku
 5. maska sa prikryje aktívnym čipom k sebe, dá sa kovová mriežka a upevní sa, zašrobuje, pri otočení sa bublinky musia hýbať
 6. hybridizuje sa v piecke predhriatej na 67 °C, minimálne 16 hodín pri otáčkach rotora 20 rpm

Odmytie:

1. deň vopred sa pripravlia roztoky a dá sa nahriať plná falkónka Wash Buffer 2 na 40 °C
2. vaničky sa umyjú dH₂O, zapne sa miešadlo, dajú sa magnetky do jednej vaničky a pridá sa do oboch vaničiek Wash Buffer 1
3. vloží sa čip s maskou do jednej vaničky s Wash Buffer 1 a odstráni sa maska
4. vloží sa čip do druhej vaničky s Wash Buffer 1 a na magnetickom miešadle sa odmyva 5 minút pri izbovej teplote
5. prenesie sa čip do falkónky s Wash Buffer 2, ktorý je v inkubátore vyhriaty na 37 °C, a vloží sa naspäť do inkubátora nastaveného na teplotu 38 °C po dobu 1 minúty

6. pomaly sa vytáhuje sklíčko, aby bolo suché, dá sa do upevňovacej mriežky (HOLDER), utrie sa spodná strana
7. vloží sa ozónová bariéra na čip, uzavrie sa HOLDER a dá sa do stroja na skenovanie
8. zapne sa program Agilent Scan Control na ovládanie sceneru a naskenuje sa čip

Vyhodnotenie:

Skenuje sa pri rozlíšení 3 mikrometrov pomocou komerčného programu Agilent Scan Control verzia A.8.5.1. Obraz sa upravuje v programe Agilent Feature Extraction verzia 10.70. Vyhodnotenie sme robili v programe a program Agilent CytoGenomics 4.0.3.12.

Vyhodnotenie stupňa mozaicizmu:

Pri vyhodnotení stupňa mozaicizmu analýzou array CGH boli odvodené percentá abnormálnych buniek s chromozómovou aberáciou podľa článku (CHEUNG *et al.* 2007) a na základe vzorca sa zistilo na aké percento metóda array CGH stanovuje mozaiku. Vo výsledku sa získala hodnota *Log2Ratio* aberácie. Pričom vzorec odhaduje, že sa všetky aberácie nachádzajú vo všetkých bunkách (100 %) a majú rovnaké *Log2Ratio*.

$$c(\%) = \left| \frac{(2^{Log2Ratio} - 1)}{0,5} \right| \times 100$$

Uvedený vzorec je navrhovaný samotnou firmou Agilent. Tento algoritmus identifikuje všetky aberantné intervaly, ktoré predstavujú významnú odchýlku od základnej hodnoty váženého priemeru *Log2Ratio* fluorescence pre vyšetrovanú a referenčnú DNA. V prípade mozaiky, *Log2Ratio* zjavne súvisí s percentom abnormálnych buniek. Na vyhodnotenie tohto percenta slúži porovnanie s referenčným (diploidným) genómom, kedy s vyšetrovanou DNA s deléciou jednej špecifickej sekvencie sa ukáže vo všetkých bunkách referenčnej DNA dvojnásobná intenzita fluorescence referenčnej DNA v porovnaní s vyšetrovanou DNA. Zatiaľ čo v prípade duplikácie jednej sekvencie vo všetkých bunkách vyšetrovanej DNA je 1,5-násobne zvýšená intenzita fluorescenčného signálu v porovnaní s referenčnou DNA. *Log2Ratio* pre tieto hodnoty pomeru sú -1 (delécie) a 0,584 (duplikácie).

V prípade mužskej vzorky u gonozómov a v prípade mužských referencií sa počítali výsledky podľa upraveného vzorca (CHEUNG *et al.* 2007) $c(\%) = \left| \frac{(2^{\text{Log}_2\text{Ratio}} - 1)}{1} \right| \times 100$, keďže gonozómy majú jednu kópiu a pôvodný vzorec platí pre 2 kópie chromozómov. Vychádzalo sa podľa týchto úvah a vzorec sa prispôbil, tým, že sa hodnota 0,5 pod zlomkovou čiarou upravila na 1 (dvojitú hodnotu).

U pacientky A12 sa upravil vzorec (CHEUNG *et al.* 2007) $c(\%) = \left| \frac{(2^{\text{Log}_2\text{Ratio}} - 1)}{0,25} \right| \times 100$, kedy sa pod zlomovú čiaru uviedla hodnota 0,25 namiesto 0,5. Z dôvodu homológie medzi chromozómami 13 a 21, pričom sa jedná o štyri kópie chromozómov a nie o dve kópie chromozómov ako pri pôvodnom vzorci.

5 Výsledky

5.1 Výsledky karyotypu

Celkovo sa získali výsledky od 45 pacientov, z toho sa preverili cytogenetické nálezy na 43 pacientoch. Karyotyp odhalil 23 pacientov s aberáciami gonozómov v mozaike (pacientke G16 sa zaznamenal normálny karyotyp) a 18 pacientov s aberáciami autozómov v mozaike (pacient A2 mal karyotyp zdravého jedinca). V Tabuľka 15 je možné vidieť všetky výsledky mozaicizmu gonozómov, pričom u dvoch pacientov (G2 a G9) nie je vyšetrený karyotyp, keďže sa im pre podozrenie na TS urobili priamo vyšetrenie metódou FISH.

U aberácii gonozómov pri analýze výsledkov karyotypu sa našlo osem žien a jeden muž s mozaicizmom monozómie chromozómu X. Sedem pacientiek vykazovalo karyotyp s monozómiou X a trizómiou X spolu s normálnou bunkovou líniou. Dve pacientky (G8 a G24) mali trizómiu X prítomnú s normálnou bunkovou líniou. U pacienta G20 bola odhalená trizómia X v mozaike s dizómiou pohlavných chromozómov. U pacientky G25 karyotyp preukázal monozómiu chromozómu 18 v dvoch mitózach, okrem toho karyotyp našiel mozaiku TS.

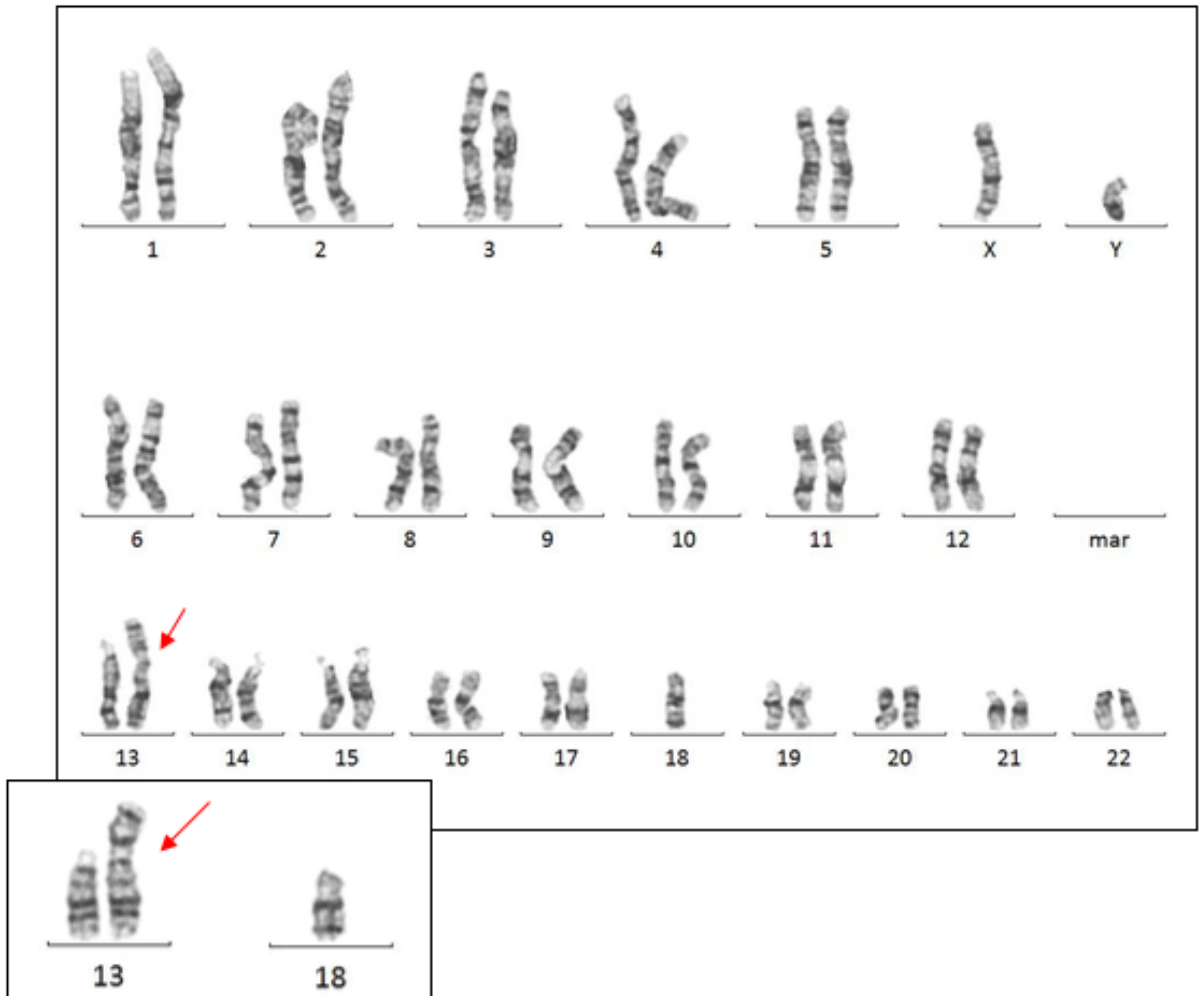
Pacientke G4 bol nájdený kruhový chromozóm v mozaike s monozómiou X. U pacientky G23 bol zaznamenaný izochromozóm dlhých ramien chromozómu X. Pacientovi G26 bol zistený izochromozóm Y v mozaike s monozómiou X.

Tabuľka 15. Karyotypy pacientov (G1-G26) s mozaicizmom gonozómov. Ružové políčko značí, že karyotyp nezachytil mozaiku. N/A – karyotyp nebol vyšetrený

Číslo pacienta	Výsledky karyotyp - periférna krv	Počet hodnotených mitóz
G1	45,X[6]/46,XX[15]	21
G2	N/A	N/A
G3	45,X[6]/47,XXX[2]/46,XX[12]	20
G4	45,X[13]/46,X,r(X)[6]/46,XX[4]	23
G5	45,X[12]/46,XX[58]	70
G6	45,X[3]/46,XX[32]	35
G7	45,X[2]/47,XXX[3]/46,XX[18]	23
G8	47,XXX[3]/46,XX[40]	43
G9	N/A	N/A
G10	45,X[7]/46,XX[16]	23

G11	45,X[2]/46,XX[33]	35
G12	45,X[4]/47,XX[43]	47
G13	45,X[2]/47,XXX[1]/46,XX[28]	31
G14	45,X[10]/46,XX[32]	42
G15	45,X[4]/47,XXX[2]/46,XX[27]	33
G16	46,XX	N/A
G17	45,X[3]/47,XXX[1]/46,XX[56]	60
G18	45,X[8]/46,XX[15]	23
G19	45,X[4]/47,XXX[1]/46,XX[35]	40
G20	47,XXY[5]/46,XY[23]	28
G21	45,X[30]/46,XY[120]	150
G22	45,X[4]/47,XXX[3]/46,XX[23]	30
G23	45,X[16]/46,Xi(X)(q10)[4]	20
G24	47,XXX[2]/46,XX[36]	38
G25	45,X[14]/45,XX,-18[2]/46,XX[13]	29
G26	45,X[5]/46,XY,del(Y)(q11.2)[35]	40

Výsledky z Tabuľka 16 ukazujú výsledky karyotypov s mozaicizmom autozómov. U šiestich pacientoch sa odhalil mozaicizmus autozómov s nadbytočným marker chromozómom. K tomu dvaja pacienti (A3, A19) vykazovali trizómiu chromozómu 21 v mozaike. Pacient A5 mal vo výsledku karyotypu zistenú trizómiu chromozómu 8 s normálnou bunkovou líniou. Karyotyp pacientky A9 sa vyznačuje derivovaným chromozómom 7 v mozaike (nebola viditeľná centroméra chromozómu 7). Ako je vidieť v Tabuľka 17, u pacienta A10 bol urobený karyotyp z periférnej krvi aj z kožných fibroblastov a v oboch prípadoch naznačoval prítomnosť mozaiky Downovho syndrómu spolu so stratou Y chromozómu. Pacientke A12 sa odhalila bunková línia s dvomi marker chromozómami a bunková línia s jedným marker chromozómom v spojení s normálnou bunkovou líniou. U pacienta A13 sa našiel derivovaný chromozóm 8 v mozaike. Pacient A14 má zistený nadbytočný chromozómom, ktorý je duplikáciou chromozómu 5. Pacientovi A15 sa našiel prítomný kruhový chromozóm 22 spolu s monoziómiou chromozómu 22. Výsledok u pacienta A16, ktorý naznačuje prítomnosť derivovaného chromozómu vzniknutý fúziou chromozómov 13 a 18 je vidieť na Obrázok 5. Pacient A17 mal zistenú mozaiku s invertovanou duplikáciou chromozómu 3. Pacientovi A18 sa preukázala duplikácia chromozómu 5 v mozaikovej forme.



Obrázok 5. Karyotyp u pacienta A16. Identifikácia derivovaného chromozómu: 45,XY,der(13;18)(p11.2;q11.1)

Tabuľka 16. Karyotypy pacientov (A1-A19) s mozaicizmom autozómov. Ružové políčko značí, že karyotyp nezachytil mozaiku. N/A – neznámy počet

Číslo pacienta	Výsledky karyotyp - periférna krv	Počet hodnotených mitóz
A1	47,XX,+mar[13]/46,XX[22]	35
A2	46,XY	N/A
A3	45,X[2]/47,XX,+21[2]/46,XX[34]	38
A4	47,XX,+mar[7]/46,XX[13]	20
A5	47,XY,+8[28]/46,XY[12]	40
A6	47,XY,+mar[4]/46,XY[18]	22
A7	47,XX,+mar[16]/46,XX[24]	40
A8	47,XY,+mar[29]/46,XY[6]	35
A9	46,XX,der(7)[8]/46,XX[42]	50
A10	45,X[69]/47,XY,+21[31]	100
A11	47,XY,+mar[46]/46,XY[15]	61
A12	48,XX,+2mar[4]/47,XX,+mar[15]/46,XX[16]	35
A13	46,XY,der(8)[22]/46,XY[13]	35
A14	47,XY,+invdup(5)(pterp15.1)[10]/46,XY[28]	38
A15	46,XY,r(22)[20]/45,XY,-22[5]	25

A16	45,XY,der(13;18)(p11.2;q11.1)[7]/46,XY[18]	25
A17	46,XY,inv dup(3)(q26.3q29)[22]/46,XY[4]	26
A18	46,XY,dup(5)(p14.2p15.33)[22]/46,XY[32]	54
A19	47,XX,+21[4]/46,XX[16]	20

Tabuľka 17. Karyotypy u pacienta A10 získané z periférnej krvi a z kožných fibroblastov. Výsledky sú pre provnanie uvedené v percentách (spodný riadok)

Výsledky karyotyp - periférna krv	Počet hodnotených mitóz	Výsledky karyotyp - fibroblasty	Počet hodnotených mitóz
45,X[69]/47,XY,+21[31]	100	45,X[52]/47,XY,+21[13]	65
45,X (69%)/47,XY,+21 (31%)		45,X (80%)/47,XY,+21 (20%)	

5.2 Výsledky metódy FISH

Celkovo sa získali výsledky metódou FISH z periférnej krvi od 39 pacientov, z bukálnej sliznice od deviatich pacientov a z fibroblastov od dvoch pacientov.

Tabuľka 18 ukazuje, že analýzou FISH sa našla chromozómová mozaika gonozómov u 24 z 26 pacientov. U pacienta G21 sa vyšetrenie metódou FISH neuskutočnilo a robilo sa vyšetrenie metódou array CGH. U pacientky G24 sa mozaicizmus metódou FISH nepreukázal.

Osem žien vykazovalo mozaiky s TS, výsledok jednej (G1) z pacientiek je na Obrázok 6. Pacientka G2 mala získané výsledky z periférnej krvi aj z bukálnej sliznice (výsledok je vidieť na Obrázok 7). V obidvoch vyšetrených materiáloch bola preukázaná mozaika bunkovej línie 45,X (viď Tabuľka 20). Pri deviatich pacientkach sa zaznamenali metódou FISH tri bunkové línie (monozómia, trizómia a dizómia X). U pacientky G4 sa odhalila prítomnosť monozómie X a jeden normálny chromozóm X spolu so suspektným kruhovým chromozóm X, vizualizuje to Obrázok 8. U pacientky G9 výsledok z periférnej krvi preukázal prítomnosť mozaicizmu/chimérizmu. Metódou FISH z bukálnej sliznice všetky vyšetrené jadra u pacientky G9 vykazovali prítomnosť dvoch chromozómov X (viď Tabuľka 20). U pacientky G18 sa našla okrem monozómie X aj delécia génu *SHOX*. Pacient G20 mal mozaiku s trizómiu X. Pacientke G23 bol detekovaný izochromozóm X. V prípade pacientky G25, ktorá mala indikovaný TS, sa metódou FISH nezachytila delécia génu *SHOX*, ale našla sa monozómia chromozómu X. Druhý krát bola u pacientky G25 použitá sonda FAST FISH pre chromozómy X, Y a 18, s výsledkom aký je vidieť v Tabuľka 19, kde všetky bunky vykazujú dve kópie chromozómu 18. U pacienta G26 bola preukázaná delécia časti dlhých ramien chromozómu Y s monozómiou X.

Tabuľka 18. Výsledky získané metódou FISH u pacientov (G1-G26). Oranžové políčko značí vyšetrenie prevádzané metódou FISH a ružové políčko značí, že FISH nezachytila mozaiku. N/A – pacient nebol vyšetrený metódou FISH; neznámy počet

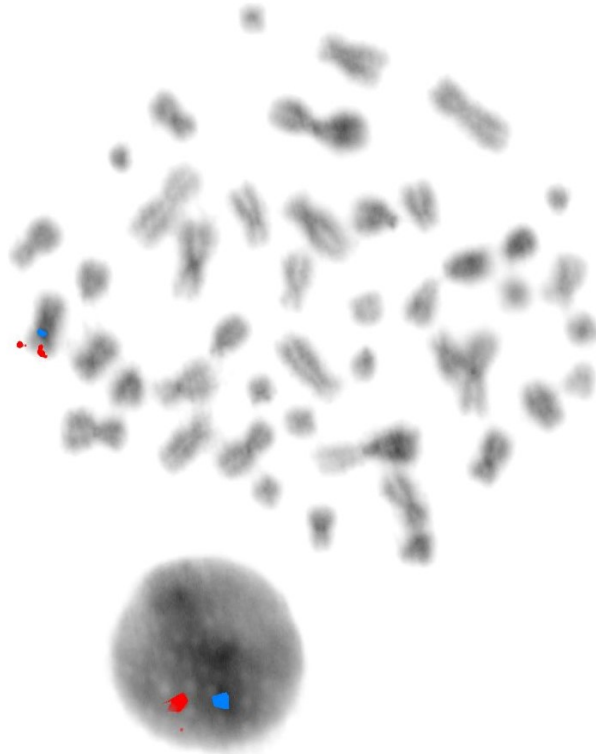
Číslo pacienta	Výsledky FISH - periférna krv	Počet vyšetrených buniek
G1	45,X (27,8%)/46,XX (72,2%)	677
G2	45,X (14,5%)/46,XX (85,5%)	N/A
G3	45,X (7,6%)/46,XX (92,4%)	787
G4	45,X (73,5%)/46,X,r(X) (24,5%)	564
G5	45,X (11,2%)/47,XXX (1,17%)/46,XX (87,8%)	681
G6	45,X (4%)/46,XX (96%)	101
G7	45,X (4,5%)/46,XX (95,5%)	706
G8	45,X (5,9%)/47,XXX (2,7%)/46,XX (91,3%)	404
G9	46,XX (94%)/46,XY (6%)	708
G10	45,X (8,1%)/46,XX (91,9%)	467
G11	45,X (10,3%)/47,XXX (1,5%)/46,XX (88,3%)	273
G12	45,X (7,2%)/46,XX (92,8%)	609
G13	45,X (7,8%)/47,XXX (8,3%)/46,XX (83,9%)	372
G14	45,X (8,3%)/47,XXX (2,8%)/46,XX (88,9%)	1242
G15	45,X (5,8%)/47,XXX (4,6%)/46,XX (89,7%)	330
G16	45,X (4,4%)/47,XXX (3,4%)/46,XX (92,3%)	387
G17	45,X (3,2%)/46,XX (96,8%)	756
G18	46,XX,del SHOX (55%)/45,X (44,2%)/46,XX (0,8%)	260
G19	45,X (8%)/46,XX (92%)	480
G20	47,XXY (13,4%)/46,XY (86,6%)	740
G21	N/A	N/A
G22	45,X (4,5%)/47,XXX (1%)/46,XX (94,5%)	N/A
G23	45,X (87,2%)/46,Xi(X) (12,8%)	N/A
G24	46,XX	479
G25	45,X (56%)/46,XX (44%)	613
G26	45,X (25%)/46,XY,del(Y)(q11.2) (75%)	380

Tabuľka 19. Výsledky u pacientky G25 získané metódou FISH s použitou sondou FAST FISH (X, Y, 18) získané z buniek periférnej krvi

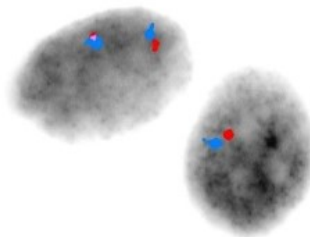
Číslo pacienta	Výsledky FISH – periférna krv	Počet vyšetrených buniek
G25	45,X (36,1%)/46,XX (63,9%)	457

Tabuľka 20. Výsledky získané metódou FISH u pacientov G2 a G9 z buniek periférnej krvi a z bukálnej sliznice. Ružové políčko značí, že nebola zachytená mozaika. N/A – neznámy počet

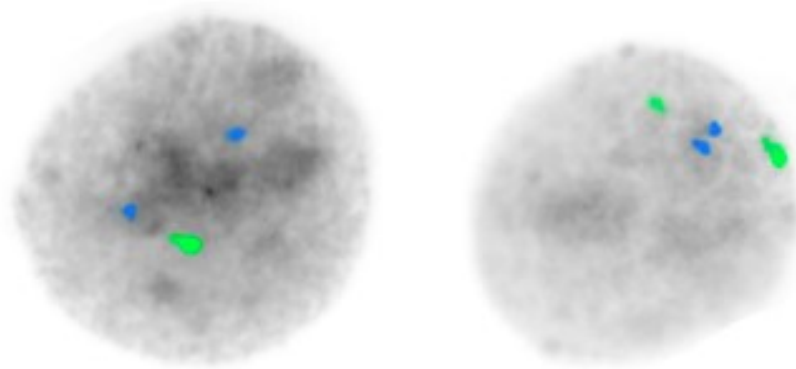
Číslo pacienta	Výsledky FISH - periférna krv	Výsledky FISH - bukálny ster	Počet hodnotených jadier
G2	45,X (14,5%)/46,XX (85,5%)	45,X (12,7%)/46,XX (87,3%)	228
G9	46,XX (94%)/46,XY (6%)	46,XX (100 %)	N/A



Obrázok 6. Metódou FISH preukázaná mozaika bunkovej línie 45,X u pacientky G1. Bola použitá zmes sond pre detekciu génu *SHOX* (firma Cytocell) – zmes obsahuje sondu pre centromerickú oblasť chromozómu X (modré značenie) a sondu pre gén *SHOX* (červené značenie) a zelenú sondu pre Yqh, ktorá sa nemala, kde uchytiť, pretože pacientka nemá prítomný Y chromozóm. Na jadre (dole) je vidieť jeden modrý a jeden červený signál, čo značí monozómiu chromozómu X. Na mitóze (hore) je prítomný 2x červený signál (gén *SHOX*), 1x modrý signál (kontrolná centromerická sonda chromozómu X), čo značí monozómiu X. Zväčšenie 1000x.



