

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERSITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

BAKALÁRSKA PRÁCA

MOLEKULÁRNE
CYTOGENETICKÁ ANALÝZA
MARKER CHROMOZÓMOV

ŠKOLITEĚ: RNDR. EDUARD KOČÁREK, PH.D.

ADAM SEMANKO

2008/2009

Rád by som toutou formou poďakoval svojmu školiteľovi RNDr. Eduardovi Kočárkovi, Ph.D. za mimoriadne podnetné poznámky k práci a za podporu a pomoc pri jej vytváraní.

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne, len s použitím citovanej literatúry a pod vedením vedúceho bakalárskej práce.

V Prahe dňa 29.4.2009

.....

Adam Semanko

Abstrakt

Marker chromozómy (sSMC) sú malé nadpočetné chromozómy ľudského karyotypu, ktoré sú menšie ako chromozóm 20 v rovnakej metafáze. Vznikajú buď ulomením alebo v procese nerovnomernej rekombinácie (tzv. výmena typu U). Môžu byť odvodené od všetkých ľudských chromozómov, ale najčastejšie sa jedná o akrocentrické chromozómy. Táto podskupina markerov nesie so sebou až štyrikrát nižšie riziko abnormálneho fenotypu než markery nonakrocentrického pôvodu. Na výsledný fenotyp má vplyv taktiež familiárny výskyt a výskyt v mozaikách, prítomnosť euchromatínu, či uniparentálna dizómia. Frekvencia markerov je v zdravej populácii asi 0,044%, zvýšená je potom u mentálne retardovaných pacientov a ľudí trpiacich poruchami plodnosti, ktoré súvisia s neštandardnou chromozómovou sadou obsahujúcou marker. Najväčšie marker chromozómy možno niekedy charakterizovať za využitia metód štandardnej karyotypizácie. Spravidla je však nutné voliť metódy molekulárne cytogenetické, prípadne molekulárne biologické. Najčastejšie ide o fluorescenčnú *in situ* hybridizáciu a jej obmeny – multifarebnú FISH a spektrálnu karyotypizáciu (u komplexných markerov), multifarebné pruhovanie, reverznú FISH a mikroFISH (u markerov neznámeho pôvodu). Preferovanými sondami sú centromerické sondy, ale využívajú sa tiež lokus špecifické a celochromozómové maľovacie sondy. V prípade potreby sa prevádza tiež komparatívna genómová hybridizácia, resp. array-CGH (DNA čipy), ktorá umožňuje odhaliť prítomnosť euchromatínu na markeroch.

Kľúčové slová:

marker chromozóm, sSMC, uniparentálna dizómia, mozaika, neocentroméra, mentálna retardácia, neplodnosť, FISH, M-FISH, CGH, centromerická sonda

Abstract

Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) are extra chromosomes of human karyotype, which are smaller in length than chromosome 20 of the same metaphase. They originate as broken fragments of chromosomes or in the event of non-homologous recombination (U-type change). They can be derivatives of all human chromosomes, but the most common are markers of acrocentric origin. In terms of abnormal phenotype, acrocentric markers are four times less severe than their nonacrocentric counterparts. Other factors determining an overall phenotype are familiar and mosaic forms of markers, euchromatin presence or uniparental disomy. The frequency of a marker in a healthy population is approximately 0,044%. Higher frequencies can be found among the mentally retarded and people suffering from infertility, which arises from an atypical chromosome set containing a nonstandard chromosome. The largest markers could be identified by means of standard karyotyping, but in general, it is necessary to apply techniques of molecular cytogenetics, possibly molecular biology. The most common is fluorescent *in situ* hybridization and its modifications – namely multicolor FISH and spectral karyotyping (for complex markers), multicolor banding, reverse FISH and microFISH (for markers of unknown origin). The most frequently used are centromeric probes, but locus-specific and whole-chromosome probes can be employed as well. In case of a more detailed identification we use the technique of comparative genomic hybridization (CGH), or array-CGH; both capable of recognizing the presence of euchromatin on markers.

Key words:

marker chromosome, sSMC, uniparental disomy, mosaics, neocentromere, mental retardation, infertility, FISH, M-FISH, CGH, centromeric probe

Obsah

1. Úvod	6
2. Marker chromozómy	7
2.1. Charakteristika marker chromozómov	7
2.1.1. Význam a výskum marker chromozómov v historickom kontexte	7
2.1.2. Definícia a používané termíny	7
2.2. Vznik, pôvod a základné formy marker chromozómov	8
2.2.1. Vznik a pôvod marker chromozómov	8
2.2.2. Dedičnosť	10
2.2.3. Morfológia marker chromozómov	10
2.3. Fenotypovo-genotypová korelácia a stanovenie prognózy	18
2.3.1. Vplyv prítomnosti euchromatínu na fenotyp	18
2.3.2. Vplyv mozaík na fenotyp	20
2.3.3. Vplyv uniparentálnej dizómie na fenotyp	21
2.4. Klasifikácia marker chromozómov	22
2.5. Záchyt marker chromozómov v populácii a ich výskyt vo vybraných skupinách ...	23
3. Základné metódy využívané v diagnostike marker chromozómov	26
3.1. Konvenčná karyotypizácia	26
3.2. Fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia	27
3.2.1. Multifarebná fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia	28
3.2.2. Spektrálna karyotypizácia	28
3.2.3. Centromerická multifarebná fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia	29
3.2.4. Multifarebné pruhovanie	30
3.2.5. Reverzná fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia	30
3.2.6. Mikro-fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia	31
3.3. Komparatívna genómová hybridizácia	31
3.4. DNA čipy (array-CGH)	32
4. Záver	35
5. Zoznam použitej literatúry	36
6. Zoznam použitých skratiek	41

1. ÚVOD

Marker chromozómy sú nadpočetné chromozómové útvary, ktoré možno pozorovať v karyotype. Vyskytujú sa asi u 0,044% populácie, ale ich výskyt je zvýšený napr. u mentálne retardovaných pacientov alebo ľudí trpiacich neplodnosťou. Markery môžu vznikáť pri meióze, ale aj mitóze, takže vystupujú v mozaikách. Mechanizmy vzniku sú rôzne (uvádza sa napr. nerovnomerný crossing-over s následnou výmenou typu U), ale vznikajú aj pri procese trisomy rescue. Markery môžu byť familiárnej povahy, ale až dvakrát častejšie vznikajú *de novo*. Existujú tri základné morfológické typy markerov – malé markery, kruhové markery a izochromozómy (izodicentrické chromozómy). Okrem toho rozlišujeme neocentromerické markery a komplexné markery, ktoré obsahujú fragmenty rôznych chromozómov.

Pôvod markerov sa odhaduje, aby bolo možné stanoviť prognózu. Abnormálny fenotyp je pozorovaný u markerov *de novo* v 13% prípadov. U markerov akrocentrického pôvodu je to len 7%, zatiaľ čo u markerov nonakrocentrického pôvodu je to až 28%. Pri familiárnych formách fenotyp, možno predpokladať, že fenotyp dieťaťa sa bude zhodovať s fenotypom rodiča s markerom. Dôležitými faktormi pri stanovení prognózy je tiež prítomnosť a rozsah euchromatínu v markeri, uniparentálna dizómia a miera mozaicizmu.

Najčastejšie bývajú markery odvodené od chromozómu 15 [napr. *inv dup(15)*]. Ďalšie bežné markery sú typické pre konkrétne syndrómy – napr. *der(22)* u Emanuelovho syndrómu, *i(12p)* u syndrómu Pallister-Killian alebo *inv dup 22* u *cat-eye* syndrómu. Typické sú tiež ďalšie izochromozómy napr. *i(18p)*, *i(8p)* a *i(9p)*.

K presnej molekulárnej charakteristike markerov sa využívajú molekulárne cytogenetické metódy a molekulárne biologické metódy. Rutinne sa prevádzajú vyšetrenia pomocou metódy FISH za použitia multifarebných centromerických sond. Pre precíznejšie určenie je možné využiť mikrodisekciu spojenú s FISH alebo postupy genómovej hybridizácie (CGH, DNA čipy).

2. MARKER CHROMOZÓMY

2.1. CHARAKTERISTIKA MARKER CHROMOZÓMOV

2.1.1. VÝZNAM A VÝSKUM MARKER CHROMOZÓMOV V HISTORICKOM KONTEXTE

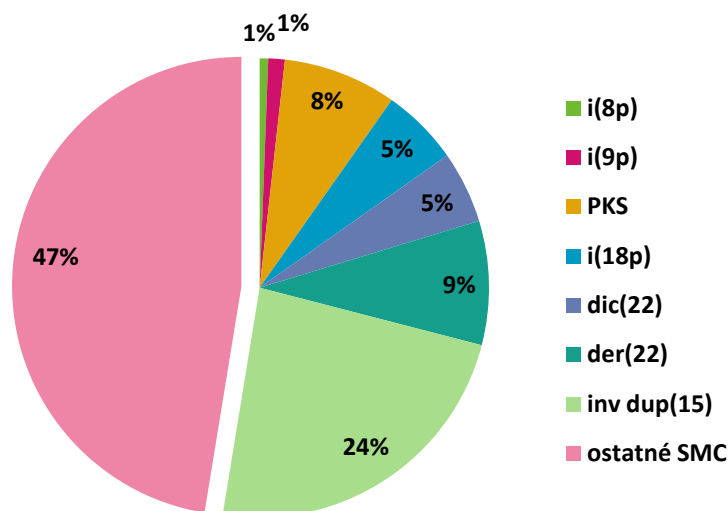
Po prvýkrát bol marker chromozóm popísaný v roku 1961 (1). Išlo o prípad nekompletnej trizómie, kedy dieťa nieslo minimálne stigmata Downovho syndrómu (epicanthus, veľký jazyk). V roku 1962 bol pozorovaný extra *de novo* akrocentrický chromozóm so satelitmi na krátkych i dlhých ramienkach u mentálne retardovanej pacientky (2). V roku 1963 Froland *et al.* (3) popísali chlapca s kongenitálnymi defektmi, mentálnou zaostalosťou a cerebrálnou atrofiou, ktorý bol nositeľom nadpočetného malého metacentrického chromozómu.

V roku 1987 Hook a Cross (4) previedli podrobnú štúdiu nadpočetných chromozómov, ale pôvod boli schopní identifikovať len u časti markerov. Podrobnejšia molekulárna charakteristika markerov bola možná až po zavedení metódy FISH. Množstvo autorov sa snažilo spojiť prítomnosť marker chromozómu s klinickou diagnózou a typickým fenotypom, a tak bolo popísaných niekoľko syndrómov, medzi inými i(18p) syndróm, i(9p) syndróm, Pallisterov-Killianov syndróm, Emanuelov syndróm, či cat-eye syndróm (5).

2.1.2. DEFINÍCIA A POUŽÍVANÉ TERMÍNY

Liehr *et al.* (6) definujú (malé) marker chromozómy ako štruktúrne abnormálne chromozómy, ktoré nemôžu byť jednoznačne identifikované a charakterizované použitím klasických cytogenetických metód. Vo všeobecnosti sú veľkostne menšie alebo rovnaké ako chromozóm 20 v rovnakej metafáze. Zo skupiny malých marker chromozómov teda niekedy veľkostne vyradujeme bežné izochromozómy, dic(22) = tzv. CES chromozóm

(bežný u cat-eye syndrómu), inv dup(15) a der(22). Zastúpenie jednotlivých marker chromozómov v celkovom spektre znázorňuje Graf 1.