Obrázok 7. Metódou FISH u pacientky G2 bola preukázaná 12,72% mozaika bunkovej línie 45,X v bukálnej sliznici. Bola použitá zmes sond pre detekciu génu *SHOX* (firma Cytocell) – zmes obsahuje sondu pre centromerickú oblasť chromozómu X (modré značenie) a sondu pre gén *SHOX* (červené značenie). Bunka vľavo sa vyznačuje dizómiou X (dva modré a dva červené signály) a bunka vpravo monozómiou X (jeden modrý a jeden červený signál). Zväčšenie pod mikroskopom 1000x.



Obrázok 8. Vyšetrenie pacientky G4 metódou FISH. Bola použitá komerčne dodávaná zmes sond pre centroméry chromozómov 18, X a Y, každá značená odlišným fluochrómom (firma Cytocell). Na hodnotených jadrách bolo možné pozorovať: bunka naľavo značí 45,X (jeden zelený signál pre oblasť centroméry X a dva modré signály pre centroméru 18); bunka napravo dva zelené signály pre oblasť centroméry X a dva modré signály pre centroméru 18. Na oboch jadrách sú vidieť prítomné dva chromozómy 18 (modrý signál). Signál pre centroméru chromozómu Y nebol prítomný. Zväčšenie pod mikroskopom 1000x.

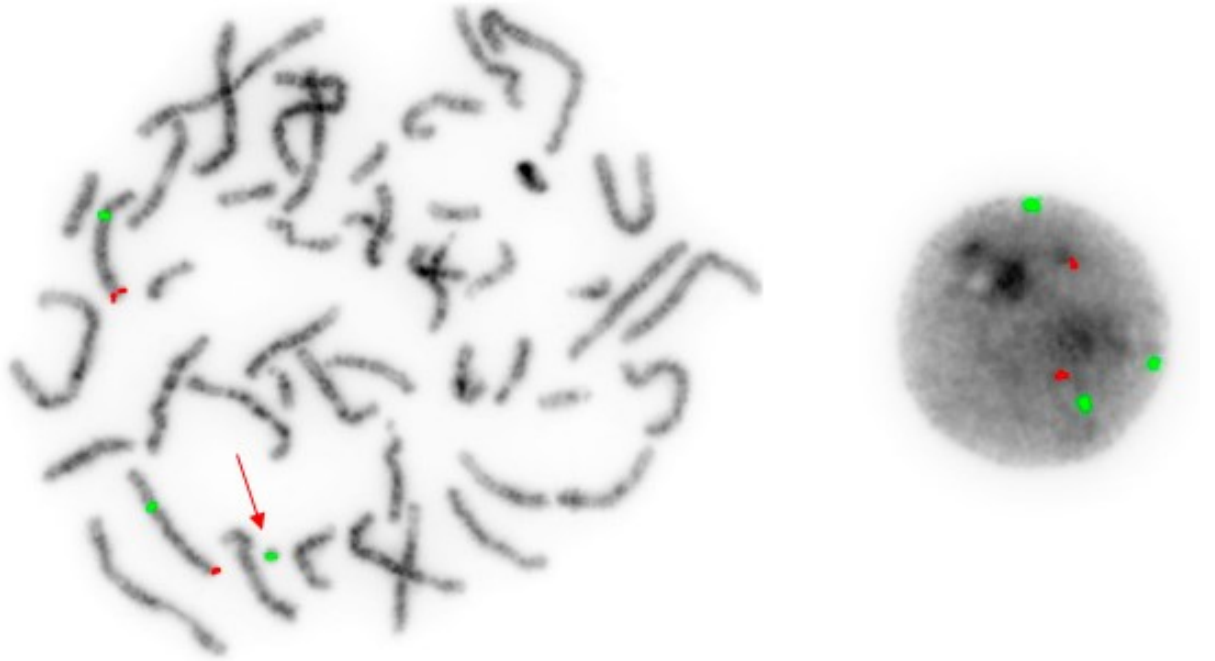
Tabuľka 21 predstavuje výsledky aberácií autozómov v mozaike, ktorých sa metódou FISH zaznamenalo 13 z periférnej krvi, sedem z bukálneho steru a dva z fibroblastov.

U pacientky A1 a pacienta A8 (na Obrázok 9) sa zistil nadbytočný chromozómom derivovaný z chromozómu 8. U pacientky A1 sa navyše našla monoziómia X z bukálneho steru narozdiel od výsledku z periférnej krvi, kde sa monoziómia X nezaznamenala. Pacient A2 vykazoval z periférnej krvi nebalancovanú translokáciu medzi chromozómom 2 a 15 a z bukálnej sliznice sa zaznamenala delécia dlhého ramena chromozómu 2 a duplikácia chromozómu 15 v mozaike. U pacientky A3 nebola preukázaná mozaika. Pacientke A4 sa zistil derivovaný chromozóm 19. Pacient A5 mal zistenú trizómiu chromozómu 8 prítomnú s normálnou bunkovou líniou. Pacient A6 mal dokázanú prítomnosť nadbytočného derivovaného z chromozómu 14 alebo 22. Pacientke A7 sa našli v bukálnej sliznici bunky s derivovaným chromozómom nesúcim centroméru chromozómu 3, fibroblasty naznačovali rovnaký nález. Vyšetrením metódou FISH u pacientky A9 nebola preukázaná delécia chromozómu 7 v oblastiach, na ktoré sa použili sondy, ale bol zaznamenaný derivovaný chromozóm 7. Pacientovi A10 sa detekovala trizómia 21 v mozaike s deléciou Y chromozómu. V krvi pacienta A14 sa indikoval nález nadbytočného derivovaného chromozómu pôvodom z chromozómu 5, z toho dôvodu bolo urobené vyšetrenie metódou FISH z bukálneho steru, kde sa odhalil rovnaký nález. U pacienta A15 bola preukázaná z periférnej krvi bunková línia s kruhovým chromozómom 22, monoziómia chromozómu 22 a normálna bunková línia. V bukálnej sliznici

sa kruhový chromozóm 22 nezachytil. Klinický nález u pacienta A16 bol TS, pričom FISH nedetekovala deléciu génu *SHOX*, ale našla sa mozaika bunkovej línie obsahujúca derivovaný chromozóm z chromozómov 18 pravdepodobne s chromozómom 3, výsledok je zobrazený na Obrázok 10. Pacient A17 mal z bukálneho steru preukázanú mozaiku s invertovanou duplikáciou chromozómu 3. U pacienta A18 sa našla duplikácia chromozómu 5 v mozaike. Mozaicizmus nebol metódou FISH upresňovaný pre nedostatočné množstvo hodnotených mitóz. Pacientke A19 bola preukázaná mozaika trizómie chromozómu 21, prítomná v periférnej krvi aj v bukálnej sliznici.

Tabuľka 21: Výsledky získané metódou FISH u pacientov (A1-A19) z buniek periférnej krvi, bukálnej sliznice, kožných fibroblastov. Oranžové políčka značia, že mozaika nesúhlasí s vyšetrením karyotypu. N/A – pacient nebol vyšetrený metódou FISH

Číslo pacienta	Výsledky FISH - periférna krv	Výsledky FISH - bukálny šter	Výsledky FISH - fibroblasty
A1	47,XX,+der(8) (52%)/46,XX (48%)	45,X (6,7%)/47,XX,+der(8) (32,8%)/46,XX (60,5%)	N/A
A2	46,XY,der(2)t(2;15) (30%)/46,XY (70%)	46,XY,del(2)(2qter) (26,7%)/46,XY (73,3%)	N/A
A3	45,XX	N/A	N/A
A4	47,XX,+der(19) (37,9%)/46,XX (62,1%)	N/A	N/A
A5	45,X (4,0%)/47,XY,+8 (50,1%)/46,XY (45,9%)	N/A	N/A
A6	47,XY,+mat (11,9%)/46,XY (88,1%)	N/A	N/A
A7	N/A	47,XX,+der(3) (22,9%)/46,XX (77,1%)	47,XX,+der(3) (30,8%)/46,XX (69,2%)
A8	47,XY,+der(8) (79,6%)/46,XY (20,4%)	N/A	N/A
A9	46,XX,der(7) (13%)/46,XX (87%)	N/A	N/A
A10	45,X (76,6%)/47,XY,+21 (23,4%)	N/A	45,X (73%)/47,XY,+21 (27%)
A11	N/A	N/A	N/A
A12	N/A	N/A	N/A
A13	N/A	N/A	N/A
A14	47,XY,+inv dup(5)(5pter;15p15.1) (15,8%)/46,XY (84,2%)	47,XY,+inv dup(5)(5pter;15p15.1) (64,7%)/46,XY (35,3%)	N/A
A15	45,XY,-22 (2,6%)/46,XY,r(22) (0,3%)/46,XY (97,1%)	45,XY,-22 (4,6%)/46,XY (95,4%)	N/A
A16	45,XY,der(13;18)(p11.2;q11.1) (21,1%)/46,XY (78,9%)	N/A	N/A
A17	N/A	46,XY,inv dup(3)(q26.3q29) (72,8%)/46,XY (27,2%)	N/A
A18	46,XY,dup(5)(p14.2p15.33)/46,XY	N/A	N/A
A19	47,XX,+21 (18,7%)/46,XX (81,3%)	47,XX,+21 (43,8%)/46,XX (56,2%)	N/A



Obrázok 9. Vyšetrenie metódou FISH u pacienta A8. Preukázaná mozaika chromozómu derivovaného z chromozómu 8. Bola použitá zmes α -satelitnej sondy pre centroméru chromozómu 8 (diagnostická sonda; značená zeleným fluorochrómom) so subtelerickou sondou pre dlhé ramená chromozómu 8 (kontrolná sonda; značená červeným fluorochrómom) od firmy Cytocell. Je vidieť jadro (vpravo) a mitózu (vľavo), ktoré obsahujú tri zelené a dva červené signály, čo značí nadpočetný chromozóm derivovaný z chromozómu 8 (červená šípka).



Obrázok 10. Vyšetrenie metódou FISH u pacienta A16. Nález derivovaného chromozómu vzniknutého fúziou dlhého ramena chromozómu 18 s chromozóm 13. Je možné vidieť deléciu krátkých ramien chromozómu 18, ktorú naznačuje šípka (chýbajúci zelený signál). Použitá sonda je zmesou subtelerických sond 18pter (zelený signál) a 18qter (červený signál) od firmy Cytocell. Zväčšenie pod mikroskopom 1000x.

5.2.1 Percentuálny záchyt mozaiky (karyotyp vs. FISH)

Porovnávali sa výsledky karyotypu a metódy FISH, ktoré sú zhrnuté v Tabuľka 22 a Tabuľka 23, kde je vidieť percentuálne zastúpenie jednotlivých bunkových línií a počet hodnotených mitóz/buniek.

V prípade mozaicizmu gonozómov sa zistil približne rovnaký percentuálny záchyt mozaiky u 14 z 23 (60 %) pacientov. Porovnanie výsledkov karyotypu a FISH je uvedené v Tabuľka 22. Pri porovnávaní percentuálneho záchytu mozaiky sa nebrala do úvahy prítomnosť odlišných bunkových línií. Záchyt mohla ovplyvniť neprítomnosť danej sondy pri metóde FISH (u pacientky G25) alebo neschopnosť záchytu na karyotype (pacientka G18), z tohto hľadiska bol uzavretý nález ako podobný.

Tabuľka 22. Porovnanie percentuálneho zastúpenia bunkových línií z karyotypu a FISH u vybraných pacientov s mozaikami gonozómov. Zeleným políčkom sú označení pacienti, ktorí majú približne rovnaký záchyt mozaiky a oranžovým sú označení pacienti, ktorí majú diametrálne odlišné výsledky.

Číslo pacienta	Výsledky karyotyp - periférna krv	Výsledky FISH - periférna krv
G1	45,X (28,6%)/46,XX (71,4%)	45,X (27,8%)/46,XX (72,2%)
G3	45,X (30%)/47,XXX (10%)/46,XX (60%)	45,X (7,6%)/46,XX (92,4%)
G4	45,X (56,5%)/46,X,r(X) (26,1%)/46,XX (17,4%)	45,X (73,5%)/46,X,r(X) (26,5%)
G5	45,X (17,1%)/46,XX (82,9%)	45,X (11,2%)/47,XXX (1,1%)/46,XX (87,8%)
G6	45,X (8,6%)/46,XX (91,4%)	45,X (4%)/46,XX (96%)
G7	45,X (8,7%)/47,XXX (13%)/46,XX (78,3%)	45,X (4,5%)/46,XX (95,5%)
G8	47,XXX (7%)/46,XX (93%)	45,X (5,9%)/47,XXX (2,7%)/46,XX (91,3%)
G10	45,X (30,4%)/46,XX (69,6%)	45,X (8,1%)/46,XX (91,9%)
G11	45,X (5,7%)/46,XX (94,3%)	45,X (10,3%)/47,XXX (1,5%)/46,XX (88,3%)
G12	45,X (8,5%)/47,XX (91,5%)	45,X (7,2%)/46,XX (92,8%)
G13	45,X (6,5%)/47,XXX (3,2%)/46,XX (90,3%)	45,X (7,8%)/47,XXX (8,3%)/46,XX (83,9%)
G14	45,X (23,8%)/46,XX (76,2%)	45,X (8,3%)/47,XXX (2,8%)/46,XX (88,9%)
G15	45,X (12,1%)/47,XXX (6,1%)/46,XX (81,8%)	45,X (5,8%)/47,XXX (4,6%)/46,XX (89,7%)
G16	46,XX	45,X (4,4%)/47,XXX (3,4%)/46,XX (92,3%)
G17	45,X (93,3%)/47,XXX (5%)/46,XX (1,7%)	45,X (3,2%)/46,XX (96,8%)
G18	45,X (34,8%)/46,XX (65,2%)	45,X (44,2%)/46,XX,del <i>SHOX</i> (55%)/46,XX (0,8%)
G19	45,X (10%)/47,XXX (2,5%)/46,XX (87,5%)	45,X (7%)/47,XXX (1%)/46,XX (92%)

G20	47,XXY (17,9%)/46,XY (82,1%)	47,XXY (13,4%)/46,XY (86,6%)
G22	45,X (13,3%)/47,XXX (10%)/46,XX (76,7%)	45,X (4,5%)/47,XXX (1%)/46,XX (94,5%)
G23	45,X (80%)/46,Xi(X)(q10) (20%)	45,X (87,2%)/46,Xi(X) (12,8%)
G24	47,XXX (5,3%)/46,XX (94,7%)	46,XX
G25	45,X (48,3%)/45,XX,-18 (7%)/46,XX (44,8%)	45,X (56%)/46,XX (44%)
G26	45,X (12,5%)/46,XY,del(Y)(q11.2) (87,5%)	45,X (25%)/46,XY,del(Y)(q11.2) (75%)

Pri hodnotení mozaicizmu autozómov bola zachytená mozaika v ôsmich z 12 (66 %) prípadov približne s rovnakým percentuálnym zastúpením medzi výsledmi karyotypu a metódy FISH. Ostatné výsledky ako naznačuje Tabuľka 23 sa od seba líšia percentuálnym zastúpením jednotlivých bunkových línií.

U pacienta A15 sa nehodnotili percentuálne zastúpenia bunkových línií pri metóde FISH so všetkými vyšetrenými bunkami (jadrá a mitózy), ale vytvorila sa samostatne Tabuľka 24 s porovnávaním percentuálneho záchytu mozaiky medzi karyotypom a metódou FISH iba s vyšetrenými mitózami, z dôvodu relevantnejšieho porovnania. Keďže sa na jadrách nedalo odlíšiť bunkovú líniu 46,XY,r(22) a 46,XY, pretože obe niesli dve sondy na chromozóme 22. V Tabuľka 24, u pacienta A15, je možné vidieť približne rovnaký percentuálny záchyt mozaiky.

Tabuľka 23. Porovnanie percentuálneho zastúpenia bunkových línií z karyotypu a metódy FISH u vybraných pacientov s mozaikami autozómov. Zeleným políčkوم sú označení pacienti, ktorí majú približne rovnaký záchyt mozaiky a oranžovým sú označení pacienti, ktorí majú diametrálne odlišné výsledky. N/A (biele políčka) – pacient nebol porovnávaný

Číslo pacienta	Výsledky karyotyp - periférna krv	Výsledky FISH - periférna krv
A1	47,XX,+mar (37,14%)/46,XX (62,86%)	47,XX,+der(8) (52%)/46,XX (48%)
A2	46,XY	46,XY,der(2)t(2;15) (30%)/46,XY (70%)
A3	45,X (5,3%)/47,XX,+21 (5,3%)/46,XX (89,5%)	46,XX
A4	47,XX,+mar (35%)/46,XX (65%)	47,XY,+der(19) (37,9%)/46,XX (62,1%)
A5	47,XY,+8 (70%)/46,XY (30%)	45,X (4,0%)/47,XY,+8 (50,1%)/46,XY (45,9%)
A6	47,XY,+mar (18,19%)/46,XY (81,81%)	47,XY,+mar (11,9%)/46,XY (88,1%)
A8	47,XY,+mar (82,9%)/46,XY (17,1%)	47,XY,+der(8) (79,6%)/46,XY (20,4%)
A9	46,XX,der(7) (16%)/46,XX (84%)	46,XX,der(7) (13%)/46,XX (87%)
A10	45,X (69%)/47,XY,+21 (31%)	45,X (76,6%)/47,XY,+21 (23,4%)
A14	47,XY,+invdup(5)(pterp15.1) (26,3%)/46,XY (73,7%)	47,XY,+inv dup(5)(pterp15.1) (15,8%)/46,XY (84,2%)
A15	46,XY,r(22) (80%)/45,XY,-22 (20%)	46,XY,r(22) (0,3%)/45,XY,-22 (2,6%)/46,XY (97,1%)

A16	45,XY,der(13;18)(p11.2;q11.1) (28%)/46,XY (72%)	45,XY,der(13;18)(p11.2;q11.1) (21,1%)/46,XY (78,9%)
A18	46,XY,dup(5)(p14.2p15.33) (40,74%)/46,XY (59,26%)	46,XY,dup(5)(p14.2p15.33)/46,XY
A19	47,XX,+21 (20%)/46,XX (80%)	47,XX,+21 (18,7%)/46,XX (81,3%)

Tabuľka 24. Porovnanie percentuálneho zastúpenia bunkových línií z karyotypu a metódy FISH (mitózy) u pacienta A15. M - mitózy

Číslo pacienta	Výsledky karyotyp - periférna krv	Výsledky FISH (M) - periférna krv
A15	46,XY,r(22) (80%)/45,XY,-22 (20%)	46,XY,r(22) (72,6%)/45,XY,-22 (2%)/46,XY (25,4%)

5.2.2 Percentuálny záchyt mozaiky metódou FISH (mitózy vs. jadrá)

Pri porovnávaní výsledkov percentuálneho záchytu mozaicizmu medzi jadrami a mitózami metódy FISH boli vybraní do Tabuľka 25 iba pacienti, ktorých bolo možné hodnotiť na základe dostatočného množstva získaných dát. Celkovo sa jednalo o 21 pacientov s mozaikami gonozómov a 8 pacientov s mozaikami autozómov. V prípade mozaicizmu gonozómov sa zaznamenali približne rovnaké výsledky percentuálneho záchytu mozaiky medzi jadrami a mitózami v 18 z 21 prípadov (86 %). Čo sa týkalo mozaicizmu autozómov, kde bol nižší počet porovnávaných pacientov, sa získala približná zhoda medzi jadrami a mitózami v šiestich z ôsmich prípadov (75 %).