Graf 1: Výskyt najčastejších foriem marker chromozómov v ľudskom karyotype [údaje adaptované podľa Liehra, The sSMC homepage (7)]

V literatúre sa možno stretnúť s nasledovnými označeniami marker chromozómov:

SMC/sSMC – (small) supernumerary marker chromosome (6, 8, 9, 10)

ESAC - extra structurally abnormal chromosomes (4,5)

SAC – small accessory chromosome (11)

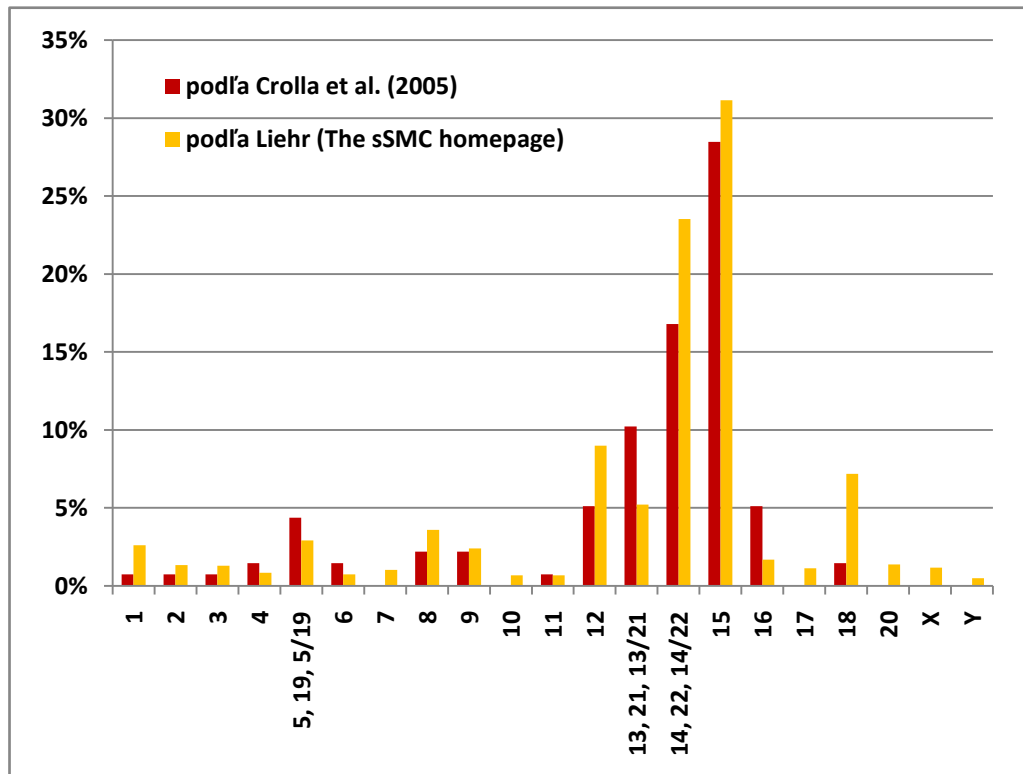
2.2. VZNIK, PÔVOD A ZÁKLADNÉ FORMY MARKER CHROMOZÓMOV

2.2.1. VZNIK A PÔVOD MARKER CHROMOZÓMOV

Christian *et al.* (12) prešetrili 4 bežné body zlomov (BP – break points) na chromozóme 15 asociované s Angelman/Prader-Willi syndrómom a nachádzajúce sa v danom kritickom regióne. V BP 2 a BP 3 odhalili duplikované oblasti obsahujúce niekoľko pseudogénov. Mimoriadna instabilita daného úseku (15q11–q13) by teda mohla byť spôsobená práve prítomnosťou spomínaných duplikonov, ktoré pri prvom meiotickom delení homológne rekombinujú a môže dochádzať k nerovnomernej výmene typu U nasledovnou

nondisjunkciou (9). Daným mechanizmom možno popísať vznik sSMC(15). Takéto chromozómy sú maternálneho pôvodu a obsahujú materiál z oboch homológov chromozómu 15 (13).

Podstatná časť sSMC je odvodená od akrocentrických chromozómov – Crolla *et al.* (9) uvádza až 64%. Veľkú časť pritom predstavujú deriváty chromozómu 15 (väčšinou ide o inv dup) – 35% (9) , 50% (14). Sú teda najčastejšie diagnostikovanými sSMC u človeka, čo úzko súvisí s faktom, že *de novo* sSMC 15 boli asociované so zvýšeným vekom matky, zatiaľ čo obecné vek matky nehrá žiadnu rolu pri vzniku sSMC (9).



Graf 2: Percentuálne zastúpenie sSMC derivovaných od jednotlivých chromozómov ľudskeho karyotypu (5/19, 13/21 a 14/22 boli sSMC, ktorých pôvod nemohol byť jednoznačne určený)

2.2.2. DEDIČNOSŤ

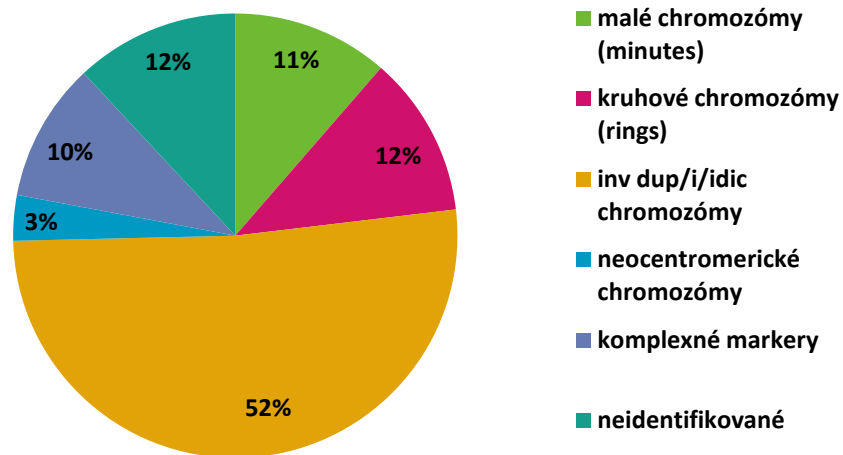
Familiárne formy sSMC boli zaznamenané v 20% prípadov (14), 31% prípadov (15), 42% prípadov z celkového počtu sSMC prípadov (16). Výrazné rozdiely medzi jednotlivými štúdiami sú zapríčinené malým súborom pozorovaných sSMC prípadov. Prítomnosť sSMC vedie zrejme častejšie k neplodnosti u mužov než u žien (u neplodných mužov je nález sSMC až 7,5krát častejší), a preto sa sSMC dedia preferenčne po maternálnej línii (6). Zdedené sSMC väčšinou obsahujú len heterochromatín (15).

Naopak *de novo* sSMC obsahujú aj euchromatín, ktorý môže mať výrazný dopad na fenotyp - Bartsch *et al.* (15) zaznamenali medzi *de novo* sSMC euchromatín až v polovici prípadov. *De novo* formy sú častejšie u nonakrocentrických chromozómov. Predstavujú až 90% prípadov, zatiaľ čo u akrocentrických chromozómov je to len 60% (9, 6)

Liehr *et al.* (6) stanovili pomer *de novo* k familiárnym formám na 2:1, a to vo všetkých skúmaných podskupinách (prenatálne štúdie na náhodných i vopred vymedzených súboroch, postnatálne štúdie). Crolla *et al.* (9) toto rozdelenie potvrdili; v svojej štúdii totiž zaznamenali 70% *de novo* sSMC a 30% familiárnych sSMC (z toho 19% zdedených maternálne a 11% paternálne).

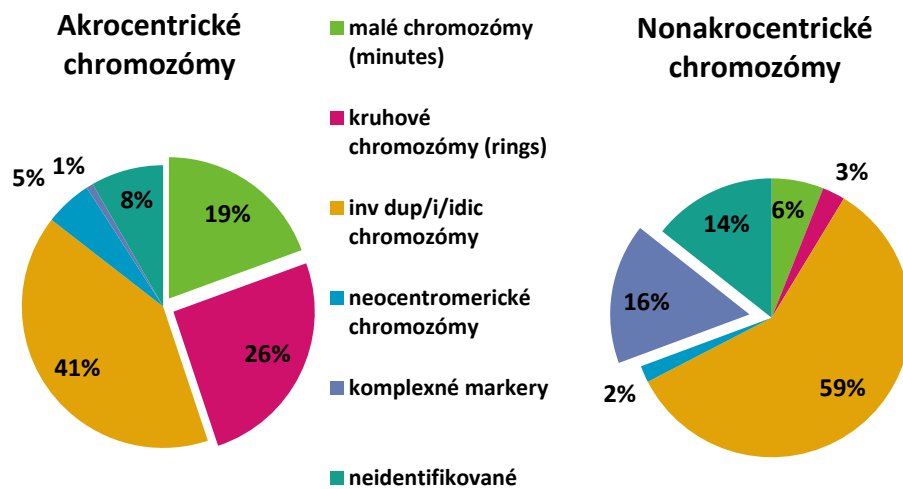
2.2.3. MORFOLÓGIA MARKER CHROMOZÓMOV

V populácii marker chromozómov rozlišujeme 3 základné morfológické typy: malé marker chromozómy - minutes (v užšom slova zmysle ide o malé nekruhové markery väčšinou pozostávajúce z centromerickej oblasti a pericentromerického heterochromatínu), kruhové chromozómy -rings a najpočetnejšiu (až 52% všetkých sSMC) skupinu chromozómov s invertovanou duplikáciou (prípady izochromozómov, resp. izodicentrických chromozómov). Okrem toho možno vyčleniť skupinu sSMC s neocentromérou a komplexné sSMC.



Graf 3: Zastúpenie jednotlivých morfológických foriem sSMC v populácii marker chromozómov (údaje adaptované podľa Liehra, The sSMC homepage)

Výpovednú hodnotu má aj prerozdelenie jednotlivých foriem sSMC medzi skupiny akrocentrických (chromozómy 13, 14, 15, 21 a 22) a nonakrocentrických chromozómov. V oboch skupinách sú najpočetnejšie invertované duplikácie a izochromozómy. Medzi akrocentrickými chromozómami potom možno nájsť veľkú časť malých chromozómov, ale hlavne kruhové chromozómy, ktoré sú až trikrát početnejšie než u nonakrocentrických chromozómov. Medzi nonakrocentrickými chromozómami naopak nachádzame veľké zastúpenie komplexných sSMC.