Tabuľka 25. Porovnanie percentuálneho zastúpenia bunkových línií u metódy FISH medzi jadrami a mitózami u vybraných pacientov. Zeleným políčkom sú označení pacienti, ktorí majú približne rovnaký záchyt mozaiky a oranžovým sú označení pacienti, ktorí majú diametrálne odlišné výsledky. Pri každom výsledku je uvedený počet hodnotených jadier/mitóz

Číslo pacienta	Výsledky FISH (jadrá) - periférna krv	Počet hodnotených jadier	Výsledky FISH (mitózy) - periférna krv	Počet hodnotených mitóz
MOZAIKY GONOZÓMOV				
G1	45,X (29%) / 46,XX (71%)	537	45,X (22,9%) / 46,XX (77,1%)	140
G3	45,X (4,6%) / 47,XXX (2,3%) / 48,XXXX (1,1%) / 46,XX (92,1%)	656	45,X (2,3%) / 47,XXX (3,8%) / 46,XX (93,9%)	131
G4	45,X (73,8%) / 46,X,r(X) (26,2%)	426	45,X (72,7%) / 46,X,r(X) (27,3%)	138
G5	45,X (11,4%) / 47,XXX (1,1%) / 46,XX (87,6%)	668	47,XXX (7,7%) / 46,XX (92,3%)	13
G6	45,X (3,1%) / 46,XX (96,9%)	97	45,X (25%) / 46,XX (75%)	4
G7	45,X (4,7%) / 47,XXX (0,5%) / 46,XX (94,8%)	614	45,X (3,3%) / 46,XX (96,7%)	92
G8	45,X (6,1%) / 47,XXX (2,5%) / 46,XX (91,4%)	394	47,XXX (10%) / 46,XX (90%)	10
G9	45,X (0,4%) / 48,XXX (0,2%) / 46,XX (93,5%) / 46,XY (6%)	553	46,XX, (96,1%) / 46,XY (3,9%)	155
G10	45,X (7,5%) / 47,XXX (1,7%) / 46,XX (90,8%)	358	45,X (10,1%) / 49,XXXXX (0,9%) / 46,XX (89%)	109
G11	45,X (10%) / 47,XXX (1,2%) / 46,XX (88,9%)	260	45,X (15,4%) / 47,XXX (7,7%) / 46,XX (76,9%)	13
G12	45,X (7,6%) / 47,XXX (1,1%) / 46,XX (91,3%)	460	45,X (6,1%) / 47,XXX (1,3%) / 46,XX (92,6%)	149
G13	45,X (8,1%) / 47,XXX (8,4%) / 46,XX (83,6%)	359	47,XXX (7,7%) / 46,XX (92,3%)	13
G14	45,X (8,7%) / 47,XXX (2,9%) / 48,XXXX (0,2%) / 49,XXXXXX (0,1%) / 46,XX (88,1%)	1102	45,X (5%) / 47,XXX (2,1%) / 46,XX (92,9%)	140
G15	45,X (6,3%) / 47,XXX (3,3%) / 46,XX (90,4%)	271	45,X (3,4%) / 47,XXX (10,2%) / 46,XX (86,4%)	59
G16	45,X (4,4%) / 47,XXX (3,3%) / 46,XX (92,3%)	364	45,X (4,3%) / 47,XXX (4,3%) / 46,XX (91,3%)	23
G17	45,X (3,3%) / 47,XXX (0,4%) / 46,XX (96,3%)	701	45,X (1,8%) / 46,XX (98,2%)	55
G18	46,XX,del SHOX (57,6%) / 45,X (41,6%)	231	46,XX,del SHOX (34,5%) / 45,X (65,5%)	29
G19	45,X (8%) / 47,XXX (0,7%) / 46,XX (91,3%)	426	47,XXX (3,7%) / 46,XX (96,3%)	54
G20	47,XXY (15 %) / 46,XY (85%)	604	47,XXY (6,6%) / 46,XY (93,4%)	136
G24	45,X (1,1%) / 47,XXX (0,5%) / 48,XXXX (1,1%) / 46,XX (97,3%)	373	48,XXXX (0,9%) / 46,XX (99,1%)	106
G25	45,X (56,7%) / 46,XX (43,3%)	573	45,X (45%) / 46,XX (55%)	40
MOZAIKY AUTOZÓMOV				
A1	47,XX,+der(8) (52,8%) / 46,XX (47,2%)	897	47,XX,+der(8) (58,4%) / 46,XX (41,6%)	77
A5	45,X (4,4%) / 47,XY,+8 (48,2%) / 46,XY (47,4%)	1002	47,XY,+8 (69,4%) / 46,XY (30,6%)	98
A6	47,XY,+mar (14,1%) / 46,XY (85,9%)	505	47,XY,+mar (11,5%) / 46,XY (88,5%)	85
A8	47,XY,+der(8) (78,2%) / 46,XY (21,8%)	482	47,XY,+der(8) (83,97%) / 46,XY (16,03%)	156
A10	45,X (76%) / 47,XY,+21 (24%)	328	45,X (78,4%) / 47,XY,+21 (21,6%)	125
A14	47,XY,+inv dup(5)(pter;15p15.1)(13,2%) / 46,XY (86,8%)	409	47,XY,+inv dup(5)(pter;15p15.1) (24,6%) / 46,XY (75,4%)	122
A15	46,XY,r(22) (0,2%) / 45,XY,-22 (2,7 %) / 46,XY (97,1%)	415	46,XY,r(22) (72,6%) / 45,XY,-22 (2%) / 46,XY (24,5 %)	51
A19	45,X,-21 (2,6%) / 47,XX,+21 (18,4%) / 46,XX (78%)	425	47,XX,+21 (18,81%) / 46,XX (81,19%)	101

5.3 Výsledky array CGH

Pomocou metódy array CGH sa získali výsledky z periférnej krvi u pätnástich pacientov. Výsledky u jednotlivých pacientov sú zhrnuté v Tabuľka 26. Našli sa rôzne zmeny v počte kópií a štrukturálne zmeny v mozaikovej forme detekované pomocou array CGH.

U štyroch pacientov s mozaikami gonozómov boli získané výsledky pomocou metódy array CGH. Namerané hodnoty SD u pacientky G18 s použitím platformy 4x44K sú v Tabuľka 27. Pacientka G18 pri použití platformy 8x60K mala proti ženskej referencii nájdenú deléciu chromozómu X. Proti mužskej kontrole sa výsledok javí naopak ako duplikácia chromozómu X. Navyše u tejto pacientky sa našla delécia na chromozóme X v časti obsahujúcej gén *SHOX*. Výsledky pacientky G18 s použitím platformy 8x60K sú v Tabuľka 28. V prílohe 1 je možné vidieť výstupný obrázok z array CGH pacientky G18. Výsledok array CGH u pacientky G19 proti ženskej referencii ukázal normálny ženský profil, chromozóm bez známk mozaiky. Rovnaký výsledok sa zaznamenal aj proti mužskej referencii, kde mozaikový algoritmus zachytil dva normálne chromozómy X. Výsledok u pacienta G20 značil duplikáciu chromozómu X. U probanda G21 sa zistila štruktúra izodicentrického chromozómu Y.

U jedenástich pacientov s mozaikami autozómov boli získané výsledky metódou array CGH ako je vidieť v Tabuľka 26. Pacientke A1 bola nájdená intersticiálna duplikácia zahŕňajúca centroméru chromozómu 8. U pacienta A2 bola nájdená terminálna delécia chromozómu 2 a duplikácia chromozómu 15. V prípade pacientky A3 sa našiel normálny ženský profil. Pacientke A4 bola nájdená intersticiálna duplikácia zahrňujúca centroméru chromozómu 19. U pacientky A9 sa zistilo, že ide o balancovanú aberáciu a nezaznamenali sa znížené ani zvýšené hodnoty SD. Pri pacientovi A10 sa zistila strata Y chromozómu. U pacienta A11 sa zistila duplikácia pericentrickej oblasti chromozómu 2 obsahujúca časť krátkych a dlhých ramienok. Pacientke A12 bola odhalená amplifikácia v oblasti krátkych ramien chromozómu 13 alebo 21. U pacienta A13 sa zistila nebalancovaná translokácia medzi chromozómom 3 a 8. Nález u pacienta A14 predstavuje mozaiku s duplikáciou v oblasti 5p. Konkrétne sa našla terminálna duplikácia oblasti 5p15.33 až 5p15.1. U posledného pacienta (A16) výsledok array CGH ukázal deléciu celých krátkych ramien chromozómu 18 v mozaike. Výsledky nameraných SD hodnôt s percentuálnym zastúpením buniek sú v Tabuľka 27.

Tabuľka 26. Výsledky u pacientov získané pomocou array CGH

Číslo pacienta	Výsledky array - periférna krv	Kód čipu na array CGH
G18	arr[hg19] Xp22.33q28(1314894_15481455)x1[0.6]	251495022935_1_3
	arr[hg19] Xp22.33p11.21(60701_58081470)x1[0.6], Xp22.33(310932_792186)x1[0.8], Xq11.1q28(61931689_155208244)x1[0.6]	253174640138_2_3_B (ref. ženská)
	arr[hg19] Xp22.33p11.21(60701_58081470)x1[0.25], Xp22.33(310932_792186)x1[0.8], Xq11.1q28(61931689_155208244)x1[0.25]	253174640138_2_3_B (ref. mužská)
G19	arr(1-22,X)x2	253174640138_2_3_A
G20	arr[hg19] Xp22.33q28(546956_155140420)x2[0.15]	251495022935_1_2
G21	arr[hg19] Yp11.32q11.221(119796_19538915)x2, Yq11.222q12(20826207_59034049)x0	253174636309_2_4
A1	arr[hg19] 8p21.3q21.11(20125568_75789738)x3[0.6]	253174813077_1_2_B
A2	arr[hg19] 2q37.3(241522903_243068396)x1, 15q26.2q26.3(97649828_102461201)x3 [0.4]	253174813722_1_3_A
A3	arr(1-22,X)x2	253174634641_1_2_B
A4	arr[hg19] 19p12q13.32(20346239_45904947)x3[0.5]	253174813702_1_3_B
A9	arr(1-22,X)x2	251495022935_1_1
A10	rr[hg19] Yp11.31q11.223(2723745_24874360)x0[0.7]	251495022935_1_4
A11	arr[hg19] 2p11.2q11.2(85685502_102327492)x3[0.65]	253174636309_2_3
A12	arr[hg19] 13p11.1/21p11.1(10864216_11176284)x3[0.6]	252458516386_B
A13	arr [hg19] 3q26.33q29(179553401_197837020)x3[0.7], 8p23.3 (191560_194647)x1[0.6]	N/A
A14	arr[hg19] 5p15.33p15.1(50093_15009591)x3[0.3]	25317468951_2_2
A16	arr[hg19] 18p11.32p11.21(148963_14081887)x1[0.3]	253174623280_2_3

Tabuľka 27. Namerané hodnoty SD pomocou array CGH u vybraných pacientoch. U pacienta G20 hodnota SD nedosahovala do *cut off* hranice, ktorú sme museli zapísať manuálne a nie prostredníctvom softwaru. N/A – hodnota nebola nameraná

Číslo pacienta	Lokus chromozómu	Nameraná hodnota SD	% zastúpenie buniek
G18 (4x44K)	Xp	-0,512	59%
	Xq	-0,517	60%
	SHOX	N/A	N/A
G20	Xp	0,2	15%
	Xq	0,198	15%
A1	8p	0,372	59%
	8q	0,366	57%
A10	Yp	-1,8	71%
	Yq	-2	75%
A12	13/21	0,207	61%
A13	3q	0,425	69%

	8p	-0,478	56%
A14	5p	0,176	26%
A16	18p	-0,216	28%

Tabuľka 28. Namerané hodnoty SD pri pacientke G18 a G19 pomocou array CGH z platformy 8x60K Agilent proti ženskej referencii a proti mužskej referencii

Číslo pacienta	Lokus chromozómu	SD (proti ženskej referencii)	% zastúpenie buniek	SD (proti mužskej referencii)	% zastúpenie buniek
G18	Xp	-0,536	62%	0,305	77%
	Xq	-0,505	59%	0,303	77%
	SHOX	-0,749	81%	-0,749	81%
G19	Xp	0	100%	0,803	26%
	Xq	0	100%	0,804	25%

5.4 Výsledky biologických materiálov

V Tabuľka 29 sú zhrnuté výsledky zo všetkých získaných tkanív pacientov. Výsledky boli získané metódou FISH a metódou karyotypu. Porovnávali sa výsledky z periférnej krvi, bukálnej sliznice a kožných fibroblastov.

Tabuľka 29. Výsledky jednotlivých tkanív získané metódou FISH a karyotypom u vybraných pacientov. Biele políčka odlišujú výsledky vyšetrenia karyotypom. N/A – pacient nebol vyšetrený

MOZAIKY GONOZÓMOV			
Číslo pacienta	Výsledky FISH - periférna krv	Výsledky FISH - bukálny šter	Výsledky FISH - fibroblasty
G2	45,X (14,5%)/46,XX (85,5%)	45,X (12,7%)/46,XX (87,3%)	N/A
G9	46,XX (94%)/46,XY (6%)	46,XX (100%)	N/A
MOZAIKY AUTOZÓMOV			
A1	47,XX,+der(8) (52%)/46,XX (48%)	45,X (6,7%)/47,XX,+der(8) (32,8%)/46,XX (60,5%)	N/A
A2	46,XY,der(2)(2;15) (30%)/46,XY (70%)	46,XY,del(2)(2qter) (26,7%)/46,XY (73,3%)	N/A
A7	N/A	47,XX,+der(3) (22,9%)/46,XX (77,1%)	47,XX,+der(3) (30,8%)/46,XX (69,2%)
A10	45,X (76,6%)/47,XY,+21 (23,4%)	N/A	45,X (73%)/47,XY,+21 (27%)
A14	47,XY,+inv dup(5)(5pter;15p15.1) (15,8%)/46,XY (84,2%)	47,XY,+inv dup(5)(5pter;15p15.1) (64,7%)/46,XY (35,3%)	N/A
A15	46,XY,t(22) (0,3%)/45,XY,-22 (2,6%)/46,XY (97,1%)	45,XY,-22 (4,6%)/46,XY (95,4%)	N/A
A19	47,XX,+21 (18,7%)/46,XX (81,3%)	47,XX,+21 (43,8%)/46,XX (56,2%)	N/A
MOZAIKY AUTOZÓMOV			
Číslo pacienta	Výsledky karyotyp - periférna krv	Výsledky FISH - bukálny šter	Výsledky karyotyp - fibroblasty
A1	47,XX,+mar (37,14%)/46,XX (62,86%)	45,X (6,7%)/47,XX,+der(8) (32,8%)/46,XX (60,5%)	N/A
A10	45,X (69%)/47,XY,+21 (31%)	N/A	45,X (80,3%)/47,XY,+21 (19,7%)
A17	46,XY,inv dup(3)(q26.3q29) (84,6%)/46,XY (15,4%)	46,XY,inv dup(3)(q26.3q29) (72,8%)/46,XY (27,2%)	N/A

5.5 Výsledky arteficiálne vyrobených mozaik

5.5.1 Vyšetrenie arteficiálne vyrobených mozaik karyotypom

Karyotypy boli vyšetrené u štyroch arteficiálne vyrobených mozaik (A-D). U arteficiálne vyrobenej mozaiky E nebol karyotyp hodnotený. V Tabuľka 30 je možné vidieť percentuálne vyjadrenie výsledku karyotypu a počet mitóz, ktoré sa hodnotili pri každej arteficiálne vyrobenej mozaike. Pomery v akých boli namiešané arteficiálne vyrobené mozaiky sú spomenuté v kapitole 4. Materiál a metódy.

Arteficiálne vyrobená mozaika D ukázala neočakávaný výsledok v podobe monozómie X. U ostatných sa táto bunková línia nezachytila. Arteficiálne vyrobená mozaika A vyšla s odlišným pomerom ženskej bunkovej línie a mužskej bunkovej línie než ako bola pôvodne namiešaná. Arteficiálne vyrobená mozaika B vyšla približne rovnako ako bol namiešaný pomer týchto dvoch bunkových línií. U arteficiálne vyrobenej mozaiky C bola zachytená bunková línia 46,XX s 20% vyšším pomerom ako sa pôvodne namiešalo. Pri arteficiálne vyrobenej mozaike D výsledok pomeru na karyotype vyšiel približne rovnako ako očakávaný pomer týchto dvoch bunkových línií.

Tabuľka 30. Výsledky karyotypu arteficiálne vyrobených mozaik (A-E). N/A – karyotyp nebol vyšetrený

Typ mozaiky	Výsledky karyotyp (%)	Počet hodnotených mitóz
Arteficiálna mozaika A	46,XX (72%)/46,XY (28%)	25
Arteficiálna mozaika B	46,XX (14%)/46,XY (86%)	21
Arteficiálna mozaika C	46,XX (43%)/46,XY (57%)	21
Arteficiálna mozaika D	45,X (9,5%)/46,XX (81%)/46,XY (9,5%)	21
Arteficiálna mozaika E	N/A	N/A

5.5.2 Vyšetrenie arteficiálne vyrobených mozaik metódou FISH

V prípade vyšetrenia arteficiálne vyrobených mozaik (A-E) metódou FISH sa získali výsledky u všetkých typoch namiešaných mozaik pri použití sondy XYcen. K tomu sa získali výsledky samotnej sondy Xcen, pričom u arteficiálne vyrobenej mozaiky D sa použila sonda Xq27.1, ktorá pre účely porovnávania záchytu mozaiky a získanie výsledkov pomocou samotnej sondy na chromozóme X je relevantná. U arteficiálne vyrobenej mozaiky E bol získaný výsledok FISH s použitím sondy SHOX. Aby sa mohol porovnať záchyt mozaiky

medzi jadrami a mitózami, Tabuľka 31 je rozdelená na výsledky jadier a mitóz, pričom pri každom výsledku je uvedený počet hodnotených jadier/mitóz pre získanie lepšieho prehľadu o záchytech mozaiky. Pri všetkých (100 %) výsledkoch metódy FISH z hodnotených jadier a mitóz sa získali približne rovnaké percentuálne zastúpenia pomeru, v akom boli arteficiálne vyrobené mozaiky namiešané.

Tabuľka 31. Výsledky arteficiálne vyrobených mozaik (A-E) získané pomocou metódy FISH za použitia štyroch rôznych sond. Tabuľka je rozdelená na výsledky získané z jadriec a mitóz

SONDA XYcen - X červená a Y zelená (Cytocell)					
Typ mozaiky	Výsledky FISH - jadrá	Výsledky FISH - jadrá (%)	Výsledky FISH - mitózy	Výsledky FISH - mitózy (%)	
Arteficiálna mozaika A	46,XX[148]/46,XY[388]	46,XX (28%)/46,XY (72%)	46,XX[15]/46,XY[33]	46,XX (31%)/46,XY (69%)	
Arteficiálna mozaika B	46,XX[100]/46,XY[780]	46,XX (11%)/46,XY (89%)	46,XX[3]/46,XY[33]	46,XX (8%)/46,XY (92%)	
Arteficiálna mozaika C	46,XX[68]/46,XY[299]	46,XX (19%)/46,XY (81%)	46,XX[22]/46,XY[53]	46,XX (29%)/46,XY (71%)	
Arteficiálna mozaika D	46,XX[873]/46,XY[82]	46,XX (91%)/46,XY (9%)	46,XX[70]/46,XY[8]	46,XX (90%)/46,XY (10%)	
Arteficiálna mozaika E	46,XX[280]/46,XY[238]	46,XX (54%)/46,XY (46%)	46,XX[22]/46,XY[17]	46,XX (56%)/46,XY (44%)	
SONDA Xcent - X zelená (Cytocell)					
Typ mozaiky	Výsledky FISH - jadrá	Výsledky FISH - jadrá (%)	Výsledky FISH - mitózy	Výsledky FISH - mitózy (%)	
Arteficiálna mozaika A	46,XX[154]/46,XY[427]	46,XX (27%)/46,XY (73%)	46,XX[15]/46,XY[35]	46,XX (30%)/46,XY (70%)	
Arteficiálna mozaika B	46,XX[21]/46,XY[162]	46,XX (11%)/46,XY (89%)	46,XX[1]/46,XY[10]	46,XX (9%)/46,XY (91%)	
Arteficiálna mozaika C	46,XX[58]/46,XY[203]	46,XX (22%)/46,XY (78%)	46,XX[4]/46,XY[12]	46,XX (25%)/46,XY (75%)	
Arteficiálna mozaika E	46,XX[146]/46,XY[132]	46,XX (53%)/46,XY (47%)	46,XX[7]/46,XY[6]	46,XX (54%)/46,XY (46%)	
SONDA Xq27.1 - červená (BlueGnome)					
Typ mozaiky	Výsledky FISH - jadrá	Výsledky FISH - jadrá (%)	Výsledky FISH - mitózy	Výsledky FISH - mitózy (%)	
Arteficiálna mozaika D	46,XX[186]/46,XY[38]	46,XX (83%)/46,XY (17%)	46,XX[16]/46,XY[3]	46,XX (84%)/46,XY (16%)	
SONDA SHOX (Cytocell)					
Typ mozaiky	Výsledky FISH - jadrá	Výsledky FISH - jadrá (%)	Výsledky FISH - mitózy	Výsledky FISH - mitózy (%)	
Arteficiálna mozaika E	46,XX[149]/46,XY[137]	46,XX (52%)/46,XY (48%)	46,XX[25]/46,XY[30]	46,XX (45%)/46,XY (55%)	

6 Diskusia

Identifikácia mozaiky gonozómov a autozómov hrá kľúčovú úlohu pri prognóze a liečbe pacientov. Z tohto dôvodu je potenciálne klinicky dôležité aj odhalenie chromozómovej mozaiky s nízkou úrovňou.

V práci boli použité na záchyt mozaicizmu podľa klinickej indikácie pacientov metódy karyotypovania, ďalšou metódou bola FISH a v niektorých prípadoch sa urobila array CGH. Snažila som sa na základe porovnávania výsledkov pacientov zistiť, či sa výsledky jednotlivých metód líšia a z akého dôvodu, ktorá metóda má citlivejší záchyt, rozdiely v presnosti určenia stupňa mozaicizmu medzi metódami, rovnako ako aj medzi použitým biologickým materiálom. Na určenie presnosti záchytu mozaiky slúžili aj arteficiálne vyrobené mozaiky.

6.1 Porovnávanie výsledkov karyotyp vs. FISH

Mozaicizmus gonozómov

Získané údaje v našej práci ukazujú, že v prípade výsledkov mozaicizmu gonozómov sa líšia vyšetrenia medzi karyotypom a metódou FISH z periférnej krvi u deviatich z 23 (40 %) pacientov, pričom sa neberie do úvahy záchyt odlišných bunkových línií, ale len percentuálne zastúpenie porovnávaných bunkových línií. Keď zahrnieme do výsledkov okrem odlišného percentuálneho záchytu aj odlišný záchyt bunkových línií ukážu sa rozdiely u 15 z 23 (65 %) pacientov.

V prvej spomenutej štúdií použitím analýzy FISH autori ABULHASAN *et al.* (1999) potvrdili výsledky karyotypu u 8 z 22 (36 %) prípadov u pacientiek s mozaikou TS, identifikovali tretiu bunkovú líniu v 14 (64 %) prípadoch, určili pôvod piatich (23 %) marker chromozómov X a našli del (Y) v dvoch (9 %) prípadoch s 45,X/46,XY karyotypom. V našom súbore pacientiek sa zhodovali výsledky v prípade bunkovej línie s mozaikou TS medzi metódou FISH a karyotypom u 18 z 20 (90 %) pacientiek. Identifikovala sa tretia bunková línia v desiatich z 20 (50 %) prípadov. Pri mozaicizme gonozómov sa nevyskytol žiadny prípad marker chromozómu. V našej práci sa v súbore pacientiek s mozaikou TS našla u jednej pacientky metódou FISH delécia Xp zahŕňajúca gén *SHOX*.

V druhej podobnej štúdií autori OKADA *et al.* (2001) porovnávali detekciu pohlavného chromozómu X karyotypom a uskutočnili analýzy metódou FISH s použitím sond špecifických pre pohlavné chromozómy. Desať pacientiek vykazovalo mozaiku pohlavných chromozómov a sedem vykazovalo mozaiku s markerovými chromozómami. Všetkých 17 pacientiek súhlasilo s analýzou FISH. FISH potvrdila mozaiku u 88,2 % týchto pacientiek (15 zo 17). Nízko-frekvenčný mozacizmus, ktorý vykazoval frekvenciu nižšiu ako 10% na karyotype sa ukázal analýzou FISH bez prítomnosti mozaiky. V našom súbore sa objavilo 10 pacientiek s mozaicizmom gonozómov pod 10 % (od 2,5 % do 9 %) pomocou karyotypu, pričom metóda FISH potvrdila výsledky u deviatich pacientiek (u pacientky G17 sa nenašla trizómia X). Autori v článku navrhujú, že analýza metódou FISH by sa mala aplikovať, ak má mozaika na karyotype zistenú frekvenciu nižšiu ako 10%. Analýza FISH sa tiež indikuje, keď sa karyotypom detekuje markerový chromozóm. Rovnako ako v tomto článku, kde sa karyotyp javil ako falošne pozitívny, sa v súbore našich pacientov objavil podobný prípad (pacientka G24). Jednalo sa o to, že FISH nepreukázala mozaiku, na rozdiel od karyotypu, ktorým sa detekovala trizómia v dvoch mitózach (5,3 %) buniek. FISH uzavrela mozaiku ako nepreukázanú, keďže celkom bolo vyšetrených 106 mitóz – na jednej z nich bola nájdená tetrazómia chromozómu X (nedá sa vylúčiť, že sa jednalo o chybu metódy) a z celkového počtu 373 vyšetrených jadier boli nájdené štyri monozomické jadrá (1,1 %), dve trizomické (0,5 %) a štyri tetrazomické jadrá (1,1 %). Hodnotenie mozaiky metódou FISH pri nízkom zastúpení bunkových línií bude spomínané nižšie.

Tretia štúdia od autorov FERNÁNDEZ *et al.* (1996) sa zamerala na vyšetrenie 25 pacientiek, ktoré mali TS a ktoré boli predtým podrobené analýze pomocou karyotypu. Použití metódy FISH sa pozoroval väčší počet žien s mozaikami TS, ako boli zistené cytogenetickými metódami. Dôvodom bola hlavne prítomnosť samotnej normálnej bunkovej línie 46,XX. V porovnaní s naším získaným súborom pacientiek som zaznamenala rovnaký trend, kedy sa odhalilo 21 pacientiek s mozaikami TS metódou FISH a 18 pacientiek na karyotype. Pričom sa taktiež zaznamenala v jednom prípade samotná normálna bunková línia 46,XX. V spomenutej tretej štúdií najčastejšou mozaikou bola 45,X/46,XX (36 %) prítomnosť izochromozómov predstavovala 24 % a marker chromozómy 12 %. Autori článku píšú, že aplikácia FISH viedla k jasnejšej definícii chromozómových aberácií a identifikácii pôvodu marker chromozómov. V našej práci bola taktiež ako v tejto štúdií najčastejšia mozaika 45,X/46,XX u 13 z 23 (56 %) pacientiek, pričom päť z týchto 12 (42 %) pacientiek mali potvrdenú mozaiku 45,X/46,XX pomocou karyotypu súčasne s metódou FISH (jedna pacientka

nemala vykonané vyšetrenie karyotypom, preto sa nehodnotila). Izochromozóm Y ani marker chromozóm sa v prípade žien s TS v našom súbore neobjavil. Ale objavila sa bunková línia r(X) u jednej pacientky a bunková línia s i(X) u ďalšej pacientky. V prípade pacientky G16, kedy sa na karyotype nezachytila mozaika TS a metóda FISH odhalila mozaiku abnormálnymi bunkovými líniami 45,X (4,4 %) a 47,XXX (3,4 %), ktoré keďže mali percentuálne zastúpenie menej ako 5 %, nemuseli byť na karyotype zachytené.

Zaujímavé prípady zo súboru mozaicizmu gonozómov

Našli sa tri prípady (pacientka G3, G7, G17), kedy karyotyp zachytil (okrem monozómie X a normálnej bunkovej línie) trizómiu X a FISH ju nezachytila. Vo všetkých troch prípadoch je to spojené s odlišným percentuálnym zastúpením mozaiky, čo môže byť spôsobené práve odlišnosťou záchytu bunkových línií. Problém nastal u pacientky G3, keďže sa na karyotype objavila trizómia X v dvoch bunkách a pri celkovom hodnotení 20 mitóz sa výsledok javil ako 10% mozaika. Podobne u pacientky G7, trizómia X bola zistená v troch bunkách z 23 buniek. U pacientky G17 z hodnotených 60 buniek sa karyotypom zachytila jedna bunka s trizómiou X. FISH odhalila trizómiu, ale v celkovom počte stoviek buniek to neprekročilo hranicu pre nahlásenie, resp. išlo o desatiny percent buniek s trizómiou X. Je známe, že abnormalita sa nemusí uvádzať, ak percento abnormálnych buniek nespĺňa prah laboratória na jej hlásenie (mozaika pod 2 %) (HORSMAN *et al.* 1987).

Naopak FISH zachytila, okrem iných bunkových línií navyše bunkovú líniu 47,XXX pri troch pacientoch (G5, G11, G14) a karyotyp túto bunkovú líniu nezachytil. Všetky zachytené trizómie X v mozaike boli hraničné nízkofrekvenčné mozaiky (pod 3%), čo mohol byť problém záchytu tejto bunkovej línie na karyotype. Ak je predpokladaný výskyt nízkofrekvenčnej mozaiky je odporúčané urobiť metódu FISH, čo navrhujú autori VAN DYKE A WIKTOR (2003). K tomu u pacientky G14 bolo preukázané aj odlišné percentuálne zastúpenie monozómie X na karyotype (23,8 %) a FISH (8,3 %).

Pacientke G4 na základe výsledku vyšetrenia karyotypu bolo indikované vyšetrenie metódou FISH. Karyotyp zachytil, okrem monozómie X a suspektného kruhového chromozómu X, navyše normálnu bunkovú líniu v 17,4 % (v štyroch mitózach z hodnotených buniek). Pričom sa pri analýze metódou FISH normálne bunky nezachytili, keďže sa vyskytovali buď v nízkom počte oproti veľkému množstvu hodnotených buniek (564). Alebo by záchyt normálnej bunkovej línie prostredníctvom analýzy karyotypu mohol byť spôsobený

klonom normálnych mitóz, prípadne by mohlo ísť o to, že monozomické bunky mali chromozóm X získaný z inej mitózy.

U pacientky G8 sa naopak karyotypom nezachytila monozómia X a FISH naznačovala prítomnosť monozómie X v 5,9 % buniek. Avšak, ak sa pozrieme na výsledky FISH z jadier a mitóz, naznačujú, že jadrá (nepreukázaná monozómia X) a mitózy (prítomná monozómia X v 6,1 % buniek) sa líšia v záchytech mozaiky. V tomto prípade by nemalo ísť o prekryv signálov na jadrách, keďže sa vyšetrenie robilo pomocou sond SHOX (modré aj červené signály).

Pri pacientke G10 sa nepochybne líšia percentuálne zastúpenia bunkových línií, kde výsledku karyotypu je zastúpená monozómia X v 30,4 % buniek a normálna bunková línia 69,6 % a pri výsledku FISH je monozómia X (8,1 %) a normálna bunková línia (91,9 %). Odlišný percentuálny záchyt môže byť spôsobený, kvôli nízkemu počtu hodnotených mitóz (23), keďže sa v tomto prípade postupovalo pri karyotype podľa doporučení od HSU A BENN (1999), podľa ktorých, ak sú nájdené tri monozomické bunky, už sa nález nahlási (nedopočítava sa buniek) a uvažuje sa o analýze pomocou FISH.

U pacientky G18 karyotyp preukázal bunkovú líniu 45,X, pričom FISH našla okrem tejto bunkovej línie aj deléciu génu *SHOX*. Karyotyp deléciu nebol schopný zachytiť, keďže sa jednalo o submikroskopickú deléciu s veľkosťou necelých 500 kb. Ako sa uvádza, menšie zmeny alebo zmeny zahŕňajúce oblasti, ktoré sa ťažko vizualizujú nemusia byť detekované klasickými cytogenetickými technikami (LIGON *et al.* 1997). Z hľadiska percentuálneho záchytu mozaiky medzi karyotypom a metódou FISH sa môže považovať záchyt za podobný. U pacientky G18 sa navyše zaznamenal metódou FISH percentuálny rozdiel medzi jadrami a mitózami v prípade monozómie X, kde jadrá (41,6 %) sa viac zhodovali s karyotypom (34, %) oproti mitózam (65,5 %). Celkovo bolo hodnotených 29 mitóz a pre tento nízky počet, by sa nemuseli percentuálne zastúpenia mozaiky správne zachytiť. V prípade mozaiky metódou FISH sa odporúča hodnotiť minimálne 50 mitóz, tak ako je uvedené v postupe pre cytogenetické laboratórium ÚBLG FN Motol (IISOP_8UBLG_17/2013).

Pacientka G25 z dôvodu klinickej indikácie nízkeho veku (suspektný Turnerov syndróm) bola vyšetrená metódou FISH so sondami pre gén *SHOX*, pričom delécia sa nepotvrdila, ale našla sa monozómia chromozómu X. K tomu na karyotype bol zachytený chýbajúci chromozóm 18 v dvoch mitózach (7 %), ktorý ďalším vyšetrením metódou FISH nebol preukázaný a všetky bunky sa javili ako dizomické pre chromozóm 18.

U pacienta G26 sa preukázali odlišné percentuálne zastúpenia bunkových línií medzi karyotypom a metódou FISH. Vyšetрил sa karyotyp a z výsledku bolo jasné podozrenie aberáciu chromozómu Y. Z toho dôvodu bolo urobené vyšetrenie metódou FISH k upresneniu mozaiky a k určaniu počtu centromér na chromozóme Y. Odhalil sa izochromozóm krátkych ramien a pomocou centromerických sond bola potvrdená mozaika dvoch bunkových línií 46,X,derY a 45,X v pomere cca $75:25 = 3:1$ (jadra a mitózy). Z uvedeného pomeru vyplýva, že gén *SRY* je u pacienta zastúpený v cca o polovicu viac kópiách než u zdravého muža, naopak celé dlhé rameno chromozómu Y chýba a génu *SHOX* je o štvrtinu menej.

Tak ako sa potvrdilo v tomto prípade, metóda FISH je vhodnou metódou ku karyotypu na odhalenie všetkých aberantných bunkových línií. Pri metóde FISH sú mitózy obzvlášť užitočné pri podrobnejšom definovaní chromozómových aberácií v bunkách (aberantné alebo markerové chromozómy) (ZHAO *et al.* 1993).

Mozaicizmus autozómov

Pri hodnotení mozaicizmu autozómov sa zaznamenali medzi karyotypom a metódou FISH z periférnej krvi rozdiely u piatich z 13 pacientov (38,5 %). Jednalo sa o záchyt odlišných bunkových línií a iné percentuálne zastúpenie mozaiky.

Pomocou metódy FISH sa podarilo identifikovať marker chromozóm, ktorý sa našiel na karyotype a presne stanoviť percento mozaiky v troch prípadoch (pacient A1, A4, A8).

Zaujímavé prípady zo súboru mozaicizmu autozómov

Problém nastal u pacienta A6, u ktorého sa metódou FISH preukázala mozaika bunkovej línie obsahujúca nadpočetný chromozóm derivovaný z chromozómu 14 alebo 22. Keďže centroméry chromozómov 14 a 22 sú veľmi homológne, nedá sa na základe tohto vyšetrenia určiť pôvod marker chromozómu a doporučilo by sa vyšetrenie metódou SNP array CGH pre určenie pôvodu a veľkosti marker chromozómu a pre vylúčenie prípadnej UPD chromozómu 14 (v prípade, že by bol marker chromozóm pôvodom z chromozómu 14).

V prípade pacientky A9 sa na karyotype zaznamenal derivovaný chromozóm 7. Na jeho určenie sa použila metóda FISH s tromi rôznymi lokus-špecifickými sondami. Všetky oblasti použitých sond boli pri analýze prítomné na chromozóme 7 a tým pri hodnotení jadier neumožnili jasne odlíšiť derivovaný chromozóm od normálneho. Na mitózach bola možnosť derivovaný chromozóm odlíšiť vďaka jeho morfológii a odlišnému pomeru krátkych a dlhých ramien, pričom sa našli mitózy s dvomi kópiami normálneho chromozómu 7 a mitózy s jedným

normálnym a jedným aberantným chromozómom 7. Táto aberácia pravdepodobne zasahuje do iných oblastí než, na ktoré boli použité sondy špecifické. Z výsledkov array CGH sa usúdilo, že ide o balancovanú prestavbu. Pri metóde FISH je možné skúmať len niekoľko lokusov a nie je vhodným skriningovým nástrojom na analýzu niekoľkých lokusov naraz (LIGON *et al.* 1997). Sú známe array CGH techniky, ktoré majú schopnosť rozlíšenia v rámci celého genómu (ISHKANIAN *et al.* 2004). Tie by mohli byť riešením a slúžiť ako vhodný skriningový nástroj, čo bude ďalším predmetom diskusie.

Na karyotype pacienta A13 sa našiel derivovaný chromozóm 8. Z dôvodu, že išlo o nález nadbytočného materiálu neznámeho pôvodu na chromozóme 8, sa v prvom rade zvolila metóda array CGH, aby sa sonda, ktorá sa bude používať pri metóde FISH, dala určiť (ak ide známe chromozómy používa sa v prvom rade metóda FISH). Pri vyšetrení záchytu mozaiky by sa malo zvoliť správne poradie metód. Postup analýz pri niektorých typoch aberácií/derivácií si vyžaduje preferenčne určenie pôvodu materiálu. To znamená, že aká metóda sa použije je dané tým, aký je nález. V článku autori GRUCHY *et al.* (2008) navrhujú, aby výsledky array CGH boli vždy potvrdené inou technikou, ako je napríklad FISH. Taktiež spomínajú, že array CGH sa môže použiť buď pred alebo po stanovení chromozómového pôvodu pomocou metódy FISH. V článku od autorov DOUET-GUILBERT *et al.* (2008) sa uvádza, že ciele FISH techniky sa používajú ako druhá metóda na potvrdenie chromozómového pôvodu a/alebo objasnenie štrukturálnej aberácie.

U pacienta A15 sa narazilo na problém, kedy sa na jadrách metódou FISH nedali odlíšiť bunkové línie s kruhovým chromozómom 22 s normálnou bunkovou líniou. Dôvodom bolo, že obe bunkové línie niesli sondy na chromozóme 22. Monozómia 22 bola preukázaná celkom 2,6 % buniek, čo je na hranici metodologickej chyby. Karyotyp (80 %) sa zhodoval s mitózami (73 %) metódy FISH, kde bolo možné tieto línie hodnotiť.

6.1.1 Zhrnutie porovnávania karyotyp vs. FISH

Nesúlad medzi technikami detekcie mozaiky a rozdiely medzi jednotlivými analýzami môže komplikovať porovnanie klinických a diagnostických výsledkov alebo výsledkov výskumu. Identifikácia mozaiky je zvyčajne viacstupňový, rozsiahly proces, drahý a časovo náročný. Zvyčajne sa na rozpoznanie mozaiky používa viac ako jedna metóda. Nakoniec,

s klinickými a diagnostickými údajmi sa vyhodnotí korelácia genotypu a fenotypu s cieľom prediskutovať a/alebo predpovedať klinické dôsledky mozaiky.

Zo získaných výsledkov by som odporúčala pri podozrení na aneuploidiu gonozómov či mozaicizmus gonozómov prednostne použitie metódy FISH pred karyotypom, keďže poskytuje spoľahlivejšie výsledky a dokáže zachytiť mozaiku s nižším percentuálnym zastúpením.

Ukázalo sa, pri porovnávaní výsledkov medzi karyotypom a metódou FISH, že analýza metódou FISH je pri podozrení na mozaiku TS ideálnou metódou prvej voľby. Následne karyotyp slúži k vylúčeniu prítomnosti aberantných bunkových línií a na dôkladné vyšetrenie ostatných chromozómov. Napríklad pre prípad, ak by bola delécia chromozómu X prítomná mimo použitej sondy SHOX.

Predpokladá sa, že jediným spoľahlivým prístupom k detekcii sSMC prítomného v mozaike s nízkou úrovňou je karyotypovanie (LIEHR *et al.*, 2013). Z našich výsledkov som zistila, že v prípade mozaicizmu autozómov, ak sa jedná o materiál so známou aberáciou je jednoduchšie a presnejšie v prvej analýze použiť metódu karyotypovania a na jej upresnenie metódu FISH s vhodnou sondou, ktorá umožní presné odlíšenie jednotlivých bunkových línií. Ak materiál nie je známy je potrebné urobiť metódu array CGH na určenie pôvodu materiálu. Ak je podozrenie na prítomnosť mozaicizmu, okrem štandardných protokolov sa môžu analyzovať ďalšie bunky, iné tkanivá alebo použiť rôzne iné metódy vrátane analýzy FISH pomocou špecifických sond.

Odhalila som, na niektorých vyššie uvedených príkladoch, aspekty nepresnosti metód, ktoré sú dôležité, ak je prítomný mozaicizmus nízkeho stupňa. Keďže sa analýzy často vykonávajú na kultivovaných bunkách, detekcia mozaiky môže byť komplikovanejšia stratou alebo získaním abnormálnej bunkovej línie počas pasážovania bunkových kultúr (dlhodobé kultúry – v našom súbore sa kultivácia periférnej krvi nevykonávala), ktoré sa vykonávajú *in vitro* v laboratóriu, k tomuto zisteniu prispeli viaceré štúdie (BALLIF *et al.* 2006, THEISEN *et al.* 2009).

Ako problém pri metóde FISH sa ukázalo použitie niektorých sond, ktorými nebolo možné na jadrách odlíšiť sledované bunkové línie. Homológia chromozómov pri určovaní pôvodu marker chromozómu bola taktiež obmedzením metódy FISH. Naopak metóda FISH

spolu s vhodnou kombináciou sond pomohla odhaliť konkrétnu aberáciu chromozómu Y a zistiť pomer bunkových línií.

Bol zaznamenaný trend pozorovaný u autozómoch, kedy karyotyp súhlasil s vyšetrenými mitózami metódou FISH narozdiel od jadier. Tento fakt súvisí s prítomnosťou trizómie, ktorá môže poskytnúť bunke výhodu, a tým sa začne bunka rýchlejšie deliť a jadier s trizómiou je v takom prípade podstatne menej. Naopak boli zaznamenané prípady, kedy bolo prítomných viac trizomických jadier a trizómia nebola výhodou, ale prekážkou v delení bunky

6.2 Porovnávanie získaných výsledkov s metódou array CGH

Metóda array CGH sa získali výsledky od 15 pacientov, pričom potvrdila podobné výsledky u 10 z 12 (83 %) pacientov s metódou FISH. U troch pacientov (A11, A13, A12) nebolo urobené vyšetrenie metódou FISH a z toho dôvodu sa výsledky neporovnávali. U pacientky G19 sa mozaika nezachytila a u pacientky A9 sa nezistil percentuálny podiel mozaiky. Metódou array CGH sa podarilo identifikovať marker/derivovaný chromozóm z karyotypu u piatich pacientov zo šiestich, pričom u pacienta A12 nebolo možné marker chromozóm identifikovať. Štúdia ukázala (RAJCAN-SEPAROVIC *et al.* 2010), že array CGH zistila chromozómové aberácie v 29-50 % vzoriek z neúspešne kultivovaných bunkových línií, ktoré sa nedali analyzovať karyotypom, pričom 6 % týchto vzoriek malo submikroskopické aberácie. Preto sa array CGH odporúča ako preferovaná metóda na analýzu týchto z karyotypu nezistených zmien (MENTEN *et al.* 2009, ROBBERECHT *et al.* 2009, SHAFFER *et al.* 2012).