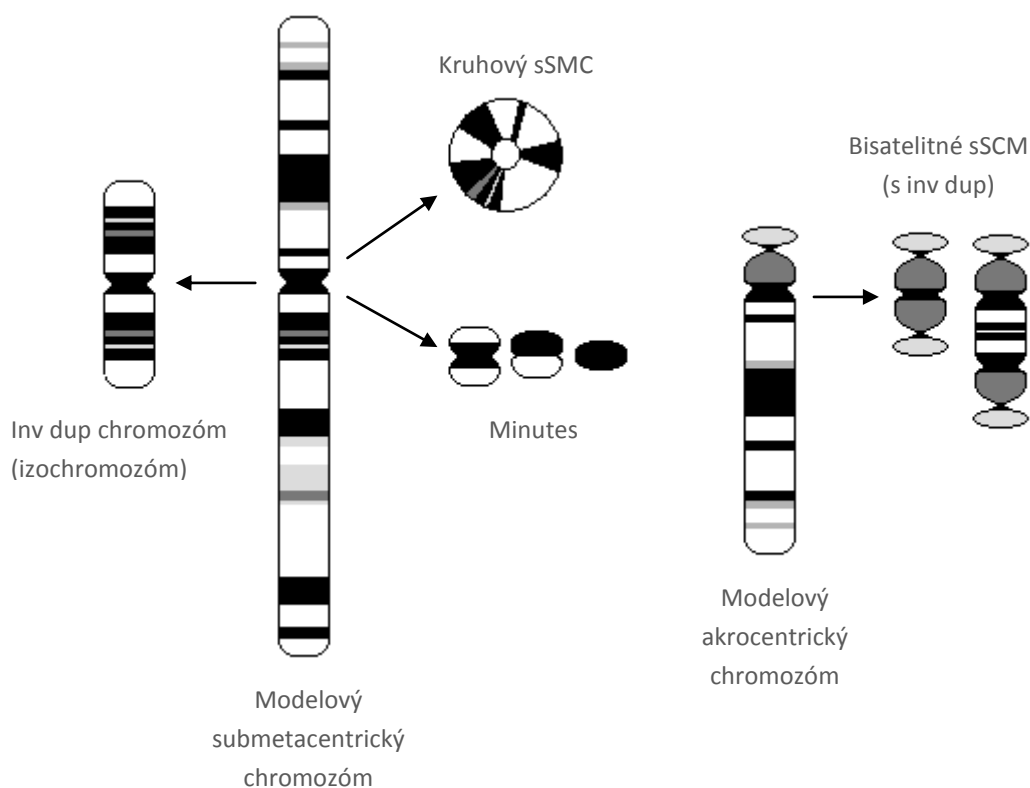
Graf 4: Zastúpenie jednotlivých morfológických foriem sSMC v závislosti na ich akrocentrickom/nonakrocentrickom pôvode (údaje adaptované podľa Liehra, The sSMC homepage)

2.2.3.1. MALÉ MARKER CHROMOZÓMY - MINUTES

Malé marker chromozómy obsahujú jedinú centroméru a nie sú cirkularizované (Obrázok 1). Vzhľadom na značnú redukciu pericentromerických sekvencií je zložitá charakterizovať ich molekulárne, dokonca i za použitia metód CGH a FISH, ako dokumentujú na prípade s niekoľkými komplexnými sSMC Tsuchiya *et al.* (17). Crolla *et al.* (16) zaznamenali vo svojej štúdií až 50% malých („minutes“) sSMC obsahujúcich iba heterochromatín jednotlivých centromerických oblastí – 1, 4, 12, 13/21, 14, 16, 19 a 5/19.

Nález malého sSMC bez euchromatínového regiónu je veľmi často pozorovaný v asociácii s mechanizmom označovaným ako trisomy rescue. Stefanou a Crocker (18) zaznamenali prípad min sSMC 21, ktorý s najväčšou pravdepodobnosťou vznikol z nadpočetného chromozómu 21. Riziko Downovho syndrómu bolo v tomto prípade odvrátené redukciou tohto extra chromozómu na malý fragment. V podobných prípadoch je nevyhnutné pri stanovovaní prognózy zväžiť mozaikové rozšírenie markeru a uniparentálnu dizómiu (UPD). Je potrebné prešetriť niekoľko ďalších bunčných línií, aby sme vylúčili prítomnosť aneuploidnej línie s neredukovaným tretím

chromozómom, ktorý by mohol mať nepriaznivý fenotypický dopad. Samotný min sSMC však so sebou riziko abnormálneho fenotypu nenesie.



Obrázok 1: Príklady jednotlivých morfológických foriem sSMC

2.2.3.2. KRUHOVÉ MARKER CHROMOZÓMY - RINGS

Ďalšou skupinou sSMC sú kruhové - ring (r) chromozómy (Obrázok 1), ktorých veľkosť je menšia než šírka metafazického chromozómu (11). Barsch *et al.* (15) zaznamenali vo svojej štúdií 31% kruhových sSMC odvodených od chromozómov 1, 4, 6, 8, 11, 16, 17, 19, 21 a 22. Všetky tieto sSMC vznikli *de novo*. Crolla *et al.* (16) pozorovali tiež kruhové sSMC 3 a 20. Liehr (7) udáva príklady kruhových sSMC u všetkých chromozómov okrem sSMC(13). Najfrekvencovanejšími kruhovými sSMC sú r(1) a r(8) v relatívnom zastúpení 13 a 12%. Kruhový chromozóm 8 je pritom až v 70% priamo zodpovedný za abnormálny fenotyp (19).

Marker chromozómy zostavené len z heterochromatínu vykazujú normálny fenotyp (11). Abnormálne fenotypy sú vo všeobecnosti pozorované najčastejšie v prípade malých kruhových sSMC s euchromatínom - v 28% pokiaľ šlo o deriváty nonakrocentrických a 7% u derivátov akrocentrických chromozómov (16). Mnohé kruhové sSMC rovnakého chromozomálneho pôvodu obsahujú podobné euchromatínové sekvencie, čo naznačuje, že aj pri vzniku kruhových sSMC môžu mať význam nenáhodné zhluky BP na konkrétnom chromozóme (11). K zlomom teda dochádza v konkrétnych oblastiach a vznikajú skupiny sSMC s charakteristickým fenotypom.

V prípade r(1) a r(4) však nejde o vznik dependentný na konkrétnej sekvencii, keďže väčšina zaznamenaných BP sa nachádza v odlišných regiónoch. Pri vzniku väčších kruhových chromozómov dochádza k ich následnej redukcii. V procese bunčného delenia s kruhovými chromozómami, ktoré sú navzájom interlokované, dochádza k opakovaným zlomom a fúziám. Objavujú sa rôzne formy kruhových sSMC v rôznych bunčných líniiach, ale len línie s minimálnym rozsahom aneuploidie sa v postzygotickom vývoji výraznejšie presadia a uchytiť (11).

2.2.3.3. MARKER CHROMOZÓMY S INVERTOVANOU DUPLIKÁCIU

Marker chromozóm obsahujúci invertovanú duplikáciu predstavuje morfológicky chromozóm, ktorého ramienka sú tvorené tou istou sekvenciou, tzv. izochromozóm (Obrázok 1). Špecifickým typom je izodicentrický chromozóm s dvoma centromérmi, medzi ktorými je zdublikovaná oblasť. Tieto sú často akrocentrického pôvodu; zdublikované sú teda časti q ramienok, a za obidvoma centromérmi sa nachádzajú β -satelitné oblasti p ramienok. Hovoríme tiež o bisatelitných chromozómoch.

Medzi sSMC typu inv dup sú najpočetnejšie práve deriváty akrocentrických chromozómov, čiže bisatelity. Bartsch *et al.* (15) zaznamenali až 57% týchto sSMC. V danej štúdií boli zaznamenané izochromozómy 13p, 21p a 22p, a dicentrické chromozómy odvodené od chromozómov 13/21, 15 a 22 (tzv.

CES chromozóm, CES = cat eye syndrome). Crolla *et al.* (16) zaznamenali navyše bisatelity odvodené od 14, resp. 14/22. Krátke ramienka akrocentrických chromozómov a malé dicentrické chromozómy 15 a 22 neobsahujú všeobecne žiadne gény, u ktorých by zmena dávky vyvolala abnormálny fenotyp. Preto sa predpokladá len mierne zvýšené riziko atypického fenotypu u tohto typu sSMC (15). Podľa údajov The sSMC homepage (7) sú z nonakrocentrických markrov najbežnejšie izochromozóm 12 – Pallisterov-Killianov syndróm (16% všetkých inv dup sSMC) a izochromozóm 18 (11% všetkých inv dup sSMC).

2.2.3.4. NEOCENTROMERICKÉ CHROMOZÓMY

Neocentroméry boli po prvýkrát a najčastejšie pozorované u sSMC, ktoré stratili pôvodnú centroméru, ale detegované boli aj v niektorých rakovinových bunkách (napr. lipómy). V štúdiu, ktorú previedli Amor a Choo (20) boli konštitutívne ľudské neocentroméry pozorované na 16 rôznych chromozómoch a šlo principiálne o analfoidné sekvencie (sekvencie nehybridizujúce s α -satelitnými sondami) bohaté na AT páry báz. Liehr (7) zhrnul údaje o neocentromerických sSMC z 20 rôznych chromozómov, z ktorých najpočetnejšie (23,5% všetkých neocentromerických sSMC) boli sSMC(15).

K vzniku neocentroméry dochádza pri štruktúrnej prestavbe niektorého z chromozómov. Najčastejším (až 78% prípadov) mechanizmom je podľa Amor a Choo (20) vznik invertovanej duplikácie pri výmene typu U počas meiózy. Takto vzniknutý sSMC sa dostáva spolu s normálnym homológom do gaméty, ktorá sa stáva parciálne trizomickou. Zaujímavé je, že neocentroméra je vytvorená len v jednej polovici sSMC napriek tomu, že druhá polovica obsahuje identickú sekvenciu. Vo zvyšných prípadoch sa centroméra vytvára vo fragmente, ktorý je vedľajším produktom delécie. Ak ide o pericentrickú deléciu, vzniká lineárny neocentromerický sSMC, v prípade paracentrickej delécie potom kruhová forma. Formovanie neocentroméry je mechanizmus, ktorý zabezpečuje, aby nedošlo k strate chromozomálneho fragmentu a predchádza tak nebalansovanej zmene karyotypu, podobne ako sa pri procese

trisomy rescue vytvára sSMC a predchádza trizómii vo vyvíjajúcom sa embryu.

Neocentroméry vznikajú pri mitóze (mozaikové rozšírenie) i meióze, kedy sú prenášané na potomstvo. Mozaicizmus je úzko spätý s nestabilným karyotypom a môže byť teda pozorovaný i u markerov meiotického pôvodu. (neocentromerické kruhové sSMC sa nemusia dostať do každej bunčnej línie vzhľadom na ich prepletenie a prítomnosť dvoch centromér). Nesprávna segregácia chromozómov môže byť tiež vysvetlená zníženou aktivitou neocentroméry v porovnaní s pôvodnými centromérmi, i keď obecné sa predpokladá, že neocentroméra vytvára funkčný kinetochor, ktorý je dosť stabilný na to, aby došlo k rovnomernému rozdeleniu chromozómov. Mozaicizmus možno zaznamenať vo väčšine prípadov s neocentromérou (20).

Molekulárne sú centromerické oblasti rozpoznateľné podľa prítomnosti histónu CENP-A - špecifickej varianty histónu 3. Depozícia CENP-A histónov na práve syntetizovaných sesterských chromatídach je pritom priamo spojená s vytváraním nových centromér. Samotná α -satelitná sekvencia nestačí na vytvorenie centroméry, čo možno demonštrovať napr. na izodicentrických chromozómoch s dvoma takýmito oblasťami, ale len jednou plne funkčnou. Predpokladá sa, že i pri tvorbe neocentroméry je nevyhnutný epigenetický marker; dochádza k cis/trans rozšíreniu CENP-A histónu (21).

2.2.3.5. KOMPLEXNÉ MARKER CHROMOZÓMY

Komplexné marker chromozómy obsahujú početné štrukturálne prestavby materiálu pochádzajúceho z viac než jedného chromozómu (22). Veľkostne sa pritom vymykajú definícii podľa Liehra (6), a v takom prípade môžu byť prvotne charakterizovateľné G pruhovaním. Segmenty pochádzajúce z rovnakého chromozómu majú často diskontinuálny charakter, a straty konkrétnych intersticiálnych úsekov sú detegované len za pomoci metódy CGH (17). Naopak metóda FISH je potrebná pre určenie topológie hlavne komplexnejších markerov pozostávajúcich z viacerých chromozómov (23).

Najčastejšie majú komplexné sSMC pôvod v chromozómoch 22, 21/13 a 15 (10, 7). Napriek tomu, že zatiaľ neboli zaznamenané prípady komplexných sSMC u všetkých ľudských chromozómoch, predpokladá sa, že existujú aj jedinečné prípady komplexných sSMC u chromozómov 1, 2, 3, 6, 10, 11, 19 a 20. Zaujímavý je prípad CES chromozómu, ktorý obsahoval dve centroméry rôzneho chromozomálneho pôvodu - jednu 14/22 a jednu 13/21 (10). Frekvencia komplexných sSMC [ak nezahŕňame der(22)] medzi populáciou markerov je minimálne 1%, ale je možné, že mnohé komplexné sSMC nie sú diagnostikované, napr. v prípade, že pri vyšetrení nie je použitá metóda array-CGH. Podľa Trifonov *et al.* (10) až 50% komplexných sSMC vzniká *de novo*, 30% je získaných familiárne ako nebalansovaná translokácia a zvyšných 20% je zdedených priamo maternálne. V 19 prípadoch, ktoré zhrnuli zaznamenali až 13 abnormálnych fenotypov. Giardino *et al.* (23) zhrnuli 21 prenatalne vyšetrených komplexných chromozómových prestavieb, medzi ktorými boli detegované preferenčné miesta zlomov (BP), a to na chromozómoch 4, 6 a 14. Giardino *et al.* (23) navyše podrobne vyšetrili prípad *de novo* translokácie zahŕňajúcej chromozómy 4,10 a 20. Vytvárajúci sa plod vykazoval malformácie a anomálie v migrácii kortikálnych neurónov.

Tsuchiya *et al.* (17) popísali pacienta, ktorý bol mozaikou s rozdielnym počtom markerov (niektoré bunky obsahovali až 4 rôzne sSMC). Pacient vykazoval znaky holoprocencefálie a bilaterálny rozštep podnebia, ale ináč neboli pozorované vážnejšie malformácie, čo možno vysvetliť absenciou euchromatínu v sSMC. Stanovenie prognózy v prípadoch s mnohočetnými sSMC je obzvlášť zložité, pretože je potreba zväžiť obsah euchromatínu v markeroch, prítomnosť UPD, stupeň mozaicizmu a chromozomálny pôvod jednotlivých sSMC. Spoľahlivú koreláciu medzi fenotypom a genotypom znemožňujú aj líšiace sa kombinácie pozorovaných sSMC v jednotlivých bunkách. Daniel a Malafiej (19) navrhli, že kruhové sSMC majú pôvod v nekompletne rozložených haploidných jadrách. Pozostávajúce malé kruhové chromozómy potom preferenčne vstupujú do jadra zygoty. Vysoké zastúpenie mnohočetných sSMC obsahujúcich takmer vždy rozdielne centromerické

sekvencie (tj. jednotlivé sSMC sú rozdielneho chromozomálneho pôvodu) podporuje tento predpoklad.

2.3. FENOTYPOVO-GENOTYPOVÁ KORELÁCIA A STANOVENIE PROGNOZY

Určiť možný súvis medzi genotypovým pôvodom markeru a fenotypom, ktorému dáva vznik, je obzvlášť dôležité pri stanovení klinickej prognózy v prenatalnej, ale i postnatalnej diagnostike. Veľmi dôležitými faktormi sú pritom chromozómový pôvod markeru, jeho veľkosť, prítomnosť konkrétnych euchromatínových regiónov, vplyv uniparentálnej dizómie (UPD), či vystupovanie markeru v mozaike. V priemere sa riziko abnormálneho fenotypu pohybuje u markerov *de novo* okolo 13%. U derivovaných akrocentrických chromozómov 13, 14, 21 a 22 je toto riziko nižšie (len 7%), ale u nonakrocentrických chromozómov sa odhaduje na 28% (24). Výraznú výpovednú hodnotu má tiež marker familiárneho pôvodu, zdedený od jedného z rodičov. Na rozdiel od markerov *de novo* možno sledovať totiž fenotypový dopad sSMC u jedného z rodičov. Napriek tomu, že rodič, ktorý sSMC predal ďalej do potomstva, nevykazuje žiadny abnormálny fenotyp, nemožno s úplnou istotou tvrdiť, že fenotyp dieťaťa bude tiež asymptomatický. Na tento majú totiž vplyv aj mnohé vonkajšie faktory a konštitúcia génov na ostatných chromozómoch. Ide o veľmi komplexné génové interakcie, ktoré zatiaľ neboli preskúmané.

2.3.1. VPLYV PRÍTOMNOSTI EUCHROMATÍNU NA FENOTYP

Nález euchromatínového regiónu na sSMC znamená zvýšenú génovú dávku, ktorá môže, nie však nutne, výrazne ovplyvniť fenotyp. Prvotné hypotézy predpokladali existenciu tzv. všeobecného syndrómu proximálnej trizómie, tj. prítomnosť génu v trojitej dávke automaticky podmieňuje nešpecifický abnormálny fenotyp u nositeľa (8). Hlbšia charakteristika a výskum konkrétnych sSMC však preukázala diskrepanciu medzi jednotlivými sSMC v závislosti na ich chromozomálnom pôvode.

Centromerické oblasti sú v prípade ľudských chromozómov génovo chudobnejšie než subtelomerické oblasti, preto väčšina sSMC obsahuje málo alebo žiaden euchromatín (15). Navyše sa do týchto oblastí preferenčne inzertujú duplikované úseky s konkrétnymi génmi o zmnoženej dávke, ktoré sú charakteristické napr. pre sSMC odvodené od chromozómu 22 (Cat-Eye syndróm) . Pericentromerické oblasti sú „skládkou“ génov, ale zdá sa, že sú to tiež oblasti vzniku nových génov (25).

Starke *et al.* (8) previedli podrobnú analýzu 35 prípadov s sSMC (štúdia bola zameraná na malé atypické formy sSMC, takže tie ktoré nie sú spojené s konkrétnym syndrómom), medzi ktorými našli 18 prípadov s klinickými symptómami (mentálna a vývojová retardácia, dysmorfizmy). Po prevedení molekulárne cytogenetickej analýzy určili, že euchromatín obsiahnutý v skúmaných sSMC pochádza z chromozómov 1p, 1q, 2p, 7q, 9p a 12q. Ďalší autori podobne popísali prípady sSMC obsahujúcich euchromatín zo 6p (16), 5p a 6q (26), a 17p (27).

Spomedzi zvyšných 17 prípadov, ktoré boli asymptomatické, Starke *et al.* (8) identifikovali euchromatín zo 2q, 3p, 5q, 7p, 8p, 17p a 18p. Müller-Navia *et al.* (28) popísali asymptomatický prípad s trizómiou 3q (konkrétne šlo o cen-> q11).

Veľkosť euchromatínovej oblasti na sSMC zohráva tiež značnú rolu. Starke *et al.* (8) popísal prípad trizómie 17p11.2; nositeľ sSMC nevykazoval žiadnu fenotypovú abnormalitu okrem primárnej sterility spôsobenej astenospermiiou. Na druhej strane Stankiewicz *et al.* (27) popísal prípady trizómie 17p11.2-12, kde nositelia sSMC vykazovali psychomotorické oneskorenie, mentálnu retardáciu, rečovú zaostalosť, záchvaty, problémy s príjmom potravy a narušené prospievanie.

Chromozomálny pôvod sSMC	p ramienko	q ramienko	Chromozomálny pôvod sSMC	p ramienko	q ramienko
1	+	+	13	N/A	?
2	+	-	14	N/A	?
3	-	-	15	N/A	?
4	?	?	16	?	?
5	+	-	17	+/-	?
6	+	+	18	- a)	?
7	-	+	19	?	?
8	-	-	20	?	?
9	+	?	21	N/A	?
10	?	?	22	N/A	?
11	?	?	X	?	?
12	?	+	Y	?	?

Tabuľka 1: Prítomnosť abnormálneho fenotypu u sSMC nositeľov v závislosti na chromozómalnom pôvode euchromatínu na sSMC podľa Starke *et al.* (8)

(+ abnormálny fenotyp, - normálny fenotyp, +/- zaznamenané prípady s abnormálnym i normálnym fenotypom, ? nezaznamenané žiadne prípady, N/A nevzťahuje sa vzhľadom na absenciu euchromatínu)

a) jedinou pozorovateľnou abnormalitou bol operatívne odstránený ASD (8)

2.3.2. VPLYV MOZAÍK NA FENOTYP

Frekvencia mozaicizmu medzi nositeľmi sSMC jednotliví autori stanovujú na: 54% (16), 59% (9), 60% (8). Výrazne sa tiež líši zastúpenie mozaík v závislosti na chromozómalnom pôvode – 20% u sSMC 15, 35% medzi akrocentrickými chromozómami a 69% medzi neakrocentrickými chromozómami (9). Fakt, že iba 20% sSMC 15 sa objavuje v mozaikách naznačuje vznik pri meiotickom delení. Navyše sú všetky *de novo* formy sSMC 15 maternálneho pôvodu (29).

Prítomnosť sSMC v mozaikovej forme má obecné priaznivé dopad na výsledný fenotyp (8). V danej štúdií bol mozaicizmus pozorovaný len dvakrát medzi 14 prípadmi s abnormálnym fenotypom, naopak medzi 9 prípadmi bez klinických symptómov boli mozaiky prítomné až v 8 prípadoch. Celkovo je

veľmi náročné predvídať fenotyp na základe miery mozaicizmu. Zastúpenie buniek s sSMC sa môže líšiť medzi rôznymi tkanivami a samotné stanovenie mozaicizmu je nepresné, pretože nemožno vyšetriť všetky bunky.

Mozaicizmus sa spája s formáciou sSMC. Nestability, ktoré prebytočný chromozóm prináša, tiež môže podporovať vznik rôznych bunečných línií (subklonov). Starke *et al.* (8) popísali komplexnejšie mozaiky v niekoľkých prípadoch. Tetrazómie a hexazómie konkrétnych chromozómov v konečnom dôsledku zapríčiňovali problémy so srdcom.