Mozaicizmus gonozómov

Metódou array CGH sa potvrdili podobné výsledky z karyotypu a metódy FISH u troch zo štyroch (75 %) pacientov v rámci vyšetrenia mozaicizmu gonozómov z periférnej krvi. U pacienta G21 metóda array CGH bližšie identifikovala karyotypom zachytenú mozaiku.

Pri pacientke G18 sa pri prvej analýze použila platforma 4x44K Agilent. Použitím tejto platformy nastal problém, pretože posledná diagnostická sonda na tomto čipe leží proximálne za génom *SHOX*, to znamená, že nie je schopná pokryť tento gén. V druhej analýze sa robilo vyšetrenie metódou array CGH s platformou s lepšou rozlišovacou schopnosťou (8x60K

Agilent), aby sa jednoznačne potvrdila prítomnosť delécie génu *SHOX*, ktorej prítomnosť sa zistila metódou FISH. Pri opakovaní array CGH s platformou s väčšou rozlišovacou schopnosťou sa použila proti pacientke mužská aj ženská referencia.

Pri použití ženskej referencie sa u pacientky ukázala prevaha sond so záporným *Log2Ratio*, čo značí chýbajúci X chromozóm. Bola zaznamenaná mierne znížená hladina SD pod 0 (pričom hodnota pre celkovú deléciu je -1). Väčší pokles SD pri výsledku Xp ($-0,536$) v porovnaní s Xq ($-0,505$) sa pripisuje tomu, že oblasť Xp zahŕňa gén *SHOX*, čo môže znížiť hladinu. Namerané hodnoty podľa vzorca pri monozómii X sú proti ženskej referencii približne 60 %.

Proti mužskej referencii sa výsledok javí naopak ako X chromozóm navyše a hodnoty SD sú kladné. Podľa upraveného vzorca výpočet *Log2Ratio* proti mužskej referencii ukazuje 23 %, ale jedná sa o duplikáciu (kladné hodnoty), preto sa hodnota musí prerátať z hľadiska záchytu delécie, čo vychádza 77 %.

Zaujímavým zistením je, ktorá referencia presnejšie zachytila mozaiku v prípade monozómie X. Z výsledkov je zrejmé, že obe percentuálne zastúpenia delécie chromozómu X sú značne vyššie v porovnaní s výsledkom karyotypu (35 %) a FISH (44,2 %), pričom presnejšie sa javí použitie ženskej referencie s výsledkom 60 %.

Navyše sa u tejto pacientky detekovala vo väčšine buniek terminálna delécia Xp22.33 (časť obsahujúca gén *SHOX*). Delécia génu *SHOX* je rovnako veľká proti ženskej aj proti mužskej referencii, má rovnaký počet bázy DNA, do ktorých zasahuje, podobne sa jedná o rovnaké hodnoty statusu SD (*Log2Ratio* je $-0,749$), čo značí v oboch prípadoch čiastočnú deléciu. V prípade delécie génu *SHOX* nerozhoduje aká je použitá referencia, keďže delécia leží v regióne PAR (pseudoautozomálne oblasti). PAR sú homologické oblasti oboch pohlavných chromozómov (teda chromozómu X aj chromozómu Y). Môže sa porovnať monozómia X spolu s deléciou génu *SHOX*, tým sa zistí, že metódou FISH je zastúpenie týchto línií v 99,2 % bunkách a výsledok metódy array CGH ukazuje proti ženskej referencii a proti mužskej referencii 81 %. Znamená to, že sa preukázala bunková línia 46,XX vo vyššom percentuálnom zastúpení ako sa očakávalo, rovnako to potvrdil výsledok SD, ktorého hodnota nemala -1 , ako by to bolo v prípade úplnej delécie génu *SHOX*. Ukázalo sa, že mohlo ísť o chybu metódy alebo o nadhodnotenie normálnej bunkovej línie 46,XX metódou array CGH.

Pacientka G19 metódou array CGH proti ženskej referencii preukázala dizómiu X, napriek záchytu mozaiky na karyotype (10% monozómia X a 2,5% trizómia X) a záchytu metódou FISH (7% monozómia X a 1 %trizómia X). Hodnota SD sa vyhodnotila ako 0 – zhoda ženských profilov.

Výsledok proti mužskej referencii predstavoval dizómiu X. Pri použití mužskej referencie vyšla podľa upraveného výpočtu *Log2Ratio* duplikácia chromozómu X s bunkovým zastúpením 75 %, po prepočítaní na hodnotu delécie sa získalo 25% zastúpenie monozómie X. V prípade ženskej vzorky (s prítomnosťou TS) proti ženskej referencii by mal byť pomer 2:1. Očakávaný pomer záchytu medzi pacientkou s TS a mužskou vzorkou bol 1:1. Hodnota SD proti mužskej referencii (0,803) dáva pomer (1,75:1), čo značí pomer medzi pomerom so zdravou ženskou vzorkou (2:1) a vzorkou s monozómiou X. So ženskou vzorkou vyšiel pomer 2:2.

V prípade pacientky G19 sa mohol vyskytnúť problém pri záchyte mozaiky proti ženskej aj proti mužskej referencii. Pokiaľ je prítomná v niektorých bunkách monozómia X a v iných bunkách trizómia X, znižuje sa schopnosť metódy array CGH zachytiť tieto línie, pretože sa analyzuje DNA zo všetkých izolovaných buniek vo zmesi. Čo by spôsobilo, že hybridizácia ženskej/mužskej referencie so ženskou vyšetrovanou vzorkou by poskytla nesprávny výsledok a namiesto monozómie X sa zachytila dizómia X. Keďže intezita fluorescencie sa meria podľa ziskov a strát a keď je prítomná aj trizómia X aj monozómia X, celkové množstvo DNA sa javí ako dizomické. Pravdepodobne bol väčší problém v prípade pacientky G19, a to v záchyte mozaiky s nízkou úrovňou (preukázaná na karyotype a metódou FISH) pomocou metódy array CGH. Tak ako sa ukázalo v štúdiu od autorov OLINICI (1975) z krvi, že keď sú vo vzorke prítomné monozomické a trizomické bunky pre ten istý chromozóm, ako je to vidieť v prípade našej pacientky G19, budú navzájom kompenzovať na oboch array CGH a brániť detekcii mozaiky.

V prípade oboch pacientiek (G18 a G19) pri analýze chromozómu X proti mužskej referencii môže byť komplikácia prítomnosť PAR regiónov. Tie sú všetky zahrnuté v mužskej referencii (sú v dvoch kópiách – na chromozóme X aj Y) a pôsobia, že sú prítomné aj v prípade delécie chromozómu X. To by mohlo spôsobiť vo výsledkoch, že podiel duplikácie chromozómu X je menej výrazný a hodnota SD nemusí správne naznačovať mozaiku.

Pacientovi G20 bola zistená duplikácia chromozómu X pomocou array CGH. Tento nález potvrdili výsledky z karyotypu a metódou FISH, v ktorých išlo konkrétne o trizómiu

47,XXY. Bolo vidieť posun SD do kladných hodnôt, čo značí duplikáciu, avšak SD aberácie nedosahovala ku *cut off* hranici softwaru pre detekciu duplikácie a bolo potrebné ju dopočítať manuálne. Po vyhodnotení percentuálneho zastúpenia buniek s aberáciou sa získala hodnota 15 %, čo približne odpovedá výsledku karyotypu (18 %) a metóde FISH (13 %). Pričom išlo o najnižšie zachytenú mozaiku (15 %) v našej práci pomocou metódy array CGH. Štúdie ukazujú, že array CGH dokáže detekovať mozaiky s hladinou 10-20 % (CONLIN *et al.* 2010).

Podľa výsledku karyotypu, kde sa pacientovi G21 zaznamenala mozaika monozómie X v 80 % buniek a bol zistený chýbajúci chromozóm Y sa vykonalo vyšetrenie pomocou array CGH. Pričom sa zistila duplikácia zahrňujúca celé krátke ramienka a časť dlhých ramienok chromozómu Y. U tohto pacienta nastal problém, keďže oblasť centroméry nebola pokrytá sondami, avšak vzhľadom k charakteristickému profilu výsledku vyšetrenia naznačujúcu štruktúru izodicentrického chromozómu Y sa môže do duplikácie zahrnúť. Z výsledkov vyšetrenia array CGH je možné usudzovať, že sa jedná o výskyt aberácie v mozaikovej forme, pričom presný podiel klonov s izodicentrickým chromozómom Y nie je známy. Neboli prítomné výsledky SD u duplikácie Y chromozómu, z ktorého by to bolo možné určiť. Ak je prítomná delécia na Y chromozóme, potom je vo vzorke nula kópií chromozómu Y, tým *Log2Ratio* pre túto hodnotu sa blíži k mínus nekonečnu, kedy sa odhad percenta počíta veľmi ťažko. Jedná sa o častý problém pri identifikácii pacientov s Y chromozómom, ktorí majú deletované unikátne oblasti. V takom prípade by bolo vhodné vyšetrenie metódou FISH u probanda za účelom stanovenia hladiny mozaiky, ktoré sa z dôvodu neprítomnosti vyšetřovaného materiálu nemohlo uskutočniť.

Mozaicizmus autozómov

Pri mozaicizme autozómov sa pomocou array CGH našli podobné výsledky s metódou FISH u siedmich z ôsmich (87,5 %) pacientov. Traja pacienti nemali vyšetrenie metódou FISH. Títo pacienti (A11, A12, A13) majú získané výsledky z karyotypu a všetky (100 %) sa zhodujú s výsledkami array CGH. Pričom u piatich (A1, A4, A11, A13, A16) zo šiestich pacientov sa podarilo identifikovať marker/derivovaný chromozóm z karyotypu.

U pacientky A1 bol identifikovaný pôvod marker chromozómu z karyotypu (37 % buniek). Metódou array CGH bola nájdená intersticiálna duplikácia zahrňujúca centroméru chromozómu 8. *Log2Ratio* duplikácie značí podľa výpočtov približne 58 %, pre presné stanovenie sa urobila metóda FISH z periférnej krvi a poskytla podobné výsledky (52 %), pričom karyotyp z periférnej krvi (37 %) a výsledok FISH z bukálneho steru (33 %) naznačovali

nižšie percento. V prípade bukálneho steru môže byť dôvodom tkanivová špecifita, ktorá bude naplňovať diskusie v kapitole 6.3 Porovnávanie výsledkov z rôznych biologických materiálov).

Pacientke A4 na základe nálezu z vyšetrenia karyotypu – nález marker chromozómu, bolo indikované vyšetrenie metódou array CGH pre určenie pôvodu marker chromozómu a jeho veľkosti. Bola nájdená intersticiálna duplikácia zahrňujúca centroméru chromozómu 19 v oblasti 19p12q13.32. Vzhľadom k hodnote *Log2Ratio* (50 %) je možné predpokladať, že sa jedná o nález v mozaike a v porovnaní s metódou karyotypu (35 %) a FISH (38 %) sa zaznamenal vyšší podiel mozaiky.

Pri pacientoch A1 a A4 sa po úspešnej identifikácii pôvodu marker chromozómu z karyotypu pomocou metódy array CGH následne urobilo vyšetrenie metódou FISH pre presné určenie percentuálneho zastúpenia mozaiky. Tým je možné vyzdvihnúť význam metódy array CGH, ktorá pomohla upresniť výber správnej sondy pre analýzu metódou FISH.

U pacienta A11 sa zistila z karyotypu prítomnosť nadbytočného materiálu v mozaikovej forme. Metódou array CGH bola pacientovi nájdená duplikácia pericentrickej oblasti chromozómu 2 obsahujúca časť krátkych a dlhých ramienok. Oblasť centroméry nie je pokrytá sondami, avšak vzhľadom k faktu, že prestavba nie je intersticiálna, ale jedná sa o nadpočetný kruhový marker chromozóm, je možné ju do duplikácie zahrnúť. Podiel klonov s markerom je vypočítaný podľa vzorca a výsledok vyšetrenia vyšiel 65 %, pričom na karyotype sa našla 75,4% bunková línia s marker chromozómom.

U pacienta A13 sa zistil pôvod nadbytočného materiálu na konci krátkych ramien chromozómu 8 pri vyšetrení karyotypu (62,9 %). Pôvod nadbytočného materiálu vysvetlila metóda array CGH nájdením terminálnej duplikácie dlhých ramien chromozómu 3 (69 %). Taktiež bola nájdená terminálna delécia krátkych ramien chromozómu 8 (56 %). Jedná sa pravdepodobne o výsledok nebalancovanej translokácie chromozómu 3 a 8.

Pacient A2 na karyotype z periférnej krvi nevykazoval žiadnu aberantnú bunkovú líniu, ale kvôli závažným klinickým príznakom sa urobila metóda FISH zo vzoriek periférnej krvi, kde sa preukázala nebalancovaná translokácia medzi chromozómom 2 a 15 (30 % buniek). Následne sa navrhlo vyšetrenie pacienta A2 metódou FISH z bukálneho steru, pričom výsledky súhlasia zastúpením aberantnej bunkovej línie (27% mozaika) s vyšetrením metódou FISH z periférnej krvi. U pacienta A2 bola pomocou array CGH nájdená terminálna delécia

chromozómu 2 v oblasti 2q37.3. Ďalej bola nájdená duplikácia chromozómu 15 v oblasti 15q26.2q26.3 (cca 40 %).

Pacientke A3 sa našiel normálny ženský profil, rovnako ako pri výsledkoch FISH nebola nájdená žiadna patológia. Jedine na základe karyotypu bolo podozrenie na Downov syndróm v mozaike, ktorí sa našiel v dvoch mitózach z 38 mitóz (5,3%) spolu s monozómiou X (5,3%). Tu by sa dala jednoznačne chromozómová aberácia vylúčiť a výsledok karyotypu pokladať za chybu metódy.

U pacientky A9 sa podarilo pomocou array CGH vysvetliť, z akého dôvodu sa na chromozóme 7 nepodarilo metódou FISH nájsť deléciu. Pričom sa jednalo o balancovanú prestavbu, kedy boli pri metóde FISH prítomné všetky lokusy, na ktoré sú sondy špecifické. Keďže išlo o balancovanú prestavbu nepodarilo sa metódou array CGH získať podiel klonov s mozaikou.

Pacientovi A10 sa metódou array CGH zistil chýbajúci Y chromozóm približne pri 73% bunkovom zastúpení. Pri tomto pacientovi bola detekovaná aj normálna bunková línia XY. Percentuálne zastúpenie súhlasí s metódou FISH (76 %) z periférnej krvi a z fibroblastov (73 %) a s karyotypom z periférnej krvi (69 %) a z fibroblastov (80 %). Tento prípad pacienta A10, ktorý prišiel z iného pracoviska s diagnózou Downovho syndrómu v mozaike poukazuje na dôležitosť prevádzkať vyšetrenia dôkladne, keďže sa môže objaviť mozaika gonozómov aj tam, kde sa to neočakáva.

U pacientky A12 metódou array CGH bola odhalená amplifikácia v oblasti krátkych ramien chromozómu 13 alebo 21. V tejto oblasti je medzi týmito dvoma chromozómami veľká sekvenčná zhoda, preto nie je možné rozhodnúť, ktorý z oboch akrocentrov je súčasťou marker chromozómov diagnostikovaných na karyotype. Na karyotype chromozóm 13 naznačoval nadbytočné dva marker chromozómy (2xmar). Podľa upraveného vzorca vyšlo percentuálne zastúpenie mozaiky 61 %, pričom celkové percentuálne zastúpenie marker chromozómov z karyotypu ($2 \times 11,43 \% + 42,86 \%$) vychádza 66 % a výsledky sa zhodujú.

U pacienta A14 sa našla mozaika s duplikáciou v oblasti 5p. Podľa *Log2Ratio* danej duplikácie (0,176) usudzujeme, že sa pravdepodobne jedná o 26% mozaiku. Rovnaký nález sa našiel aj pri výsledkoch karyotypu (26 %), metóde FISH z periférnej krvi (16 %). Pričom z bukálnej sliznice (65 %) sa našli výrazne rozdiely v percentuálnom zastúpení aberantnej bunkovej línie, môže ísť o prípad tkanivovej špecifity, čo je náplňou nasledujúcej diskusie.

U pacienta A16 výsledok array CGH ukázal deléciu celých krátkych ramien chromozómu 18 v mozaike. Podľa *Log2Ratio* danej delécie sa usúdilo, že sa jedná o 28% mozaiku. Keďže pacient mal nízky vzrast (TS) robilo sa v prvom rade vyšetrenie bunkovej suspenzie metódou FISH, kedy bola odhalená 21% mozaika bunkovej línie obsahujúca derivovaný chromozóm vzniknutý fúziou dlhých ramien chromozómu 18 najskôr s chromozómom 13. Pôvodný karyotyp nevedel určiť pôvod derivovaného chromozómu, ale na základe vyšetrenia array CGH sa vykonala revízia chromozómov 13 a 18 a na karyotype sa potvrdila prítomnosť derivovaného chromozómu približne vo štvrtine vyšetrených mitózach a karyotyp pacienta bol opravený na 45,XY,der(13;18)(p11.2;q11.1)[7]/46,XY[18]. Derivovaný chromozóm je pravdepodobne dicentrický chromozóm s jednou funkčnou centromérou. Z dôvodu, že chromozóm 13 je akrocentrický chromozóm a krátke ramená akrocentrických chromozómov nie sú pokryté sondami, tento región metódou array CGH nie je možné vyšetriť.

6.2.1 Zhrnutie porovňovania výsledkov s metódou array CGH

Metóda array CGH sa osvedčila ako vhodný nástroj na identifikáciu marker chromozómov z karyotypu, taktiež ako pomoc pri výbere správnej sondy pre následné použitie metódou FISH, pre odhalenie konkrétnych štrukturálnych aberácií a zistenie balancovanej translokácie a tým odhalenie dôvodu jej neúspešného záchytu metódou FISH, pričom balancovaná prestavba sa v našom subore ukázala aj ako problém, kedy sa nedali odhaliť jej percentuálne zastúpenia metódou array CGH.

Detekcia mozaicizmu nízkej úrovne môže byť problémom v budúcnosti, pretože metódy array CGH na detekciu genómovej nerovnováhy vytlačujú metódy karyotypovania (ktoré bolo použité ako prvé vyšetrenie u pacientov s vývojovými vadami alebo s viacerými vrodenými anomáliami). Mnohé laboratóriá nevykonávajú karyotyp, v prípade, že vyšetrenie založené na array CGH nedetekuje patológiu (HOCHSTENBACH *et al.* 2009, MILLER *et al.* 2010). V našom súbore sa naopak našiel prípad (pacientka G18), kedy vzhľadom na pomerne nízke rozlíšenie cytogenetických metód zostala submikroskopická abnormalita nezistená, pričom metódou FISH a array CGH sa deléciu génu *SHOX* podarilo zachytiť.

Aplikácia array CGH v diagnostike významne zlepšila proces identifikácie mozaiky u pacientov s chromozómovými aberáciami, čo naznačujú autori WAPNER *et al.* (2012). Napriek tomu som zistila, že metóda array CGH má taktiež svoje hranice a obmedzenia. Jedným

z obmedzení v našom súbore bola voľba nesprávnej platformy s nízkym rozlíšením, kedy sa nepokrývala gén záujmu. Problém nastal keď sa vyskytovala v bunkách monozómia X spolu s trizómiou X, čo znižuje schopnosť záchytu abnormálnych bunkových línií. Hodnota SD nedosahovala do *cut off* hranice sotwaru a bola potreba ju stanoviť manuálne. Problém sa vyskytol, keď oblasť centroméry Y nebola pokrytá sondami a nedala sa jednoznačne stanoviť štruktúra chromozómu Y. Sondy taktiež nepokrývajú oblasť krátkych ramien akrocentrov a nedali sa od seba odlíšiť dva akrocentrické chromozómy. Balancované prestavby nebolo možné presne identifikovať a nezistil sa presný pomer mozaiky. Obmedzením metódy array CGH v našej práci bola aj veľká sekvenčná zhoda medzi niektorými chromozómami.

V dvoch prípadoch (A1, A14) sa zaznamenala metódou array CGH tkanivová špecifita, čomu by som sa chcela venovať v nasledujúcej kapitole.

6.3 Porovnávanie výsledkov z rôznych biologických materiálov

Pri porovnávaní metódou FISH sa medzi tkanivami našli rozdielne výsledky u piatich z deviatich (56 %) pacientov. Výsledky karyotypu naznačovali pri jednom pacientovi z troch (33 %) rozdielne percentuálne zastúpenie mozaiky.