2.3.3. VPLYV UNIPARENTÁLNEJ DIZÓMIE NA FENOTYP

Uniparentálna dizómia (UPD) je jav, kedy v karyotype jedinca nachádzame pár chromozómov zdedený od jedného rodiča. Môže ísť o dva rôzne homológy daného chromozómu (heterodizómiu) alebo o dve kópie vytvorené duplikáciou jedného chromozómu – izodizómiu, ktorá so sebou nesie riziko manifestácie autozomálne recesívnych porúch (30). Prítomnosť euchromatínu na sSMC často indikuje mentálnu retardáciu a abnormality rôzneho rázu, takže UPD má len sekundárny význam. Na druhej strane, u sSMC obsahujúcich len heterochromatín je diagnostika UPD kľúčová (31).

UPD bola zatiaľ pozorovaná v 30 zo 47 možných prípadov UPD v rámci ľudského karyotypu (32, 33), hlavne ale na chromozómoch 6,7,11,14,15, 16 a 20 (31). Genetické poradenstvo sa odporúča podstúpiť v prípade paternálnej UPD 14 (pozorovaný polyhydramnion, zvonovitý thorax a kardiomyopatie), maternálnej UPD 15 (Prader-Williho syndróm) a paternálnej UPD 15 (Angelmanov syndróm). Zvyšné UPD majú len mierny fenotyp (UPD 6 – prítomnosť tranzientneho neonatálneho diabetes mellitus, UPD 7 – spomalenie rastu, hemihypotrofia, atypické facies) alebo značne kolísajúci fenotyp, a možnosť poradenstva a prenatalného testovania by sa mala zvažovať individuálne (31). Molekulárne biologické vyšetrenie prítomnosti UPD sa prevádza vyšetrením 4 – 9 polymorfných markerov rozprestretých po celom

chromozóme (15.). Podľa American Society of Human Genetics sú potrebné na potvrdenie UPD minimálne dva informatívne markery (32).

Už James *et al.* (34) navrhli, že u jedincov s sSMC existuje zvýšená pravdepodobnosť UPD. Prevedli štúdium UPD v 22 rodinách a objavili jeden prípad s paternálnou izodizómiou 6. Starke *et al.* (8) previedli podrobnú molekulárnu analýzu v 12 prípadoch sSMC, u ktorých boli k dispozícii parentálne chromozómy na vyšetrenie. UPD pritom potvrdili až v 2 prípadoch (17%), čo naznačuje, že prípady s sSMC sú vhodnými kandidátmi pre hľadanie a výskum UPD.

Bartsch *et al.* (15) zaznamenali UPD 22 maternálneho pôvodu u fenotypicky normálneho pacienta s sSMC, čo potvrdilo tvrdenie, že tento konkrétny typ UPD nemá žiadne fenotypové následky. Pôvodne normálny paternálny chromozóm 22 bol v tomto prípade redukovaný na sSMC 22 mechanizmom „trisomy rescue.“ Obecné je ale vplyv UPD na fenotyp veľmi komplexný vzhľadom na tri hlavné faktory, ktoré zohrávajú rolu: efekt trizómie na placentu a samotné embryo, možnosť autozomálne recesívnych onemocnení a vplyv imprintovaných génov na niektorých chromozómoch (33). Ledbetter a Engel (33) zostavili imprintingovú mapu ľudského karyotypu popisujúcu imprintingový efekt konkrétnych UPD na fenotyp jedinca, ktorá by mala pomôcť v prenatálnej diagnostike UPD.

UPD je asociovaná so štruktúrnymi (Robertsonské translokácie) i numerickými aberáciami (33), a takto nestabilný karyotyp teda môže interferovať s intrauterinným vývojom embrya. Shaffer *et al.* (35) vyšetrili 18 potratených plodov v snahe zistiť, či má UPD dopad na letalitu embryí. Nenašli však jediný prípad UPD, a zdá sa teda, že UPD nepodmieňuje letalitu embryí, ako je tomu napr. u triploidii.

2.4. KLASIFIKÁCIA MARKER CHROMOZÓMOV

Pre lepšiu a jednoduchšiu charakterizáciu sSMC sú tieto prebytočné chromozómy klasifikované podľa rôznych autorov do jednotlivých podskupín.

Starke *et al.* (8) delí sSMC podľa prítomnosti NOR (regiónu organizátora jadierka), prítomnosti centroméry a chromozomálnych prestavieb na sSMC do 5 tried a ďalej podľa prítomnosti UPD a euchromatínu do 4 podtried. Do 1. triedy zaraďujeme chromozómy obsahujúce NOR [podľa Crolla *et al.* (16) až 80% sSMC], do 2. triedy zo zvyšných chromozómov zaraďujeme sSMC bez štrukturálnych prestavieb, do 3. triedy sSMC so štrukturálnymi prestavbami v rámci toho istého sSMC (izocentrické, dicentrické a kruhové chromozómy), do 4. triedy všetky sSMC s komplexnejšími prestavbami medzi viacerými chromozómami a do 5. triedy sSMC bez α -satelitnej sekvencie (väčšinou neocentromerické sSMC). Do podtriedy *a* zaraďujeme sSMC bez euchromatínu a bez UPD, do podtriedy *b* sSMC s UPD, do podtriedy *c* sSMC s euchromatínom, a do podtriedy *d* sSMC s euchromatínom a UPD.

Bartsch *et al.* (15) modifikoval rozdelenie podľa Plattnera *et al.* (36), v rámci ktorého sa sSMC delia podľa ich morfológie a prítomnosti euchromatínu do piatich tried. Do prvých dvoch tried zaraďujú malé bisatelitné sSMC obsahujúce β -satelity p ramienok akrocentrických chromozómov. Do triedy I patria malé bisatelitné sSMC (izochromozómy a dicentrické chromozómy bez euchromatínu), do triedy II veľké bisatelitné sSMC (izochromozómy a dicentrické chromozómy s euchromatínom - napr. kritický región CES alebo PWS/AS). Do triedy III patria malé kruhové chromozómy obsahujúce len heterochromatín centroméry, do triedy IV potom kruhové chromozómy s euchromatínom. Zvyšné sSMC nesúce euchromatín spadajú do triedy V.

2.5. ZÁCHYT MARKER CHROMOZÓMOV V POPULÁCI A ICH VÝSKYT VO VYBRANÝCH SKUPINÁCH

Marker chromozómy sú veľmi často objavené náhodou pri prenatálnom vyšetrení, ktoré je indikované buď po abnormálnom ultrazvukovom náleze alebo u pacientov trpiacich infertilitou. Liehr *et al.* (6) zhrnuli 41 cytogenetických štúdií prevádzaných prenatálne na náhodnom súbore (celkom 688 030 prípadov). Celkovo zaznamenali 514 prípadov s sSMC (0,075%), a žiadne rozdiely medzi jednotlivými etnickými skupinami. Výskyt sSMC vo

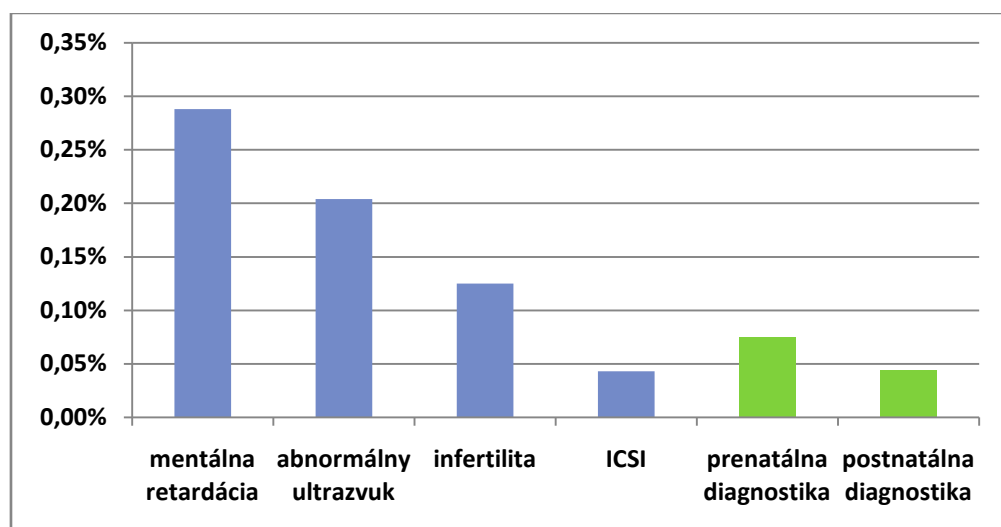
vzorkách získaných z odberu choriových klkov a z amniocentézy sa pritom nelíšil (pohyboval sa okolo 0,074%). Táto zhoda poukazuje na to, že v týždňoch, kedy sú tieto vyšetrenia prevádzané (9. - 15. týždeň), prítomnosť markeru v bunkách plodu nemá vplyv na výskyt spontánneho potratu.

Ďalej zhrnuli 8 štúdií, v ktorých bolo vyšetrenie indikované po abnormálnom ultrazvukovom náleze (celkom 4 409 prípadov), a zaznamenali 9 prípadov s sSMC (0,204%). Zhrnuli tiež 13 štúdií obsahujúcich prípady indikované k prevedeniu ICSI - medzi 4 625 prípadmi našli 2 prípady s sSMC (0,043%), 23 štúdií prevedených na mentálne retardovaných pacientov – medzi 69 332 prípadmi našli 200 sSMC prípadov (0,288%), a 42 štúdií prevedených u pacientov trpiacich infertilitou – medzi 30 510 prípadmi našli 38 sSMC (0,125%). Obzvlášť vysoký výskyt sSMC medzi mentálne retardovanými pacientmi a v prípadoch abnormálneho ultrazvukového vyšetrenia je spôsobený vysokým zastúpením typických sSMC - i(12p), i(18p), i(22), der(22), inv dup(15) v týchto dvoch skupinách. Spomínané chromozómy sú nachádzané u syndrómov Pallister-Killian a Cat-Eye, ďalej u syndrómu izochromozómu 18p a u syndrómu derivovaného chromozómu 22, ktoré sú spojené s malformáciami pozorovateľnými ultrazvukom.

Infertilní muži a ženy sú so zvýšenou pravdepodobnosťou nositeľmi chromozómovej abnormality (37). Podľa Liehr *et al.* (6) bol u pacientov trpiacich infertilitou výskyt sSMC asi trikrát vyšší než u novorodencov. Muži boli pritom nosičmi sSMC až 7,5krát častejšie než ženy. Mechanizmy, ktoré preferenčne spôsobujú infertilitu u mužského pohlavia, však neboli objasnené, aj keď Mau-Holzmann *et al.* (37) zistili, že až 7% mužov trpiacich oligozoospermiou je nosičmi sSMC. Výskyt sSMC medzi novorodencami narodenými po prevedení metódy ICSI je naopak porovnateľný s výskytom sSMC medzi novorodencami vo všeobecnosti (Graf 5). Liehr *et al.* (6) našli v súbore detí narodených po prevedení ICSI len 2 sSMC, čo mohlo byť spôsobené malou veľkosťou pozorovaného súboru. Karaman *et al.* (14) udáva, že medzi vyšetrovanými 20 sSMC prípadmi boli až 4 tehotenstvá indukované pomocou ICSI. V štúdií však chýba informácia o počte prešetrených ICSI

prípadoch, preto sa predpokladá minimálne riziko vzniku sSMC u tehotenstiev po ICSI.

Liehr *et al.* (6) zhrnuli tiež 10 štúdií prevedených na náhodnom súbore novorodencov. Medzi 121 694 prípadmi zaznamenali 54 sSMC (0,044%). Počet nositeľov sSMC v dnešnej svetovej populácii bol teda stanovený na asi 2,7 miliónov. Diskrepancia medzi výskytom sSMC v prenatalných (0,075%) a postnatalných štúdiách (0,044%) poukazuje na fakt, že prenatalná diagnostika sa vzťahuje na užší súbor jedincov. Blennow *et al.* (5) tento fenomén vysvetľuje na základe 3 faktorov: prenatalná diagnostika je primárne prevádzaná u starších žien (nad 35 rokov), v prípadoch suspektnej fetálnej abnormality a ťažko postihnuté plody sú potratené, takže sú následne eliminované z postnatalných štúdií. Tretí z menovaných efektov sa však uplatňuje len mierne; pomer *de novo* a familiárnych foriem je 2:1 v štúdiách prevádzaných v skorších i neskorších štádiách tehotenstva. V prípade, že by dochádzalo k potratom mimoriadne závažných fenotypov, tento pomer by v štúdiách prevádzaných neskôr v tehotenstve klesal v prospech familiárnych foriem sSMC (6). Výrazný efekt na nižší výskyt sSMC v postnatalných štúdiách má tiež vysoká miera potratov (30 – 50%) u prípadov, kde boli diagnostikované sSMC. Riziko abnormálneho fenotypu sa pri náleze sSMC v karyotype odhaduje na asi 13% (24, 38). Časť potencionálne zdravých plodov je teda potratená.



Graf 4: Frekvencia sSMC v závislosti na charaktere pozorovanej skupiny prípadov [Liehr et al. (6)]

3. ZÁKLADNÉ METÓDY VYUŽÍVANÉ V DIAGNOSTIKE MARKER CHROMOZÓMOV

Kompozíciu a pôvod marker chromozómov vo väčšine prípadov nie je možné určiť postupmi konvenčnej cytogenetiky. Preto je potrebné využiť metódy molekulárnej cytogenetiky, konkrétne metódu FISH. Je možné použiť celochromozómové sondy (resp. ich kombináciu pri M-FISH, alebo pri spektrálnej karyotypizácii) alebo sa zamerať na konkrétne lokusy použitím lokus špecifických alebo centromerických sond (ich kombinácia je podstatou centromerickej multifarebnej FISH). V prípade, že nemáme o štruktúre markeru jasnú predstavu je možné využiť mikrodisekciu a z takto izolovaného segmentu vytvoriť sondu (reverzná FISH, mikroFISH). Čoraz častejšie sa v takýchto prípadoch využívajú pre charakterizáciu markerov aj metódy komparatívnej hybridizácie, ktoré vychádzajú principiálne práve z metódy reverznej FISH (39).

3.1. KONVENČNÁ KARYOTYPIZÁCIA

Základná analýza ľudských chromozómov sa prevádza na kultivovaných bunkách (napr. lymfocytoch z periférnej krvi, kultivovaných amniocytoch, kultivovaných fibroblastoch z CVS atď.). Bunečné kultúry periférnych lymfocytov sú najprv stimulované k intenzívnemu deleniu fytohemaglutinínom (PHA), následne je bunečný cyklus zastavený v mitóze pomocou kolchicínu, a k bunkám je pridaný hypotonický roztok KCl. Bunky tak zväčšia svoj objem, ale neprasknú. Po prevedení fixácie za pomoci metanolu a kyseliny octovej je suspenzia buniek nakvapkávaná na podložné sklíčka (40). Pre vizualizáciu chromozómov je potrebné farbenie, napr. Giemsou.

Pre spoľahlivú karyotypizáciu sa štandardne požaduje G pruhovanie (pôsobenie trypsínu s následným ofarbením Giemsou) s rozlišiteľnosťou aspoň 550 pruhmi. V prípade podozrení na mozaikový výskyt aberácie sa vyšetruje 30 (niekedy aj 100) metafáz. Konvenčné postupy svetelnej mikroskopie umožňujú rozlíšiť len tie najmarkantnejšie chromozómové prestavby, napr. i(12p), i(18p), i(9p) (viď 9). Senzitivita rutinného karyotypu umožňuje detegovať len prestavby o minimálnej veľkosti zhruba 4 Mb (41). Napriek

tomu G pruhovanie nestráca na význame, keďže na rozdiel od CGH dokáže rozpoznať nízkofrekvenčné mozaiky (17).

3.2. FLUORESCENČNÁ *IN SITU* HYBRIDIZÁCIA

Princíp vyšetrenia fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) spočíva v hybridizácii medzi fluorescenčne označenou sondou a vyšetrovanou DNA (buď na metafázických chromozómoch alebo interfáznom jadre). Aby bolo možné aplikovať FISH vyšetrenie, je potrebné *a priori* odhadnúť možnú predstavu i jej lokalizáciu v rámci genómu, a podľa toho použiť konkrétnu sondu (41). Jednotlivé sondy sú značené, a môže ísť buď o lokus špecifické sondy hybridizujúce s konkrétnym úsekom genómu, centromerické sondy (využívané hlavne pre diagnostiku aneuploidí), alebo o tzv. maľovacie sondy, ktoré hybridizujú s dlhším úsekom genómu a farebne ho označia (42, 39). Všeobecne sondy obsahujú množstvo repetitívnych sekvencií (Alu, LINES, Kpn), a keďže je genóm človeka bohatý na takéto úseky, výsledkom hybridizácie by bolo pozadie o vysokej fluorescenčnej odpovedi a nepozorovateľný lokus záujmu. Problém je ľahko odstránený pridaním Cot-1DNA, ktorá takéto repetície vychytáva a vyraduje ich z následnej hybridizácie (43). Pri prevedení FISH sa používa len zúžený výber vygenerovaných sond, ktoré sú potom naamplifikované v PCR reakcii.

Metóda FISH sa štandardne aplikuje pri vyšetrení markerov. V prípade, že sSMC obsahuje satelitné sekvencie, možno použiť FISH zacielenú na najčastejšie sSMC – inv dup (15q) alebo inv dup (22q). V prípade negatívnych výsledkov je však nutné použiť ďalšie špecifické sondy a postup sa stáva neefektívny. Vyšetrenie sa zbytočne predlžuje a predražuje. Odporúča sa preto zvoliť alternatívne metódy (napr. CGH). Ďalšou nevýhodou FISH je, že nedokáže detegovať anafoidné sSMC.

Na druhej strane, na rozdiel od metód komparatívnej hybridizácie, metóda FISH dokáže určiť presnú štruktúru markerov, napr. prítomnosť inverzií, duplikácií či rozmiestnenie jednotlivých segmentov v rámci sSMC (17). FISH

umožňuje tiež vyšetrenie nekultivovaných buniek v interfáze (napr. vyšetrenie fibroblastov s izochromozómom 12p u syndrómu Pallister-Killian), a buniek v rámci tkaniva, čo v konečnom dôsledku dovoľuje stanoviť detailnú koreláciu medzi genotypom a fenotypom. Využitie metódy FISH je širokospektrálne – používa sa pri analýze karyotypu v biológii i medicíne, pri génovom mapovaní, v klinickej diagnostike a monitorovaní chorôb, pri štúdiu dozimetrie radiačného žiarenia, pri štúdiách replikácie DNA, rekombinácie, génovej transkripcie a organizácie chromatinu (44).

3.2.1. MULTIFAREBNÁ FLUORESCENČNÁ *IN SITU* HYBRIDIZÁCIA

Multifarebná fluorescenčná *in situ* hybridizácia (tzv. Multiplex FISH, M-FISH) je technika založená na aplikácii viacerých diferencne značených sond, ktoré v dôsledku umožňujú rozdielne ofarbiť všetky chromozómy karyotypu, resp. len ich časti. Existujú dve stratégie, ako dosiahnuť takúto diferenciáciu. Ide buď o kombinatorický prístup, kedy sú výsledné farby kombináciou niekoľkých základných fluorochrómov, alebo prístup miešania fluorochrómov v rôznych pomeroch. Neustále sa zvyšujúci počet dostupných fluorochrómov umožňuje diferencne farbiť nielen jednotlivé chromozómy (24 potrebných kombinácií), ale aj ich jednotlivé ramená (tzv. armFISH so 42 farebnými kombináciami). Multifarebnú FISH nemožno použiť pri bunkách v interfáze, pretože chromozómy sú dešpiralizované a emitované signály by boli disperzného charakteru (44).

3.2.2. SPEKTRÁLNA KARYOTYPIZÁCIA

Spektrálna karyotypizácia (SKY) je obdobou metódy M-FISH, u ktorej sa analýza metafázických chromozómov prevádza pomocou spektrálnej mikroskopie. Princípom je meranie emisných spektier jednotlivých lokus špecifických sond, ktoré sa viažu na testované chromozómy (47). Ide o multifarebnú techniku, kde jednotlivé próby hybridizujú s konkrétnym chromozómom a umožnia jeho následnú vizualizáciu v mikroskope.

Próby sú pripravované pomocou PCR za použitia degenerovaných oligonukleotidov ako primérov, a označené sú 1 až 4 fluorescenčnými farbami, ktoré dokážu v konečnom dôsledku spektrálne odlišiť všetky chromozómy. Po prevedení hybridizácie a imunodetekcie, je spektrálny obraz chromozómov zaznamenaný pomocou konvenčného fluorescenčného mikroskopu so špeciálnym filtrom. Výsledky sú spracované v podobe emisných spektier pozorovaných chromozómových štruktúr, ktoré jednoznačne charakterizujú chromozómy a ich deriváty v rámci karyotypu. Po porovnaní výsledkov s konvenčným G pruhovaním je možné určiť pozíciu a typ aberácie v karyotype. Všetky takto stanovené zmeny karyotypu by mali byť následne potvrdené využitím metódy FISH s lokus špecifickými próbmami (48).

Detekcia interchromozomálnych prestavieb pri použití metódy SKY je možná, ak sú prestavby minimálne 1 – 2 Mb dlhé (47). Fan *et al.* (49) rovnako potvrdili, že metódou je možné detegovať kryptické translokácie o veľkosti 1 – 3 Mb. Metóda SKY nedokáže spoľahlivo identifikovať menšie inzercie, resp. tieto nemusia byť vôbec zaznamenané. Veľmi zložitá je tiež identifikácia koamplifikovaných štruktúr pozostávajúcich z materiálu nehomológnych chromozómov (48).

Metóda sa uplatňuje hlavne v onkocytogenetike pri spracovávaní komplexných karyotypov pochádzajúcich z nádorových buniek (50), a často tiež v prenatalnej a postnatalnej diagnostike pri popise balansovaných i nebalansovaných translokácií, ale i pri identifikácii marker chromozómov (48).

3.2.3. CENTROMERICKÁ MULTIFAREBNÁ FLUORESCENČNÁ *IN SITU* HYBRIDIZÁCIA

Centromerická multifarebná fluorescenčná *in situ* hybridizácia (cenM-FISH) dokáže za použitia sond špecifických pre centroméry jednotlivých chromozómov diferencne ofarbiť všetky centromerické regióny karyotypu okrem vysoko konzervovaných centromér chromozómov 13 a 21. Je to preferovaný typ metódy FISH pri vyšetrovaní marker chromozómov, keďže

dokáže, na rozdiel od metódy M-FISH s celochromozómovými próbami, charakterizovať aj tie najmenšie markery so žiadnym alebo nízkym obsahom euchromatínu. Hybridizácia prób s cieľovými repetitívnymi sekvenciami centromér alebo so sub-centromerickými regiónmi (napr. chromozóm 1) umožňuje ofarbiť všetky štruktúry v jedinom kroku a spoľahlivo stanoviť pôvod markeru (45).