Mozaicizmus gonozómov

Pacientka G9 mala metódou FISH preukázanú prítomnosť ženskej (94 %) a mužskej bunkovej línie (6 %) z periférnej krvi. Z bukálnej sliznice nebola preukázaná prítomnosť chromozómu Y. Pre závažnosť nálezov a pre vylúčenie možnej kontaminácie materiálu (napr. transfúziou) bolo vyšetrenie metódou FISH po dvoch mesiacoch zopakované na natívnom materiáli krvi priamo z odobranej skúmavky bez ďalšieho spracovania. Opäť bola potvrdená prítomnosť bunkovej línie nesúcej chromozóm Y v krvi pacientky a zároveň bolo preukázané, že tento chromozóm nesie gén *SRY*, ktorý je významný pre determináciu pohlavia. Ako sa zistilo, na základe vybraného materiálu, jednej vzorky nie je možné presne rozpoznať skutočnú mieru somatického mozaicizmu v študovanom jedincovi, s čím súhlasia autori v článku (LIEHR *et al.* 2013). Vzhľadom k tomu, že somatické mutácie sa môžu vyskytovať v rôznych tkanivách a na odlišných miestach tela s rôznou mierou mozaiky, rovnako ako tvrdia uvedené štúdie

(FICKELSCHER *et al.* 2007, LIEHR *et al.* 2011), tým bez rozsiahleho odberu vzoriek sú získané výsledky správne len pre dané analyzované vzorky.

Mozaicizmus autozómov

Na základe nálezu (pacientka A1) nadbytočného marker chromozómu pôvodom z chromozómu 8 v krvi pacientky bolo indikované vyšetrenie metódou FISH z materiálu bukálneho steru pre presné určenie percentuálneho zastúpenia aberantných buniek v tomto tkanive. Bola preukázaná 32,8% mozaika tejto aberantnej bunkovej línie z bukálneho steru, k tomu sa našla monozomická línia chromozómu X. Práve táto línia nebola nájdená metódou FISH z periférnej krvi, kde sa prítomnosť marker chromozómu derivovaného z chromozómu 8 objavila u 52 % buniek. Zaujímavý jav sa zaznamenal v prípade karyotypu z periférnej krvi, kde sa našli približne rovnaké percentuálne zastúpenia derivovaného chromozómu 8 s výsledkom metódy FISH z bukálneho steru.

U pacienta A10 sa našli približne rovnaké percentuálne zastúpenia bunkovej línie 47,XY,+21 medzi výsledkami periférnej krvi (23,4 %) a fibroblastami (27 %) získanými metódou FISH. Ak sa jedná o karyotyp, výsledky nezaznamenali rovnaký trend a percentuálne zastúpenia sa odlišovali, pri karyotype z periférnej krvi bol nameraný podiel mozaiky Downovho syndrómu v 31 % buniek a pri fibroblastoch v 19,7 % buniek.

U pacienta A14 bolo odporúčané vyšetriť iné tkanivo. Zaznamenali sa diametrálne odlišné výsledky v rámci hladiny mozaiky v lymfocytoch (15,8 %) a v bunkách bukálnej sliznice (64,7%). Vhodné by bolo preto odobrať ďalšie tkanivo endodermálneho pôvodu. Krv patrí k delivým tkanivám (mezoderm), bukálna sliznica (ektoderm) je rýchlo sa deliace tkanivo. Najlepším získaným tkanivom by boli v tomto prípade svalové bunky. Nízka hladina mozaiky v lymfocytoch tohto pacienta spočiatku vrhala pochybnosti na jeho kauzalitu, až kým sa neuskutočnila analýza bukálneho steru, ktorá ukázala oveľa vyššie percento buniek, čo súhlasilo vo väčšej miere s fenotypom tohto pacienta. Aj keď z iných štúdií vieme, že mutácia vo vyšetřovanom materiáli nemusí nevyhnutne korelovať so závažnosťou ochorenia, ako je uvedené v článku od autorov DONKERVOORT *et al.* (2015). Tento prípad poukázal na to, že vyšetřenie iného tkaniva je nevyhnutné a ľahko dostupný materiál ako je bukálny ster by mohol byť správnu voľbou.

6.3.1 Zhrnutie porovňavania výsledkov z rôznych biologických materiálov

Na vyšetrenie mozaiky sa používajú rôzne biologické materiály. Najmä pri odbere vzoriek sa odporúčajú menej invazívne postupy. Najčastejšie používané sú vzorky periférnej krvi, lymfoblastové bunkové línie, amnionové bunky alebo choriové klky, fibroblasty, myocyty a bunky odvodené z iných biopsií tkaniva, bukálneho tkaniva, sliny a nechty (GAJECKA 2016). Získané vzorky boli prevažne z krvi, menej z bukálnej sliznice a najmenej bolo fibroblastov, čo je spôsobené tým, že odber tkaniva fibroblastov sa považuje za invazívny a preto sa čoraz častejšie nahrádza odberom z bukálnej sliznice. V prípade rýchlo sa deliacich buniek (ak je prítomná aberantná bunková línia u autozómov) môže dôjsť k úbytku alebo ku strate aberantnej bunkovej línie, preto nie je vhodným materiálom na vyšetrenie alebo overenie somatickej mozaiky.

Zvyčajne sa jeden typ materiálu vyberie na základe diagnostickej techniky, ktorá sa má použiť. Z takmer 400 rôznych tkanív ľudského tela sa cytogeneticky študuje len jedno tkanivo, t.j. krv, bunky bukálnej sliznice, amnionové bunky, bunky z choriových klkov alebo fibroblasty, tak ako uvádzajú autori (LIEHR *et al.* 2013). Táto skutočnosť vedie k riziku nepresnosti v hodnotení mozaiky.

Existujú prípady, kedy pacient mal detekovanú najvyššiu úroveň mozaiky, ale preukázal najslabší fenotyp alebo naopak mozaika bola takmer nedetekovaná v určitých tkanivách (napr. pacient G9, A15 z bukálnej sliznice) u jasne postihnutého pacienta, ktorý mal pozitívny výsledok z periférnej krvi. Pri výbere jedného tkaniva, ktoré sa má skúmať, je vždy možné, že v tkanivách odobraných z iných bunkových línií môžu byť prítomné vyššie úrovne somatickej mozaiky.

Somatická mozaika nadobudla dôležitú úlohu na klinike. Zdraví ľudia sú v skutočnosti mozaiky. Somatické mutácie môžu viesť k letalite alebo dokonca k prežitiu v závislosti od génu alebo chromozómu. To ešte viac komplikuje fakt, že úroveň mozaiky nemusí nevyhnutne korelovať so závažnosťou klinického prejavu a dokonca nemusí mať žiadne viditeľné účinky. Vďaka technologickému pokroku, ktorý detekuje mozaicizmus vo vyššej miere ako kedykoľvek predtým, sa vo vedeckej oblasti myšlienka, že somatická mozaika nevyhnutne vedie k chorobe mení. Bude sa musieť predefinovať somatický mozaicizmus ako genetický mechanizmus, aby sa zmenilo vnímanie širokej verejnosti. Musia sa stanoviť prahové hodnoty týkajúce sa hladín mozaiky a postihnutých tkanív, aby sa stanovila somatická mozaika

pre normálnu genetickú variáciu. Dúfam, že tým, ako sa NGS rozšírila na kliniku, nové poznatky sa premietnu do lepšieho poradenstva a klinického manažmentu somatickej mozaiky.

6.4 Porovnávanie výsledkov z arteficiálne vyrobených mozaik

Pri porovnávaní výsledkov z karyotypu s namiešaným pomerom arteficiálne vyrobených mozaik sa získala zhoda u dvoch zo štyroch (50 %) výsledkov. V prípade mozaiky B a D sa získali pomocou karyotypu približne rovnaké pomery. Pri analýze arteficiálne vyrobených mozaik A a C pomocou karyotypu sme nezaznamenali rovnaké pomery. Mohlo ísť o chybu pri analýze, klon abnormálnych/normálnych mitóz, čo môže súvisieť s nízkym počtom hodnotených mitóz pri karyotype. Dokonca sa v prípade arteficiálnej mozaiky D zaznamenala bunková línia 45,X (9,5 %) v dvoch z 21 hodnotených mitóz, kedy by sa jednalo v prípade diagnostiky o falošne pozitívny výsledok.

Čo sa týkalo výsledkov získaných metódou FISH pomery súhlasili pri všetkých typoch arteficiálne vyrobených mozaik so všetkými použitými typmi sond. Ak sa pozrieme na výsledky z jednotlivých jadier a mitóz, zaznamenali sa presnejšie výsledky v prípade jadier. Konkrétne sa jednalo o osem z jedenástich (72 %) výsledkov a pri mitózach boli len dva (18 %) získané pomery presnejšie ako pomery získané z jadier. Jeden z výsledkov (arteficiálna mozaika B) metódou FISH odpovedal rovnako presnému percentuálnemu záchytu mozaiky medzi jadrami a mitózami. Z pozorovania vyplýva, že jadrá sú presnejšie v prípade percentuálneho záchytu mozaiky. Pritom je potrebné pripomenúť, že sa nejedná o aberácie (trizómie, abnormálne chromozómy), ktoré môžu tento pomer značne ovplyvniť.

6.4.1 Zhrnutie porovnávania výsledkov z arteficiálne vyrobených mozaik

Z výsledkov je možné tvrdiť, že metóda FISH má presnejší percentuálny záchyt mozaiky v porovnaní s karyotypom. Môže to byť spôsobené tým, že sa analyzuje viac buniek, používajú sa konkrétne lokus-spezifické sondy, analýza je jednoduchšia, signály sú jednoznačne viditeľné, analyzujú sa výsledky z jadier aj z mitóz. Všetky tieto fakty môžu byť dôvodom pre lepší percentuálny záchyt mozaiky pomocou metódy FISH.

Ak sa jedná o použité sondy, v práci bolo dokázané, že viaceré typy sond môžu byť vhodné pre použitie metódou FISH na záchyt abnormálnych bunkových línií v mozaike (v našom prípade 46,XX/46,XY). Nezaznamenali sa medzi použitými sondami žiadne výrazné rozdiely. Všetky sondy boli dostatočne senzitívne na záchyt arteficiálne vyrobených mozaik. Aj keď som predpokladala, že sa pri použití samotnej sondy na X centroméru, budú prekrývať signály na jadrách a mitózy poskytnú výpovednejšiu hodnotu, tento jav nebol nepozorovaný a zaznamenali sa približne rovnaké výsledky v jadrách aj mitózach. Vychádzala som z tvrdenia, kde sa uvádza, že pre dodatočnú presnosť by sa mala použiť viacfarebná FISH s dvomi alebo viacerými rôznymi sondami (EASTMOND *et al.* 1995).

6.5 Starnutie a strata X chromozómu

Problémy môžu vzniknúť v diagnostickom laboratóriu, keď sa pri bežných cytogenetických analýzach zistí bunková línia 45,X u zjavne "normálnych" žien, pretože interpretácia výsledkov môže byť zložitá.

V našom súbore sa objavilo šesť pacientiek vo veku 40 – 56 rokov s bunkovou líniou 45,X s percentuálnym zastúpením na karyotype od 6,5 % do 30 % a na FISH od 4 % do 8,3 %. Z toho jedna pacientka vo veku 53 rokov so 4% zastúpením mozaiky TS a druhá mala 56 rokov so 4,5% zastúpením bunkovej línie 45,X, čo jasne naznačuje, že sa jedná o prípad starnutia spojeného so stratou X chromozómu. Toto tvrdenie potvrdzujú autori GUTTENBACH *et al.* (2007) v článku, kde uvádzajú, že mozaika TS môže súvisieť so starnutím a s pribúdajúcim vekom, kedy u žien vo veku 56 – 60 rokov sa očakáva 4,35% mozaika TS.

Tento jav by sa dal opísať tým, že vyšetrované bunky sú deliace sa leukocyty (biele krvinky odobrané z periférnej krvi). Jedná sa o imunitné bunky, ktorých funkciu neovplyvní prípadná strata jedného X chromozómu, keďže na chromozóme X nie sú prítomné žiadne gény, ktoré by ohrozili život leukocytu. Preto sa tieto bunky s pribúdajúcim vekom kumulujú a nie je to spojené s letalitou alebo s klinickými prejavmi, ako by to bolo v prípade autozómov. Autozomálna hypoploidia nie je závislá od veku. Strata autozómov je nepravdepodobná, pretože autozómy obsahujú a exprimujú gény dôležité pre prežitie, čo nie je prípad geneticky inaktívnych X a najmä heterochromatických chromozómov (GUTTENBACH *et al.* 1995).

HORSMAN *et al.* (1987) potvrdzujú, že menej ako 10 % X-aneuploidných buniek na karyotype z periférnej krvi by nemalo mať reprodukčný význam na fenotypovo normálnu ženu. Je to však založené na údajoch iba 104 žien, ktoré mali dva alebo viac potratov a neberú do úvahy vek.

Aneuploidia pohlavného chromozómu v mozaike môže vyplývať buď z mozaiky, technického artefaktu alebo zo straty súvisiacej s vekom (STONE A SANDBERG 1995, GUTTENBACH *et al.* 1995, VEITIA 2018). Technický artefakt by sa dal ľahko vylúčiť, pretože by bola tiež spozorovaná aneuploidia pre náhodné autozómy. Skutočnú mozaiku v porovnaní so stratou súvisiacu s vekom nie je ľahké rozlíšiť a preto interpretácie môžu byť zložité (GUTTENBACH *et al.* 1995, STONE A SANDBERG 1995, RUSSELL *et al.* 2007).

6.6 Splnené ciele práce

Zistil sa detekčný limit pre záchyt mozaiky metódou FISH, ktorou sa zaznamenala najnižšie zachytená mozaika pod 2 %. Metóda array CGH mala nižší záchyt a podarilo sa zachytiť touto metódou najnižšie 15% mozaiku.

Medzi najčastejšie faktory, ktoré ovplyvňujú možnosť záchytu mozaiky v prípade karyotypu sú technické artefakty, klony abnormálnych buniek, nedostatok hodnotených mitóz. Pri metóde FISH išlo hlavne o problémy so sondami a pri metóde array CGH sa jednalo o nízke rozlíšenie platformy a ko-hybridizáciu bunkových línií s prítomnosťou trizómie X a monozómie X.

Zistila som a navrhujem v prípade mozaicizmu gonozómov v prvej analýze použitie metódy FISH, ktorá poskytuje spoľahlivejšie výsledky a má presnejší percentuálny záchyt ako karyotyp, keďže sa metódou FISH hodnotí viac buniek. Nepotvrdila som, že by výber sondy mal vplyv na výsledok, keďže u artefciálnych mozaik boli zaznamenané všetky výsledky podľa očakávania, dokonca aj pri použití jednej diagnostickej sondy. Karyotyp je ideálne použiť následne po analýze metódou FISH na overenie výskytu prípadne ďalších chromozómových aberácií. Pri mozaike TS sa taktiež overil tento postup. Ak sa jedná o mozaiky autozómov, v takom prípade by som navrhovala na detekciu mozaicizmu použiť karyotyp, ktorý je lepší v odhalení malých nadpočetných markerových chromozómov s klinicky známym významom a metóda FISH by slúžila na ich percentuálne upresnenie, podrobnejšiu charakterizáciu a určenie konkrétneho marker chromozómu. Ak sa zistí nadbytočný marker

chromozóm na karyotype neznámeho pôvodu a ide o prípady bez klinickej indikácie alebo menej známe prípady, ktoré nie sú dobre preskúmané, metódu array CGH by som uprednostnila pred metódou FISH, keďže je potrebné zistiť typ sondy, ktorá sa použije pri metóde FISH.

Porovnávali sa výsledky array CGH u dvoch pacientiek (G18 a G19) proti mužskej a ženskej referencii, pričom cieľom bolo zistiť či má význam používať obe kontroly a ktorá z nich má lepší záchyt mozaiky, prípadne mozaiku nie je schopná zachytiť. Dôležitým faktom je, že by sa mali analyzovať metódou array CGH iba oblasti jedinečné pre chromozóm X a preto použitie mužskej referencie proti ženským vzorkám pokladám za nevhodné. Autori YATSENKO *et al.* (2009) navrhujú, aby boli vyvinuté a používané alternatívne vnútorné referencie namiesto použitia referenčných DNA s opačným pohlavím k vyšetrovanej vzorke.

7 Záver

Hodnotil sa mozaicizmus gonozómov a autozómov s rôznym percentuálnym pomerom zastúpenia aberantných bunkových línií. Na vyšetrenie sa použil karyotyp, metóda FISH a array CGH, pričom boli medzi sebou porovnávané jednotlivé výsledky.

Prípady známych a jasne charakterizovaných chromozómových aberácií autozómov, možno študovať pomocou klasických cytogenetických metód. Avšak ako sa potvrdilo na základe získaných výsledkov, tieto metódy majú obmedzené rozlíšenia a nie sú spoľahlivé pre malé zmeny počtu kópií zahŕňajúce segmenty chromozómov s dĺžkou 5 Mb alebo menej. Analýza metódou FISH pomocou správne zvolenej sondy môže úspešne identifikovať mozaicizmus gonozómov alebo autozómov na nízkej úrovni u mnohých pacientov. Obmedzenia boli v prípade intersticiálnych chromozómových delécií alebo duplikácií, ktoré neboli detekované metódou FISH a na presné stanovenie chromozómovej prestavby slúžila metóda array CGH.

Zistila som, že metóda array CGH má význam v diagnostike mozaiky, ale má taktiež svoje obmedzenia. Najnižšie zachytená mozaika bola s 15% zastúpením aberantnej bunkovej línie, čo je stále nepostačujúce na odhalenie mozaiky s nízkou úrovňou.

FISH sondy určené na detekciu arteficiálne vyrobených mozaik poskytli významný diagnostický výťažok. Overil sa pomerne presný percentuálny záchyt mozaiky metódou FISH pri arteficiálne vyrobených mozaik.

Ako vyplýva z našich údajov, typy vyšetrovaných biologických materiálov, použité metódy identifikácie a overovania, predstavujú hlavné faktory ovplyvňujúce detekciu mozaiky, najmä nízkofrekvenčnej pod 5 % študovaných buniek.

Zoznam použitej literatúry

- Abruzzo, M.A., Mayer, M., Jacobs, P.A. (1985): Aging and aneuploidy: evidence for the preferential involvement of the inactive X chromosome. *Cytogenetic and Genome Research* 39: 275-278.
- Abulhasan, S.J., Tayel, S.M., Al-Awadi, S.A. (1999): Mosaic Turner syndrome: cytogenetics versus FISH. *Annals of Human Genetics* 63: 199-206.
- Albertson, D.G., Pinkel, D. (2003): Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Human Molecular Genetics*: R145-152.
- Asthagiri, A.R., Butman, J.A., Kim, H.J., Tsilou, E.T., Zhuang, Z., Lonsler, R.R. (2009): Neurofibromatosis type 2. *The Lancet* 373: 1974-1986.
- Avner, P., Heard, E. (2001): X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nature Reviews. Genetics* 2: 59-67.
- Ballif, B.C., Rorem, A. E., Sundin, K., Lincicum, M., Gaskin, S., Coppinger, J., Kashork, C., Shaffer, L.G., Bejjani, B.A. (2006): Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens. *American Journal of Medical Genetics Part A* 140A: 2757-2767.
- Barg, E., Gil, J., Wikiera, B., Smigiel, R., (2009): [Mosaic trisomy of chromosome 20 in a patient with congenital anomalies--10-years observation]. *Pediatric Endocrinology, Diabetes, and Metabolism* 15: 266-270. [In Polish]
- Bejjani, B.A., Shaffer, L.G. (2006): Application of array-based comparative genomic hybridization to clinical diagnostics. *The Journal of molecular diagnostics* 8: 528-533.
- Benkhalifa M., Kasakyan, S., Clement, P., Baldi, M., Tachdjian, G., Demiroglu, A., Gurgan, T., Fiorentino, F., Mohammed, M., Qumsiyeh, M.B. (2005): Array comparative genomic hybridization profiling of first-trimester spontaneous abortions that fail to grow *in vitro*. *Prenatal Diagnosis* 25: 894-900.
- Benn, P. (1998): Trisomy 16 and trisomy 16 Mosaicism: a review. *American Journal of Medical Genetics* 79: 121-133.
- Boué, J.G., Boué, A. (1976): Chromosomal anomalies in early spontaneous abortion. (Their consequences on early embryogenesis and in vitro growth of embryonic cells). *Current Topics in Pathology. Ergebnisse Der Pathologie* 62: 193-208.
- Bruno, D.L., White, S.M., Ganesamoorthy, D., Burgess, T., Butler, K., Corrie, S., Francis, D., Hills, L., Prabhakara, K., Ngo, C., Norris, F. *et al.* (2011): Pathogenic aberrations revealed exclusively by single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping data in 5000 samples tested by molecular karyotyping. *Journal of Medical Genetics* 48: 831-839.
- Burgess, T., Downie, L., Pertile, M.D., Francis, D., Glass, M., Nouri, S., Puszczola, R. (2004): Monosomy 21 Seen in Live Born Is Unlikely to Represent True Monosomy 21: A Case Report and Review of the Literature. *Case Reports in Genetics* 2014: 1-6.
- Cai, W.-W., Mao, J.-H., Chow, CH.-W., Damani, S., Balmain, A., Bradley, A. (2002): Genome-wide detection of chromosomal imbalances in tumors using BAC microarrays. *Nature Biotechnology* 20: 393-396.
- Cai, X., Evrony, G.D., Lehmann, H.S., Elhosary, P.C., Mehta, B.K., Walsh, CH.A. (2014): Single-Cell, Genome-wide Sequencing Identifies Clonal Somatic Copy-Number Variation in the Human Brain. *Cell Reports* 8: 1280-1289.

- Campbell, I.M., Yuan, B., Robberecht, C., Pfundt, R., Szafranski, P., McEntagart, M.E., Erez, A., Bartnik, M., Wiśniowiecka-Kowalnik, B., Plunkett, K.S. *et al.* (2014): Parental Somatic Mosaicism Is Underrecognized and Influences Recurrence Risk of Genomic Disorders. *The American Journal of Human Genetics* 95: 173-182.
- Caspersson, T., Zech, L., Modest, E.J. (1970): Fluorescent Labeling of Chromosomal DNA: Superiority of Quinacrine Mustard to Quinacrine. *Science* 170: 1067-1067.
- Cohen, A.S.A., Wilson, S.L., Trinh, J., Ye, X.C. (2015): Detecting somatic mosaicism: considerations and clinical implications: Somatic Mosaicism in the Clinic. *Clinical Genetics* 87: 554-562.
- Cohen, A.S.A., Xiang, Q.S., Attariwala, R., Borchers, CH., Senger, CH., Picker, W., Levi, J., Yewchuk, L., Tan, J., Eydoux, P. *et al.* (2014): Somatic mosaicism for the p.His1047Arg mutation in *PIK3CA* in a girl with mesenteric lipomatosis. *American Journal of Medical Genetics Part A* 164: 2360-2364.
- Conlin, L.K., Kaur, M., Izumi, K., Campbell, L., Wilkens, A., Clark, D., Deardorff, M.A., Zackai, E.H., Pallister, P., Hakonarson, H. *et al.* (2012): Utility of SNP arrays in detecting, quantifying, and determining meiotic origin of tetrasomy 12p in blood from individuals with Pallister-Killian syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A* 158A: 3046-3053.
- Conlin, L.K., Thiel, B.D., Bonnemann, C.G., Medne, L., Ernst, L.M., Zackai, E.H., Deardorff, M.A., Krantz, I.D., Hakonarson, H., Spinner, N.B. (2010): Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. *Human Molecular Genetics* 19: 1263-1275.
- Coonen, E., Derhaag, J.G., Dumoulin, J.C.M., van Wissen, L.C.P., Bras, M., Janssen, M., Evers, J.L.H., Geraedts, J.P.M. (2004): Anaphase lagging mainly explains chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos. *Human Reproduction* 19: 316-324.
- Daber, R., Chapman, K.A., Ruchelli, E., Kasperski, S., Mulchandani, S., Thiel, B.D., Hakonarson, H., Zackai, E.H., Conlin, L.K., Spinner, N.B. (2011): Mosaic trisomy 17: variable clinical and cytogenetic presentation. *American Journal of Medical Genetics. Part A* 155A: 2489-2495.
- De Souza, E., Halliday, J., Chan, A., Bower, C., Morris, J.K. (2009): Recurrence risks for trisomies 13, 18, and 21. *American Journal of Medical Genetics. Part A* 149A: 2716-2722.
- De, S. (2011): Somatic mosaicism in healthy human tissues. *Trends in Genetics* 27: 217-223.
- Dean, J., Cohen, G., Kemp, J., Robson, L., Tembe, V., Hasselaar, J., Webster, B., Lammi, A., Smith, A. (1997): Karyotype 69,XXX/47,XX,+15 in a 2 1/2 year old child. *Journal of Medical Genetics* 34: 246-249.
- Demaliaj, E., Cerekja, A., Piazzè, J. (2012): Aneuploidy in Health and Disease. InTech.
- Dhillon, R.K., Hillman, S.C., Morris, R.K., McMullan, D., Coomarasamy, A., Kilby, M.D. (2014): Additional information from chromosomal microarray analysis (CMA) over conventional karyotyping when diagnosing chromosomal abnormalities in miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology* 121: 11-21.
- Diedrich, U., Hansmann, I., Janke, D., Opitz, O., Probeck, H.D. (1983): Chromosome anomalies in 136 couples with a history of recurrent abortions. *Human Genetics* 65: 48-52.
- Donkervoort, S., Hu, Y., Stojkovic, T., Voermans, N.C., Foley, A.R., Leach, M.E., Dastgir, L., Bolduc, V., Cullup, T., de Bececlievre, A. *et al.* (2015): Mosaicism for dominant collagen 6 mutations as a cause for intrafamilial phenotypic variability. *Human Mutation* 36: 48-56.
- Douet-Guilbert, N., Basinko, A., Le Bris, M.-J., Herry, A., Morel, F., De Braekeleer, M. (2008): [Strategies to identify supernumerary chromosomal markers in constitutional cytogenetics]. *Pathologie-Biologie* 56: 362-367. [In French]

- Drets, M.E., Shaw, M.W. (1971): Specific banding patterns of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68: 2073-2077.
- Eastmond, D.A., Schuler, M., Rupa, D.S. (1995): Advantages and limitations of using fluorescence *in situ* hybridization for the detection of aneuploidy in interphase human cells. *Mutation Research* 348: 153-162.
- Erickson, R.P. (2010): Somatic gene mutation and human disease other than cancer: An update. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 705: 96-106.
- Fagerberg, C.H.R., Eriksen, F.B., Thormann, J., Østergaard, J.R., (2012): Trisomy 14 mosaicism: clinical and cytogenetic findings in an adult. *Clinical Dysmorphology* 21: 45-47.
- Fernández, R., Méndez, J., Pásaro, E. (1996): Turner syndrome: a study of chromosomal mosaicism. *Human Genetics* 98: 29-35.
- Fickelscher, I., Starke, H., Schulze, E., Ernst, G., Kosyakova, N., Mkrtychyan, H., MacDermont, K., Sebire, N., Liehr, T. (2007): A further case with a small supernumerary marker chromosome (sSMC) derived from chromosome 1—evidence for high variability in mosaicism in different tissues of sSMC carriers. *Prenatal Diagnosis* 27: 783-785.
- Ford C.E., Jones, K.W., Polani, P.E., De Almeida, J.C., Briggs, J.H. (1959): A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet (London, England)* 1: 711-713.
- Ford, C.E., Hamerton, J.L. (1956): The chromosomes of man. *Nature* 178: 1020-1023.
- Frank, S.A. (2004): Somatic Mosaicism and Disease. *Current Biology* 24: R577-R581.
- Gajecka, M. (2016): Unrevealed mosaicism in the next-generation sequencing era. *Molecular genetics and genomics* 291: 513-530.
- Galloway, S.M., Buckton, K.E. (1978): Aneuploidy and ageing: chromosome studies on a random sample of the population using G-banding. *Cytogenetic and Genome Research* 20: 78-95.
- Gibson, W.T., Hood, R.L., Zhan, S.H., Bulman, D.E., Fejes, A.P., Moore, R., Mungall, A.J., Eydoux, P., Babul-Hirji, R., An, J., Marra, M.A., Chitayat, D., Boycott, K.M. Weaver, D.D., Jones, S.J.M. (2012): Mutations in EZH2 Cause Weaver Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 90: 110-118.
- Gottlieb, B., Beitel, L.K., Trifiro, M.A. (2001): Somatic mosaicism and variable expressivity. *Trends in genetics* 17: 79-82.
- Gruchy, N., Lebrun, M., Herlicoviez, M., Alliet, J., Gourdier, D., Kottler, M.-L., Mitre, H., Leporrier, N. (2008): Supernumerary marker chromosomes management in prenatal diagnosis. *American Journal of Medical Genetics. Part A* 146A: 2770-2776.
- Guttenbach, M., Koschorz, B., Bernthaler, U., Grimm, T., Schmid, M. (1995): Sex chromosome loss and aging: *in situ* hybridization studies on human interphase nuclei. *American Journal of Human Genetics* 57: 1143-1150.
- Hando, J.C., Tucker, J.D., Davenport, M., Tepperberg, J., Nath, J. (1997): X chromosome inactivation and micronuclei in normal and Turner individuals. *Human Genetics* 100: 624-628.
- Happle, R. (1987): Lethal genes surviving by mosaicism: a possible explanation for sporadic birth defects involving the skin. *Journal of the American Academy of Dermatology* 16: 899-906.
- Hassold, T. (1982): Mosaic trisomies in human spontaneous abortions. *Human Genetics* 61: 31-35.
- Hassold, T., Hunt, P. (2001): To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics* 2: 280-291.

Hassold, T., Chen, N., Funkhouser, J., Jooss, T., Manuel, B., Matsuura, J., Matsuyama, A., Wilson, C., Yamane, J.A., Jacobs, P.A. (1980): A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Annals of Human Genetics* 44: 151-178.

Hassold, T.J., Jacobs, P.A. (1984): Trisomy in Man. *Annual Review of Genetics* 18: 69-97.

Hecht, F., Hecht, B.K., Berger, C.S. (1984): Aneuploidy in recurrent spontaneous aborters: the tendency to parental nondisjunction. *Clinical Genetics* 26: 43-45.

Hersmus, R., Stoop, H., Turbitt, E., Oosterhuis, J.W., Drop, S.L., Sinclair, A.H., White, S.J., Looijenga, L.H. (2012): *SRY* mutation analysis by next generation (deep) sequencing in a cohort of chromosomal Disorders of Sex Development (DSD) patients with a mosaic karyotype. *BMC medical genetics* 13: 108.

Hirschhorn, K., Decker, W.H., Cooper, H.L. (1960): Human intersex with chromosome mosaicism of type XY/XO. Report of a case. *The New England Journal of Medicine* 263: 1044-1048.

Hirschhorn, R. (2003): In vivo reversion to normal of inherited mutations in humans. *Journal of Medical Genetics* 40: 721-728.

Hirschhorn, R., Yang, D.R., Puck, J.M., Huie, M.L., Jiang, C.H.K., Kurlandsky L.E. (1996): Spontaneous in vivo reversion to normal of an inherited mutation in a patient with adenosine deaminase deficiency. *Nature Genetics* 13: 290-295.

Hodge, J.C., Hulshizer, R.L., Seger, P., St Antoine, A., Bair, J., Kirmani, S. (2012): Array CGH on unstimulated blood does not detect all cases of Pallister-Killian syndrome: A skin biopsy should remain the diagnostic gold standard. *American Journal of Medical Genetics Part A* 158A: 669-673.

Hochstenbach, R., van Binsbergen, E., Engelen, J., Nieuwint, A., Polstra, A., Poddighe, P., Ruivenkamp, C., Sikkema-Raddatz, B., Smeets, D., Poot, M. (2009): Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *European Journal of Medical Genetics* 52: 161-169.

Holstege, H., Pfeiffer, W., Sie, D., Hulsman, M., Nicholas, T.J (2014): Somatic mutations found in the healthy blood compartment of a 115-yr-old woman demonstrate oligoclonal hematopoiesis. *Genome Research* 24: 733-742.

Holzgreve, W., Schonberg, S.A., Douglas, R.G., Golbus, M.S. (1984): X-chromosome hyperploidy in couples with multiple spontaneous abortions. *Obstetrics and Gynecology* 63: 237-240.

Hook, E.B. (1977): Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. *American Journal of Human Genetics* 29: 94-97

Horsman, D.E., Dill, F.J., McGillivray, B.C, Kalousek, D.K., Opitz, J.M., Reynolds, J.F. (1987): X chromosome aneuploidy in lymphocyte cultures from women with recurrent spontaneous abortions. *American Journal of Medical Genetics* 28: 981-987.

Hsu, L.Y.F., Benn, P. (1999): Revised guidelines for the diagnosis of mosaicism in amniocytes. *Prenatal Diagnosis* 19: 1081-1082.

Cheng, J.B., Cho, R.J. (2012): Genetics and epigenetics of the skin meet deep sequence. *The Journal of Investigative Dermatology* 132: 923-932.

Cheung, S.W., Shaw, C.H.A., Scott, D.A., Patel, A., Sahoo, T., Bacino, C.A., Pursley, A., Li, J., Erickson, R., Gropman, A.L. *et al.* (2007): Microarray-based CGH detects chromosomal mosaicism not revealed by conventional cytogenetics. *American Journal of Medical Genetics. Part A* 143A: 1679-1686.

Chiesa, J., Hoffet, M., Rousseau, O., Bourgeois, J.M, Sarda, P., Mares, P., Bureau, J.P. (1998): Pallister-Killian syndrome [i(12p)]: first pre-natal diagnosis using cordocentesis in the second trimester confirmed by *in situ* hybridization. *Clinical Genetics* 54: 294-302.

- Ishkanian, A.S., Malloff, C.H.A., Watson, S.K., DeLeeuw, R., Chi, B., Coe, B.P., Snijders, A., Albertson, D.G., Pinkel, D., Marra, M.A. *et al.* (2004): A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nature Genetics* 36: 299-303.
- Izumi, K., Krantz, I.D. (2014): Pallister-Killian syndrome. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics* 166C: 406-413.
- Jacobs, K.B., Yeager, M., Zhou, W., Wacholder, S., Wang, Z., Rodriguez-Santiago, B., Hutchinson, A., Deng, X., Liu, C.H., Horner, M.J. *et al.* (2012): Detectable clonal mosaicism and its relationship to aging and cancer. *Nature Genetics* 44: 651-658.
- Jacobs, P.A., Brunton, M., Court Brown, W.M., Doll, R., Goldstein, H. (1963): Change of human chromosome count distribution with age: evidence for a sex differences. *Nature* 197: 1080-1081.
- Jacobs, P.A., Court Brown, W.M., Doll, R. (1961): Distribution of human chromosome counts in relation to age. *Nature* 191: 1178-1180.
- Jacobs, P.A., Strong, J.A. (1959): A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 183: 302-303.
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., Pinkel, D. (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818-821.
- Kaminker, C.P., Daín, L., Lamas, M.A., Sánchez, J.M. (1985): Mosaic trisomy 9 syndrome with unusual phenotype. *American Journal of Medical Genetics* 22: 237-241.
- Kamischke, A., Baumgardt, A., Horst, J., Nieschlag, E. (2003): Clinical and diagnostic features of patients with suspected Klinefelter syndrome. *Journal of Andrology* 24: 41-48.
- Kaur, A., Mahajan, S., Singh, J.R. (2004): Cytogenetic Analysis in Cases with Sex Anomalies. *International Journal of Human Genetics* 4: 167-171.
- Kehrer-Sawatzki, H., Kluwe, L., Sandig, C., Kohn, M., Wimmer, Krammer, U., Peyrl, Jenne, D.E., Hansmann, I., Mautner, V.F. (2004): High Frequency of Mosaicism among Patients with Neurofibromatosis Type 1 (NF1) with Microdeletions Caused by Somatic Recombination of the *JJAZI* Gene. *The American Journal of Human Genetics* 75: 410-423.
- King, W.A., Coppola, G., Alexander, B., Mastro Monaco, G., Perrault, S., Nino-Soto, M.I., Pinton, A., Joudrey, E.M., Betts, D.H. (2006): The impact of chromosomal alteration on embryo development. *Theriogenology* 65: 166-177.
- Knudson, A.G. (2001): Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Reviews Cancer* 1: 157-162.
- Kočárek, E., Pánek, M., Novotná, D. (2010): *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky, vyšetřovací metody v klinické cytogenetice. 2. upravené vyd. Karolinum, Praha.*
- Koch, G., Shows, T.B. (1980): Somatic cell genetics of adenosine deaminase expression and severe combined immunodeficiency disease in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77: 4211-4215.
- Kovaleva, N.V. (2010): Germ-line transmission of trisomy 21: Data from 80 families suggest an implication of grandmaternal age and a high frequency of female-specific trisomy rescue. *Molecular Cytogenetics* 3:7.
- Kurek, K.C., Luks, V.L., Ayturk, U.M., Alomari, A.I., Fishman, S.J., Spencer, S.A., Mulliken, J.B., Bowen, M.E., Yamamoto, G.L., Kozakewich, H.P.W., Warman, M.L. (2012): Somatic Mosaic Activating Mutations in *PIK3CA* Cause CLOVES Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 90: 1108-1115.

- Kvittingen, E.A., Rootwelt, H., Berger, R., Brandtzaeg, P. (1994): Self-induced correction of the genetic defect in tyrosinemia type I. *The Journal of Clinical Investigation* 94: 1657-1661.
- Langlois, S., Yong, P.J., Yong, S.L., Barrett, I., Kalousek, D.K., Miny, P., Exeler, R., Morris, K., Robinson, W.P. (2006): Postnatal follow-up of prenatally diagnosed trisomy 16 mosaicism. *Prenatal Diagnosis* 26: 548-558.
- Laurie, C.C., Laurie C.A., Rice, K., Doheny, K.F., Zelnick, L.R., McHugh, C.P., Ling, H., Hetrick, K.N., Pugh, E.W., Amos, CH., Wei, Q. et al. (2012): Detectable clonal mosaicism from birth to old age and its relationship to cancer. *Nature Genetics* 44: 642-650.
- Lee, J.H., Huynh, M., Silhavy, J.L., Kim, S., Dixon-Salazar, T., Heiberg, A., Scott, E., Bafna, V., Hill, H.J., Collazo, A. et al. (2012): De novo somatic mutations in components of the *PI3K-AKT3-mTOR* pathway cause hemimegalencephaly. *Nature Genetics* 44: 941-945.
- Lejeune, J., Gautier, M., Turpin, R. (1959): Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *CR Acad Sci* 248:1721-1722.
- Lengauer, CH., Kenneth, W.K., Vogelstein, B. (1998): Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396: 643-649.
- Li, R., Montpetit, A., Rousseau, M., Wu, S.Y.M., Greenwood, C., Spector, T.D., Pollak, M., Polychronakos, C., Richards, J.B. (2014): Somatic point mutations occurring early in development: a monozygotic twin study. *Journal of Medical Genetics* 51: 28-34.
- Lieber, M.R. (2010): The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annual Review of Biochemistry* 79: 181-211.
- Liehr, T., Ewers, E., Hamid, A.B., Kosyakova, N., Voigt, M., Weise, A., Manvelyan, M. (2011): Small Supernumerary Marker Chromosomes and Uniparental Disomy Have a Story to Tell. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 59: 842-848.
- Liehr, T., Klein, E., Mrasek, K., Kosyakova, N., Guilherme, R.S., Aust, N., Venner, C., Weise, A., Hamid, A.B. (2013): Clinical Impact of Somatic Mosaicism in Cases with Small Supernumerary Marker Chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 139: 158-163.
- Ligon, A.H., Beaudet, A.L., Shaffer, L.G. (1997): Simultaneous, multilocus FISH analysis for detection of microdeletions in the diagnostic evaluation of developmental delay and mental retardation. *American Journal of Human Genetics* 61: 51-59.
- Lindhurst, M.J., Parker, V.E.R., Payne, F., Sapp, J.C., Rudge, S., Harris, J., Witkowski, A.M., Zhang, Q., Groeneveld, M.P., Scott, C.E., Daly, A. et al. (2012): Mosaic overgrowth with fibroadipose hyperplasia is caused by somatic activating mutations in *PIK3CA*. *Nature Genetics* 44: 928-933.
- Lindhurst, M.J., Sapp, J.C., Teer, J.K., Johnston, J.J., Finn, E.M., Peters, K., Turner, J., Cannons, J.L., Bick, D., Blakemore, L., Blumhorst, C., Brockmann, K. et al. (2011): A Mosaic Activating Mutation in *AKT1* Associated with the Proteus Syndrome. *New England Journal of Medicine* 365: 611-619.
- Ly, D.H., Lockhart, D.J., Lerner, R.A., Schultz, P.G. (2000): Mitotic misregulation and human aging. *Science* 287: 2486-2492.
- Macklon, N.S., Geraedts, J.P.M., Fauser, B.C.J.M (2002): Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. *Human Reproduction Update* 8: 333-343.
- Machiela, M.J., Chanock, S.J. (2013): Detectable Clonal Mosaicism in the Human Genome. *Seminars in Hematology* 50: 348-359.
- Markello, T.C., Carlson-Donohoe, H., Sincan, M., Adams, D., Bodine, D.V., Farrar, J.E., Vlachos, A., Lipton, J.M., Auerbach, A.D., Ostrander, E.A. (2012): Sensitive quantification of mosaicism using high density SNP arrays and the cumulative distribution function. *Molecular Genetics and Metabolism* 105: 665-671.

- Martin, J.M., Kellett, J.M., Kahn, J. (1980): Aneuploidy in cultured human lymphocytes: I. Age and sex differences. *Age and Ageing* 9: 147-153.
- Marusyk, A., Almendro, V., Polyak, K. (2012): Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nature Reviews Cancer* 12: 323-334.
- Menasha, J., Levy, B., Hirschhorn, K., Kardon, N.B., (2005): Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: new insights from a 12-year study. *Genetics in Medicine* 7: 251-263.
- Menten, B., Swerts, K., Delle Chiaie, B., Janssens, S., Buysse, K., Philippé, J., Speleman, F. (2009): Array comparative genomic hybridization and flow cytometry analysis of spontaneous abortions and mors in utero samples. *BMC medical genetics* 10: 89.
- Mertzanidou, A., Wilton, L., Cheng, J., Spits, C., Vanneste, E., Moreau, Y., Vermeesch, J.R., Sermon, K. (2013): Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Human Reproduction* 28: 256-264.
- Miller, D.T., Adam, M.P., Aradhya, S., Biesecker, L.G., Brothman, A.R., Carter, N.P., Carter, D.M., Crolla, J.A., Eichler, E.E., Epstein, C.H. *et al.* (2010): Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. *The American Journal of Human Genetics* 86: 749-764.
- Naicker, T., Aldous, C. (2014): Two Trisomy 22 Live Births in One Hospital in 15 Months: Is It as Rare as We Thought? *Fetal and Pediatric Pathology* 33: 35-41.
- Nazarenko, S.A., Timoshevsky, V.A., Sukhanova, N.N. (1999): High frequency of tissue-specific mosaicism in Turner syndrome patients. *Clinical Genetics* 56: 59-65.
- Ng, S., Buckingham, K.J., Bigham, A.W., Tabor, H.K., Dent, K.M., Huff, C.H.D., Shannon, P.T., Jabs, E.W., Nickerson, D.A., Shendure, J. (2010): Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nature Genetics* 42: 30-35.
- Ngai, Y.F., Mercimek-Mahmutoglu, S., Stewart, L., Yong, S., Robinson, W.P., Gibson, W.T. (2010): Pseudohypoparathyroidism type 1a and the GNAS p.R231H mutation: Somatic mosaicism in a mother with two affected sons. *American Journal of Medical Genetics Part A* 152A: 2784-2790.
- Nielsen, J., Wohler, M. (1991): Chromosome abnormalities found among 34910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Århus, Denmark. *Human Genetics* 87: 81-83.
- Niemitz, E.L., Feinberg, A.P. (2004): Epigenetics and Assisted Reproductive Technology: A Call for Investigation. *The American Journal of Human Genetics* 74: 599-609.
- Nowinski, G.P., Van Dyke, D.L., Tilley, B.C., Jacobsen, G., Babu, V.R., Worsham, M.J., Wilson, G.N., Weiss, L. (1990): The frequency of aneuploidy in cultured lymphocytes is correlated with age and gender but not with reproductive history. *American Journal of Human Genetics* 46: 1101-1111.
- Okada, H., Dobashi, M., Yamazaki, T., Fujisawa, M., Arakawa, S., Kamidono, S. (2001): Fluorescence in situ hybridization analysis of sex-chromosome mosaicism in azoospermic men. *Journal of Andrology* 22: 970-972.
- Olinici, C.D. (1975): Report of a case of 46,xx/45,xx,-20 mosaicism. *Annales De Genetique* 18: 206-208.
- Papavassiliou, P., York, T.P., Gursoy, N., Hill, G., Nicely, L.V., Sundaram, U., McClain, A., Aggen, S.H., Eaves, L., Riley, B., Jackson-Cook, C. (2009): The phenotype of persons having mosaicism for trisomy 21/Down syndrome reflects the percentage of trisomic cells present in different tissues. *American Journal of Medical Genetics Part A* 149A: 573-583.
- Pinkel, D., Seagraves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., Collins, C., Kuo, W.L., Chen, C., Zhai, Y., Dairkee, S.H. *et al.* (1998): High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature Genetics* 20: 207-211.