3.2.4. MULTIFAREBNÉ PRUHOVANIE

Nevýhodou maľovacích prób je, že len veľmi ťažko dokážu odhaliť intrachromozomálne prestavby. Delécie a duplikácie sú detekovateľné, len ak sú dostatočne veľké, pericentrické inverzie len v prípade pozičného posunu centroméry v rámci chromozómu, a paracentrické inverzie detekovateľné takmer vôbec nie sú. Bola preto vyvinutá technika multifarebného pruhovania (multicolor banding, mBAND), ktorej výsledkom je podobne ako u konvenčnej cytogenetiky pruhovaný chromozóm (46). Tieto pruhy vznikajú nahybridizovaním fluorescenčne označených sond do špecifických lokusov metafázických chromozómov. Pozícia a veľkosť pruhov charakterizuje jednotlivé chromozómy, a vzniká špecifický vzor. Technika umožňuje rozpoznať aj chromozomálne prestavby menších rozsahov.

3.2.5. REVERZNÁ FLUORESCENČNÁ *IN SITU* HYBRIDIZÁCIA

Reverzná fluorescenčná *in situ* hybridizácia (reverzná FISH) spočíva v purifikácii aberantného chromozómu (buď za pomoci „flow sortru“ alebo mikrodisekcie). Chromozóm je potom naamplifikovaný v PCR reakcii a jednotlivé próby, ktoré v reakcii vznikajú, sú fluorescenčne označené. Následne sú hybridizované na normálne metafázické chromozómy, a poskytujú informáciu o zložení aberantného chromozómu, či umiestnení bodov zlomu. Reverzná FISH je v princípe podstatou komparatívnej genómovej hybridizácie (44).

3.2.6. MIKRO-FLUORESCENČNÁ *IN SITU* HYBRIDIZÁCIA

Chromozómové abnormality sa veľmi často vyšetrujú pomocou tzv. mikrofluorescenčnej *in situ* hybridizácie (microFISH). Ide o kombináciu mikrodisekcie (MD) a metódy FISH (51, 52). Chromozómová mikrodisekcia je metóda, ktorá sa prevádza u chromozómových štruktúr nejasného pôvodu (napr. sSMC). Tieto abnormálne štruktúry karyotypu sú „narezané“ na jednotlivé fragmenty pomocou UV ožiarených borosilikátových sklenených ihl. Proces disekcie sa prevádza pod mikroskopom pomocou 3D mikromanipulátora. Izolované fragmenty sú potom v mikrokvapke vody prevedené do skúmavky, kde prebehne PCR amplifikácia. Namnožené fragmenty sú fluorescenčne označené (pomocou inkorporovaných biotín-16 dUTP) a môžu byť použité ako sondy pre FISH. Takto pripravené sondy budú v normálnom karyotype hybridizovať s konkrétnymi pruhmi, a následne je tak možné určiť pôvod vyšetrovanej štruktúry. Prevádza sa aj hybridizácia s pôvodnými abnormálnymi chromozómami, ktorá potvrdzuje pôvod disekčného materiálu (sondy hybridizujú s chromozómovou štruktúrou, z ktorej boli samy pripravené) a určuje úspešnosť samotnej disekcie (53).

3.3. KOMPARATÍVNA GENÓMOVÁ HYBRIDIZÁCIA

Komparatívna genómová hybridizácia (CGH) je molekulárne cytogenetická technika, ktorá umožňuje rýchlu detekciu a mapovanie zmien v počte kópií konkrétnych úsekov DNA medzi normálnym a abnormálnym genómom. Metóda umožňuje celogenómové vyšetrenie vzoriek, u ktorých si nie sme istí lokalizáciou aberácie. Metódu aplikujeme hlavne v onkocytogenetike (napr. zisťovanie prítomnosti amplifikovaných génov a ich mapovanie v rámci genómu), ale aj v klinickej cytogenetike pri presnejšom charakterizovaní nebalansovaných prestavieb.

Klasická (tiež chromozómová) CGH je modifikovaná hybridizácia *in situ*, kedy rozdielne označená testovaná a referenčná DNA hybridizujú s normálnymi metafázickými chromozómami, ktoré boli izolované konvenčnou metódou a po fixácii prenesené na podložné sklíčko (viď 3.1). Testovaná a referenčná DNA

sú extrahované napr. z lymfocytov pomocou fenol-chloroformu, a ich koncentrácie odhadnuté spektrofotometricky. Nasleduje značenie jednotlivých DNA metódou posunom zlomu (nick translation); testovaná DNA je označená zeleným fluoresceín izotiokyanátom (FITC), referenčná DNA červeným rodamínom. Pre správny priebeh hybridizácie sú požadované próby dlhé 500 – 3000 bp, ktorých veľkosť je overená elektroforeticky.

Denaturácia prób a metafázických chromozómov sa prevádza oddelene. Nasleduje kohybridizácia testovanej a referenčnej DNA s chromozómami po dobu 72 hodín pri teplote 37°C. Hybridizácia repetitívnych sekvencií sa blokuje pridaním Cot-1 DNA. Hybridizáciu medzi referenčnou a testovanou DNA možno zanedbať, pretože dané dvojjávitnice nie sú fixované na podložné sklo, a sú v ďalšom kroku odmyté. Chromozómy sú po ukončení hybridizácie zafarbené DAPI, aby ich bolo možné identifikovať a vytvoriť karyotyp. Pomocou fluorescenčného mikroskopu s tromi excitačnými filtrami (DAPI-FITC-rodamín) sa vyhládajú vhodné mitózy, ktoré nasnímame špeciálnou CCD-kamerou. Za pomoci počítačového programu hodnotíme intenzity zelenej a červenej fluorescencie v jednotlivých úsekoch chromozómov. U normálnych nálezov by sa pomer medzi intenzitou zeleného a červeného signálu mal pohybovať okolo 1. V prípade, že je pomer vyšší než 1,2 ide o možnú amplifikáciu úseku; v prípade, že je pomer nižší než 0,8 pôjde o deléciu úseku (40).

3.4. DNA ČIPY (ARRAY-CGH)

DNA čipy alebo tzv. matrix-CGH, tiež array-CGH, je obdobou komparatívnej genómovej hybridizácie, ktorá v posledných rokoch výrazne prispela k identifikácii molekulárnej podstaty množstva geneticky podmienených chorôb (54).

Na rozdiel od chromozómovej CGH sa ako cieľová DNA nepoužívajú metafázické chromozómy, ale fragmenty tejto DNA, ktoré sú pomocou mikrorobota a sklenenej kapiláry alebo kovového hrotu nanosené

a imobilizované na špeciálnom skle. Ako cieľová DNA sa používajú bakteriálne arteficiálne chromozómy (BAC), klony odvodené od bakteriofága P1 (PAC) o veľkosti 75–200 kb, fozmidy o veľkosti 40-50 kb alebo oligonukleotidy o dĺžke 25-85 nukleotidov. Použitie oligonukleotidových prôb pritom vo všeobecnosti umožňuje rozoznať menšie zmeny v rámci genómu než použitie BAC prôb a navyše znižuje šum pozadia.

Na podložné sklo s cieľovou DNA sa aplikuje vždy rovnaké množstvo testovanej a referenčnej (normálnej) DNA. Ako referenčná DNA sa používa buď DNA individuála, alebo DNA širšej vzorky jedincov z danej populácie. Je možné použiť buď reprezentatívnu DNA od rovnakého pohlavia, ale prevádzajú sa aj hybridizácie s reprezentatívnou DNA od opačného pohlavia. Testovaná DNA pacienta je značená pomocou zeleného fluorescenčného farbiva Cyanine 3 (Cy3), referenčná DNA pomocou červeného Cyanine 5 (Cy5). Potom, čo prebehne kohybridizácia, sa jednotlivé body naskenujú a intenzity fluorochrómov sa počítačovo spracujú (55). Pomer intenzít oboch fluorescenčných farbív (Cy3: Cy5) by mal byť rovný jednej. V prípade, že je pomer väčší, prevláda signál Cy3, a daná časť genómu (napr. konkrétny gén) je u testovanej DNA multiplikovaná. V opačnom prípade prevláda signál Cy5 a daná časť je deletovaná. Výsledky array-CGH by mali byť validované ďalšími cytogenetickými a molekulárnymi metódami (napr. FISH) (41).

Väčšina dostupných doštičiek pre array-CGH bola vytvorená so zámerom detekcie konkrétnych aneuploidií, mikrodélcií, mikroduplicácií, subtelomerických a ďalších nebalansovaných chromozómových prestavieb, ale existujú aj celogenómové doštičky s pokryvom 1 – 10 klonov na 1 Mb genómu. Väčšina využívaných cieľových DNA BAC typu je pritom viacnásobne validovaná použitím FISH techník a ich jedinečnosť je potvrdená znalosťou DNA sekvencie, takže pravdepodobnosť nešpecifickej hybridizácie s testovanou DNA je menej než 1% (56).

DNA čipy sa čoraz viac využívajú i pri diagnostike pôvodu komplexných sSMC. Za pomoci array-CGH môžeme (na rozdiel od multifarebných FISH metód) exaktne stanoviť zlomy a regióny, v ktorých k týmto prestavbám

dochádza (17). Medzi výhody metódy patrí jej robustnosť a možnosť automatizácie, jednoduchosť, reprodukovateľnosť a precíznosť. Metóda array-CGH je rýchlejšia než cytogenetické metódy, pretože nie je potrebné bunky kultivovať a aj množstvo požadovaného materiálu je minimálne (niekoľko mikrogramov DNA). Na druhej strane metóda nedokáže identifikovať balansované prestavby (translokácie a inverzie), a keďže porovnáva zmeny v počte kópií genómového segmentu vzhľadom na ďalšie segmenty toho istého segmentu, nedokáže rozoznať ani polyploidiu (41).

4. ZÁVER

Výskum v oblasti marker chromozómov sa orientuje primárne na fenotypovo-genotypovú koreláciu. Dochádza k podrobnej molekulárnej charakteristike jednotlivých prípadov, a všetky výsledky sú centralizované. Cieľom je čo najexaktnejšie predvídať fenotypový dopad u konkrétneho prípadu sSMC v prenatalnej diagnostike, a v konečnom dôsledku umožniť narodenie zdravého potomka. Výskum markerov môže taktiež objasniť mnohé choroby, ktoré sú podmienené génmi nachádzajúcimi sa v pericentromerickej oblasti.

Nie všetky markery však musia nutne podmieňovať abnormálny fenotyp. Na druhej strane, nositelia markerov obsahujú nadpočetný chromozóm, ktorý veľmi často interferuje so správnou segregáciou chromozómov pri bunčnom delení, a teda i pri tvorbe gamét. Množstvo nositeľov trpí neplodnosťou a musia podstúpiť metódy asistovanej reprodukcie. Identifikácia markeru nás teda odkazuje aj na ďalší postup a poskytnutie pomoci takýmto pacientom.