- Pinto, D., Darvishi, K., Shi, X., Rajan, D., Rigler, D., Fitzgerald, T., Lionel, A.C., Thiruvahindrapuram, B., MacDonald, J.R., Mills, R. *et al.* (2011): Comprehensive assessment of array-based platforms and calling algorithms for detection of copy number variants. *Nature Biotechnology* 29: 512-520.
- Qin, W., Kozłowski, P., Taillon, B.E., Bouffard, P., Holmes, A.J., Janne, P., Camposano, S., Thiele, E., Franz, D., Kwiatkowski, D.J (2010): Ultra deep sequencing detects a low rate of mosaic mutations in tuberous sclerosis complex. *Human Genetics* 127: 573-582.
- Rajcan-Separovic, E., Diego-Alvarez, D., Robinson, W.P., Tyson, C., Qiao, Y., Harvard, C., Fawcett, C., Kalousek, D., Philipp, T., Somerville, M.J. *et al.* (2010): Identification of copy number variants in miscarriages from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Human Reproduction* 25: 2913-2922.
- Reittinger, A.M., Helm, B.M., Boles, D.J., Gadi, I.K., Schrier Vergano, S.A. (2017): A prenatal diagnosis of mosaic trisomy 5 reveals a postnatal complete uniparental disomy of chromosome 5 with multiple congenital anomalies. *American Journal of Medical Genetics Part A* 173: 2528-2533.
- Riccardi, V.M. (1977): Trisomy 8: an international study of 70 patients. *Birth Defects Original Article Series* 13: 171-184.
- Robberecht, C., Schuddinck, V., Fryns, J.P., Vermeesch, J.R. (2009): Diagnosis of miscarriages by molecular karyotyping: benefits and pitfalls. *Genetics in Medicine* 11: 646-654.
- Robinson, W.P. (2000): Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences. *BioEssays* 22: 452-459.
- Robinson, W.P., Barrett, I.J, Bernard, L., Telenius, A., Bernasconi, F., Wilson, R.D., Best, R.G., Howard-Peebles, P.N., Langlois, S., Kalousek, D.K. (1997): Meiotic origin of trisomy in confined placental mosaicism is correlated with presence of fetal uniparental disomy, high levels of trisomy in trophoblast, and increased risk of fetal intrauterine growth restriction. *American Journal of Human Genetics* 60: 917-927.
- Robinson, W.P., Bernasconi, F., Lau, A., McFadden, D.E. (1999): Frequency of meiotic trisomy depends on involved chromosome and mode of ascertainment. *American Journal of Medical Genetics* 84: 34-42.
- Robinson, W.P., Bernasconi, F., Mutirangura, A., Ledbetter, D.H., Langlois, S., Malcolm, S., Morris, M.A., Schinzel, A.A. (1993): Nondisjunction of chromosome 15: origin and recombination. *American Journal of Human Genetics* 53: 740-751.
- Rohlin, A., Wernersson, J., Engwall, Y., Wiklund, L., Björk, J., Nordling, M. (2009): Parallel sequencing used in detection of mosaic mutations: Comparison with four diagnostic DNA screening techniques. *Human Mutation* 30: 1012-1020.
- Rubio, C., Rodrigo, L., Mercader, A., Mateu, E., Buendía, P., Pehlivan, T., Vilorio, T., De los Santos, M.J., Simón, C., Remohí, J., Pellicer, A. (2007): Impact of chromosomal abnormalities on preimplantation embryo development. *Prenatal Diagnosis* 27: 748-756.
- Russell, L.M., Strike, P., Browne, C.E., Jacobs, P.A. (2007): X chromosome loss and ageing. *Cytogenetic and Genome Research* 116: 181-185.
- Sasaki, M., Lange, J., Keeney, S. (2010): Genome destabilization by homologous recombination in the germ line. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11: 182-195.
- Seshadri, R., Kutlaca, R.J, Trainor, K., Matthews, C., Morley A.A (1987): Mutation rate of normal and malignant human lymphocytes. *Cancer Research* 47: 407-409.

- Shaffer, L.G., Dabell, M.P., Fisher, A.J., Coppinger, J., Bandholz, A.M., Ellison, J.W., Ravnán, J.B., Torchia, B.S., Ballif, B.C., Rosenfeld, J.A. (2012): Experience with microarray-based comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis in over 5000 pregnancies. *Prenatal Diagnosis* 32: 976-985.
- Shaw-Smith, C., Redon, R., Rickman, L., Rio, M., Willatt, L., Fiegler, H., Firth, H., Sanlaville, D., Winter, R., Colleaux, L., Bobrow, M., Carter, N.P. (2004): Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *Journal of Medical Genetics* 41: 241-248.
- Shendure, J. Ji, H. (2008): Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 26: 1135-1145.
- Shirley, M.D., Tang, H., Gallione, C.J., Baugher, J.D., Frelin, L.P., Cohen, B., North, P.E., Marchuk, D.A., Comi, A.M., Pevsner, J. (2013): Sturge-Weber Syndrome and Port-Wine Stains Caused by Somatic Mutation in *GNAQ*. *New England Journal of Medicine* 368: 1971-1979.
- Schinzl, A. (2001) A catalog of unbalanced chromosome aberration in man. 2nd Edition, De Gruyter Verlag, Berlin, New York.
- Schubert, R., Viersbach, R., Eggermann, T., Hansmann, M., Schwanitz, G. (1997): Report of two new cases of Pallister-Killian syndrome confirmed by FISH: tissue-specific mosaicism and loss of i(12p) by *in vitro* selection. *American Journal of Medical Genetics* 72: 106-110.
- Snijders, A.M., Nowak, N., Segraves, R., Blackwood, S., Brown, N., Conroy, J., Hamilton, G., Hindle, A.K., Huey, B., Kimura, K., Law, S., Myambo, K. *et. al.* (2001): Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nature Genetics* 29: 263-264.
- Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., Benner, A., Döhner, H., Cremer, T., Lichter, P. (1997): Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes, Chromosomes & Cancer* 20: 399-407.
- Speicher, M.R., Carter, N.P. (2005): The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature Reviews. Genetics* 6: 782-792.
- Speicher, M.R., Gwyn Ballard, S., Ward, D.C. (1996): Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genetics* 12: 368-375.
- Spinner, N.B, Conlin, L.K. (2014): Mosaicism and clinical genetics. *American Journal of Medical Genetics* 166C: 397-405.
- Stallard, R., Haney, N.R., Frank, P.A., Styron, P., Juberg, J.C. (1981): Leukocyte chromosomes from parents of cytogenetically abnormal offspring: preliminary observations. *Cytogenetic and Genome Research* 30: 50-53.
- Stern, C. (1936): Somatic Crossing over and Segregation in *Drosophila Melanogaster*. *Genetics* 21: 625-730.
- Stone, J.F., Sandberg, A.A. (1995): Sex chromosome aneuploidy and aging. *Mutation Research* 338: 107-113.
- Surrallés, J., Jeppesen, P., Morrison, H., Natarajan, A.T. (1996): Analysis of loss of inactive X chromosomes in interphase cells. *American Journal of Human Genetics* 59: 1091-1096.
- Sybert, V.P., McCauley, E. (2004): Turner's Syndrome. *New England Journal of Medicine* 351: 1227-1238.
- Szuhai, K., Tanke, H.J. (2006): COBRA: combined binary ratio labeling of nucleic-acid probes for multi-color fluorescence *in situ* hybridization karyotyping. *Nature Protocols* 1: 264-275.

- Taylor, T.H., Gitlin, S.A., Patrick, J.L., Crain, J.L., Wilson, J.M., Griffin, D.K. (2014): The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans. *Human Reproduction Update* 20: 571-581.
- Taysi, K., Kohn, G., Mellman, W.J. (1970): Mosaic mongolism. II. Cytogenetic studies. *The Journal of Pediatrics* 76: 880-885.
- Theisen, A., Rosenfeld, J.A., Farrell, S.A., Harris, C.J., Wetzell, H.H., Torchia, B.A., Bejjani, B.A., Ballif, B.C., Shaffer, L.G. (2009): aCGH detects partial tetrasomy of 12p in blood from Pallister-Killian syndrome cases without invasive skin biopsy. *American Journal of Medical Genetics Part A*: 149A: 914-918.
- Tjio, J. H., Levan, A. (1956): The chromosome number of man. *Hereditas* 42: 1-6.
- Tjio, J.H., Levan, A. (2010): THE CHROMOSOME NUMBER OF MAN. *Hereditas* 42: 1-6.
- Toral-Lopez, J., Gonzalez-Huerta, L.M., Cuevas-Covarrubias, S.A. (2012): Complete monosomy mosaic of chromosome 21: Case report and review of literature. *Gene* 510: 175-179.
- Valli, R., Maserati, E., Marletta, C., Pressato, B., Lo Curto, F., Pasquali, F. (2011): Evaluating chromosomal mosaicism by array comparative genomic hybridization in hematological malignancies: the proposal of a formula. *Cancer Genetics* 204: 216-218.
- Van Dyke, D.L., Wiktor, A. (2003): Monosomy 21 in hematologic diseases. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 142: 137-141.
- Vanneste, E., Voet, T., Le Caignec, C., Ampe, M., Konings, P., Melotte, C., Debrock, S., Amyere, M., Vikkula, M., Schuit, F. *et al.* (2009): Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nature Medicine* 15: 577-583.
- Veitia, R.A. (2018): On the loss of human sex chromosomes in lymphocytes with age: a quantitative treatment. *European journal of human genetics* 26: 1875-1878.
- Vermeesch, J.R., Brady, P.D., Sanlaville, D., Kok, K., Hastings, R.J. (2012): Genome-wide arrays: quality criteria and platforms to be used in routine diagnostics. *Human Mutation* 33: 906-915.
- Vissers, L.E.L.M., de Vries, B.B.A., Osoegawa, K., Janssen, I.M., Feuth, T., Choy, C.H.O., Straatman, H., van der Vliet, W., Huys, E.H.L.P.G., van Rijk, A., Smeets, D. *et al.* (2003): Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *American Journal of Human Genetics* 73: 1261-1270.
- Wapner, R.J., Martin, C.H.L., Levy, B., Ballif, B.C., Eng, C.H.M., Zachary, J.M., Savage, M., Platt, L.D., Saltzman, D., Grobman, W.A. *et al.* (2012): Chromosomal Microarray versus Karyotyping for Prenatal Diagnosis. *New England Journal of Medicine* 367: 2175-2184.
- Ward, B.E., Hayden, M.W., Robinson, A., Opitz, J.M., Reynolds, J.F. (1988): Isochromosome 12p mosaicism (Pallister-Killian syndrome): Newborn diagnosis by direct bone marrow analysis. *American Journal of Medical Genetics* 31: 835-839.
- Weleber, R.G., Zonana, J. (1983): Iris hamartomas (Lisch nodules) in a case of segmental neurofibromatosis. *American Journal of Ophthalmology* 96: 740-743.
- Wenger, S.L., Golden, W.L., Dennis, S.P., Steele, M.W. (1984): Are the occasional aneuploid cells in peripheral blood cultures significant? *American Journal of Medical Genetics* 19: 715-719.
- Williams, B.R., Prabhu, V.R., Hunter, K.E., Glazier, C.M., Whittaker, C.A., Housman, D.E., Amon A. (2008): Aneuploidy Affects Proliferation and Spontaneous Immortalization in Mammalian Cells. *Science* 322: 703-709.
- Wolff, D.J., Van Dyke, D.L., Powell, C.M. (2010): Laboratory guideline for Turner syndrome. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 12: 52-55.
- Woodruff, M.F. (1983): Cellular heterogeneity in tumours. *British Journal of Cancer* 47: 589-594.

Yatsenko, S.A., Shaw, C.H.A., Ou, Z., Pursley, A.N., Patel, A., Bi, W., Cheung, S.W., Lupski, J.R., Chinault, A.C., Beaudet, A.L. (2009): Microarray-based comparative genomic hybridization using sex-matched reference DNA provides greater sensitivity for detection of sex chromosome imbalances than array-comparative genomic hybridization with sex-mismatched reference DNA. *The Journal of molecular diagnostics: JMD* 11: 226-237.

Youssofian, H., Pyeritz, R.E. (2002): Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans. *Nature Reviews Genetics* 3: 748-758.

Yunis, J.J. (1976): High resolution of human chromosomes. *Science (New York, N.Y.)* 191: 1268-1270.

Zhao, L., van Oort, J., Cork, A., Liang, J.C. (1993): Comparison between interphase and metaphase cytogenetics in detecting chromosome 7 defects in hematological neoplasias. *American Journal of Hematology* 43: 205-211.

Zlotogora, J. (1998): Germ line mosaicism. *Human Genetics* 102: 381-386.

Zoznam obrázkov a tabuliek

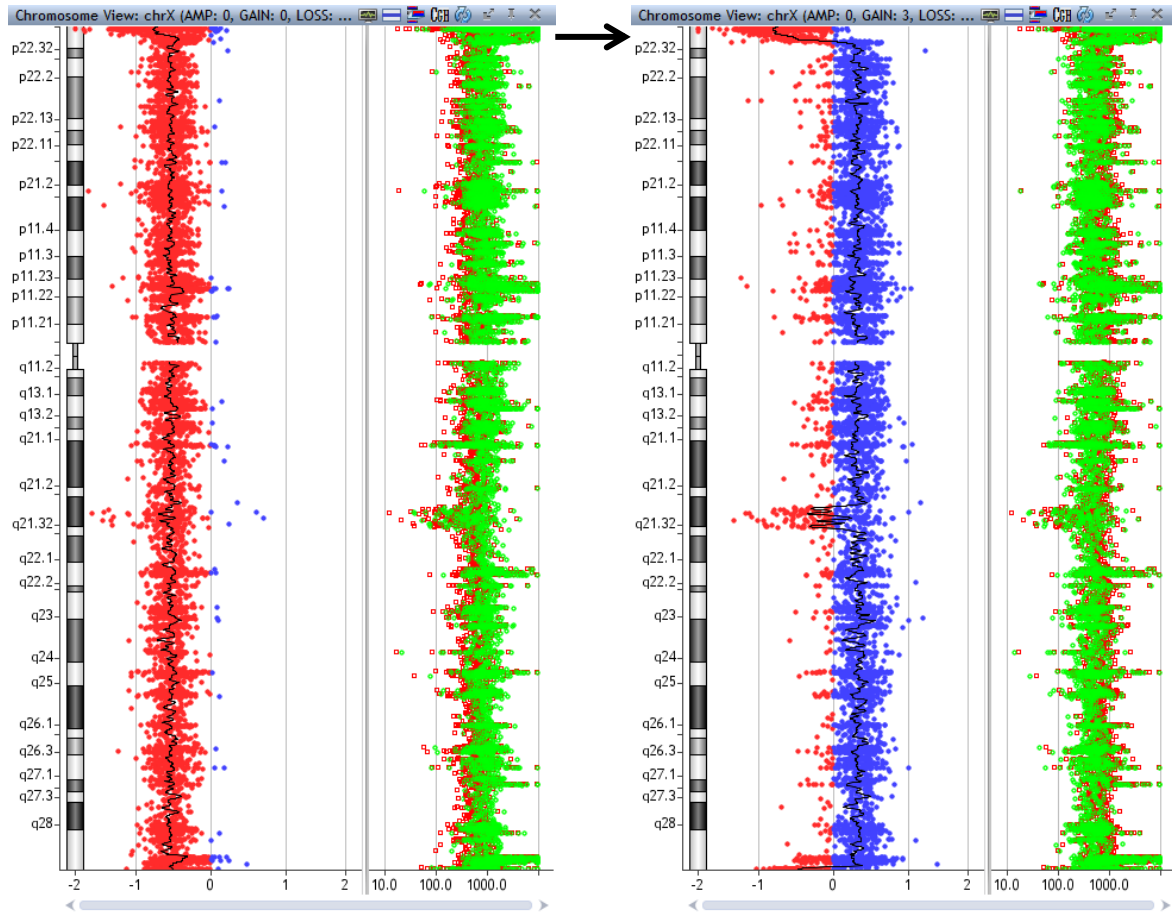
Zoznam obrázkov

Obrázok 1. Somatický mozaicizmus	12
Obrázok 2. Typy chromozómovej mozaiky	14
Obrázok 3. Schematické zobrazenie rôznych mechanizmov vedúcich k somatickým mozaikám ..	18
Obrázok 4. Detekcia izochromozómu 12p u pacientov s Pallister-Killianovým syndrómom	24
Obrázok 5. Karyotyp u pacienta A16	65
Obrázok 6. Metódou FISH preukázaná mozaika bunkovej línie 45,X u pacientky G1	68
Obrázok 7. Metódou FISH u pacientky G2	68
Obrázok 8. Vyšetrenie pacientky G4 metódou FISH	69
Obrázok 9. Vyšetrenie metódou FISH u pacienta A8	72
Obrázok 10. Vyšetrenie metódou FISH u pacienta A16	72

Zoznam tabuliek

Tabuľka 1. Výskyt straty X chromozómu u žien v závislosti od veku	26
Tabuľka 2. Súbor všetkých pacientov	41
Tabuľka 3. Arteficiálne vyrobené mozaiky (A-E) namiešané v danom pomere	42
Tabuľka 4. Zoznam všetkých použitých sond	43
Tabuľka 5. Prístroje na kultiváciu buniek	44
Tabuľka 6. Reagencie na kultiváciu buniek	44
Tabuľka 7. Prístroje na prípravu preparátov a na farbenie G-pruhovaním	47
Tabuľka 8. Reagencie a roztoky na prípravu preparátov a na farbenie G-pruhovaním	47
Tabuľka 9. Prístroje na prípravu preparátov pre metódu FISH	51
Tabuľka 10. Reagencie a roztoky na prípravu preparátov – pre vyšetrenie metódou FISH	51
Tabuľka 11. Prístroje na prípravu preparátov na vyšetrenie metódu FISH	52
Tabuľka 12. Reagencie a roztoky na vyšetrenie metódou FISH	52
Tabuľka 13. Prístroje na prípravu preparátov na vyšetrenie metódu array CGH	55
Tabuľka 14. Reagencie a roztoky na vyšetrenie metódou array CGH	55
Tabuľka 15. Karyotypy pacientov (G1-G26) s mozaicizmom gonozómov	63
Tabuľka 16. Karyotypy pacientov (A1-A19) s mozaicizmom autozómov	65
Tabuľka 17. Karyotypy u pacienta A10 získané z periférnej krvi a z kožných fibroblastov	66
Tabuľka 18. Výsledky získané metódou FISH u pacientov (G1-G26)	67
Tabuľka 19. Výsledky u pacientky G25 získané metódou FISH	67
Tabuľka 20. Výsledky získané metódou FISH u pacientov G2 a G9	67
Tabuľka 21: Výsledky získané metódou FISH u pacientov (A1-A19)	71
Tabuľka 22. Porovnanie percentuálneho zastúpenia bunkových línií z karyotypu a FISH	73
Tabuľka 23. Porovnanie percentuálneho zastúpenia bunkových línií z karyotypu a metódy FISH ..	74
Tabuľka 24. Porovnanie percentuálneho zastúpenia bunkových línií z karyotypu a metódy FISH ..	75
Tabuľka 25. Porovnanie percentuálneho zastúpenia bunkových línií u metódy FISH	76
Tabuľka 26. Výsledky u pacientov získané pomocou array CGH	78
Tabuľka 27. Namerané hodnoty SD pomocou array CGH	78
Tabuľka 28. Namerané hodnoty SD pri pacientke G18 a G19 pomocou array CGH	79
Tabuľka 29. Výsledky jednotlivých tkanív získané metódou FISH a karyotypom	80
Tabuľka 30. Výsledky karyotypu arteficiálne vyrobených mozaik (A-E)	81
Tabuľka 31. Výsledky arteficiálne vyrobených mozaik (A-E) získané pomocou metódy FISH ..	82

Príloha 1



Príloha č.1: Snímka výsledku u pacientky G18 z platformy 8x60K Agilent array CGH. Vľavo je vidieť výsledok vyšetrovanej vzorky proti ženskej referencii, ktorý naznačuje deléciu chromozómu X (viac červených bodov – záporné hodnoty SD) a vpravo proti mužskej referencii (viac modrých bodov – kladné hodnoty SD), výsledok preukázal duplikáciu chromozómu X. V hornej časti obrázku je možné vidieť deléciu génu *SHOX* (čierna šípka). Na obrázku je znázornený chromozóm X.