S markermi sa veľmi často spája aj fenomén uniparentálnej dizómie, a nositelia sú vhodnou vzorkou pre výskum aj v tejto oblasti. Okrem toho si množstvo markerov po strate centroméry vytvára vlastnú neocentroméru, čo predurčuje markery k výskumu vzniku centromér a následnej remodelácii chromozómu.

Pre stanovenie pôvodu marker chromozómu je najvhodnejšie použiť centromerickú multifarebnú FISH. U menších markerov väčšinou nie je prítomný euchromatín, u tých väčších sa jeho prítomnosť zisťuje za pomoci ďalších lokus špecifických sond alebo za pomoci metód komparatívnej hybridizácie. Komplexné markery sú najpresnejšie charakterizované za pomoci celochromozómových maľovacích sond (M-FISH, SKY).

5. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. Ilbery, P.L., Lee, C.W., Winn, S.M. (1961): Incomplete trisomy in a mongoloid child exhibiting minimal stigmata. *Med J Aust* 48(2):182-184.
2. Ellis, J.R., Marshall, R., Penrose, L.S. (1962): An aberrant small acrocentric chromosome. *Ann Hum Genet* 26:77-83.
3. Froland, A., Holst, G., Terslev, E. (1963): Multiple anomalies associated with an extra small autosome. *Cytogenetics* 2:99-106.
4. Hook, E.B., Cross, P.K. (1987): Extra structurally abnormal chromosomes (ESAC) detected at amniocentesis: frequency in approximately 75,000 prenatal cytogenetic diagnoses and associations with maternal and paternal age. *Am J Hum Genet* 40(2):83-101.
5. Blennow, E., Bui, T.H., Kristoffersson, U., Vujic, M., Anneren, G., Holmberg, E., Nordenskjold, M. (1994): Swedish survey on extra structurally abnormal chromosomes in 39 105 consecutive prenatal diagnoses: prevalence and characterization by fluorescence in situ hybridization. *Prenat Diagn* 14(11):1019-1028.
6. Liehr, T., Weise, A. (2007): Frequency of small supernumerary marker chromosomes in prenatal, newborn, developmentally retarded and infertility diagnostics. *Int J Mol Med* 19(5):719-731.
7. Liehr, T. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC). Institute of Human Genetics and Anthropology, University of Jena. [Online] 23. Február 2009. <http://www.med.uni-jena.de/fish/sSMC/00START.htm>.
8. Starke, H., Nietzel, A., Weise, A., Heller, A., Mrasek, K., Belitz, B., Kelbova, C., Volleth, M., Albrecht, B., Mitulla, B., Trappe, R., Bartels, I., Adolph, S., Dufke, A., Singer, S., Stumm, M., Wegner, R.D., Seidel, J., Schmidt, A., Kuechler, A., Schreyer, I., Claussen, U., Von Eggeling, F., Liehr, T. (2003): Small supernumerary marker chromosomes (SMCs): genotype-phenotype correlation and classification. *Hum Genet* 114(1):51-67.
9. Crolla, J.A., Youings, S.A., Ennis, S., Jacobs, P.A. (2005): Supernumerary marker chromosomes in man: parental origin, mosaicism and maternal age revisited. *Eur J Hum Genet* 13(2):154-160.
10. Trifonov, V., Fluri, S., Binkert, F., Nandini, A., Anderson, J., Rodriguez, L., Gross, M., Kosyakova, N., Mkrtychyan, H., Ewers, E., Reich, D., Weise, A., Liehr, T. (2008): Complex rearranged small supernumerary marker chromosomes (sSMC), three new cases; evidence for an underestimated entity? *Mol Cytogenet* 15;1(1):6.
11. Callen, D.F., Eyre, H., Fang, Y.Y., Guan, X.Y., Veleba, A., Martin, N.J., McGill, J., Haan, E.A. (1999): Origins of accessory small ring marker chromosomes derived from chromosome 1. *J Med Genet* 36(11):847-853.
12. Christian, S.L., Fantes, J.A., Mewborn, S.K., Huang, B., Ledbetter, D.H. (1999): Large genomic duplicons map to sites of instability in the Prader-Willi/Angelman syndrome chromosome region (15q11–q13). *Hum Mol Genet* 8: 1025– 1039.

13. Martinsson, T., Johannesson, T., Vujic, M. *et al* (1996): Maternal origin of inv dup(15) chromosomes in infantile autism. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 5: 185– 192.
14. Karaman, B., Aytan, M., Yilmaz, K., Toksoy, G., Onal, E.P., Ghanbari, A., Engur, A., Kayserili, H., Yuksel-Apak, M., Basaran, S. (2006): The identification of small supernumerary marker chromosomes; the experiences of 15,792 fetal karyotyping from Turkey. *Eur J Med Genet* 49(3):207-314.
15. Bartsch, O., Loitzsch, A., Kozlowski, P., Mazauric, M.L., Hickmann, G. (2005): Forty-two supernumerary marker chromosomes (SMCs) in 43 273 prenatal samples: chromosomal distribution, clinical findings, and UPD studies. *Eur J Hum Genet* 13(11):1192-1204.
16. Crolla, J.A. (1998): FISH and molecular studies of autosomal supernumerary marker chromosomes excluding those derived from chromosome 15: II. Review of the literature. *Am J Med Genet* 75(4):367-381.
17. Tsuchiya, K.D., Opheim, K.E., Hannibal, M.C., Hing, A.V., Glass, I.A., Raff, M.L., Norwood, T., Torchia, B.A. (2008): Unexpected structural complexity of supernumerary marker chromosomes characterized by microarray comparative genomic hybridization. *Mol Cytogenet* 1(1):7.
18. Stefanou, E.G., Crocker, M. (2004): A chromosome 21-derived minute marker in a mosaic trisomy 21 background: implications for risk assessments in marker chromosome cases. *Am J Med Genet* 127A(2):191-193.
19. Daniel, A., Malafiej, P. (2003): A Series of supernumerary small ring marker autosomes identified by FISH with chromosome probe arrays and literature review excluding chromosome 15. *Am J Med Genet* 117A(3):212-222.
20. Amor, D.J., Choo, K.H. (2002): Neocentromeres: role in human disease, evolution, and centromere study. *Am J Hum Genet* 71(4):695-714.
21. Smith, M.M. (2002): Centromeres and variant histones: what, where, when and why? *Curr Opin Cell Biol* 14(3):279-285.
22. Liehr, T., Claussen, U., Starke, H. (2004): Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenet Genome Res* 107(1-2):55-67.
23. Giardino, D., Corti, C., Ballarati, L., Finelli, P., Valtorta, C., Botta, G., Giudici, M., Grosso, E., Larizza, L. (2006): Prenatal diagnosis of a de novo complex chromosome rearrangement (CCR) mediated by six breakpoints, and a review of 20 prenatally ascertained CCRs. *Prenat Diagn* 26(6):565-570.
24. Warburton, D. (1991): De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet* 49(5):995-1013.
25. Bridgland, L., Footz, T.K., Kardel, M.D., Riaz, M.A., McDermid, H.E. (2003): Three duplicons form a novel chimeric transcription unit in the pericentromeric region of chromosome 22q11. *Hum Genet* 112(1):57-61.
26. Stankiewicz, P., Bocian, E., Jakubów-Durska, K., Obersztyn, E., Lato, E., Starke, H., Mroczek, K., Mazurczak, T. (2000): Identification of supernumerary marker

- chromosomes derived from chromosomes 5, 6, 19, and 20 using FISH. *J Med Genet* 37(2):114-120.
27. Stankiewicz, P., Parka, S.S., Holder, S.E., Waters, C.S., Palmer, R.W., Berend, S.A., Shaffer, L.G., Potocki, L., Lupski, J.R. (2001): Trisomy 17p10-p12 resulting from a supernumerary marker chromosome derived from chromosome 17: molecular analysis and delineation of the phenotype. *Clin Genet* 60(5):336-344.
 28. Müller-Navia, J., Nebel, A., Oehler, D., Theile, U., Zabel, B., Schleiermacher, E. (1996): Microdissection and DOP-PCR-based reverse chromosome painting as a fast and reliable strategy in the analysis of various structural chromosome abnormalities. *Prenat Diagn* 16(10):915-922.
 29. Roberts, S.E., Maggouta, F., Thomas, N.S., Jacobs, P.A., Crolla, J.A. (2003): Molecular and fluorescence in situ hybridization characterization of the breakpoints in 46 large supernumerary marker 15 chromosomes reveals an unexpected level of complexity. *Am J Hum Genet* 73(5):1061-1072.
 30. Engel, E. (1980): A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect: isodisomy. *Am J Med Genet* 6: 137–142.
 31. Kotzot, D. (2008): Prenatal testing for uniparental disomy: indications and clinical relevance. *Ultrasound Obstet Gynecol* 31(1):100-105.
 32. Shaffer, L.G., Agan, N., Goldberg, J.D., Ledbetter, D.H., Longshore, J.W., Cassidy, S.B. (2001): American college of medical genetics statement on diagnostic testing for uniparental disomy. *Genet Med* 3: 206–211.
 33. Ledbetter, D.H., Engel, E. (1995): Uniparental disomy in humans: development of an imprinting map and its implications for prenatal diagnosis. *Hum Mol Genet* 4:1757–1764.
 34. James, R.S., Temple, I.K., Dennis, N.R., Crolla, J.A. (1995): A search for uniparental disomy in carriers of supernumerary marker chromosomes. *Eur J Hum Genet* 3(1):21-26.
 35. Shaffer, L.G., McCaskill, C., Adkins, K., Hassold, T.J. (1998): Systematic search for uniparental disomy in early fetal losses: the results and a review of the literature. *Am J Med Genet* 79(5):366-372.
 36. Plattner, R., Heerema, N.A., Yurov, Y.B., Palmer, C.G. (1993): Efficient identification of marker chromosomes in 27 patients by stepwise hybridization with alpha-satellite DNA probes. *Hum Genet* 91: 131– 140.
 37. Mau-Holzmann, U.A. (2005): Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res* 111: 317-336.
 38. Shaffer, B.L., Caughey, A.B., Cotter, P.D., Norton, M.E. (2004): Variation in the Decision to Terminate Pregnancy in the Setting of an Abnormal Karyotype with Uncertain Significance. Abstractbook of the 54th annual meeting of the American Society of Human Genetics: 494.
 39. Douet-Guilbert, N., Basinko, A., Le Bris, M.J., Herry, A., Morel, F., De Braekeleer, M. (2008): Stratégies d'identification des marqueurs chromosomiques surnuméraires en cytogénétique constitutionnelle. *Pathol Biol (Paris)* 56(6):362-367.

40. Tachdjian, G., Aboura, A., Lapierre, J.M., Viguié, F. (2000): Cytogenetic analysis from DNA by comparative genomic hybridization. *Ann Genet* 43(3-4):147-154.
41. Shinawi, M., Cheung, S.W. (2008): The array CGH and its clinical applications. *Drug Discov Today* 13(17-18):760-770.
42. Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C., Fuscoe, J., Segraves, R., Lucas, J., Gray, J. (1988): Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(23):9138-9142.
43. Landegent, J.E., Jansen in de Wal, N., Dirks, R.W., Baa, F., van der Ploeg, M. (1987): Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive in situ hybridization. *Hum Genet* 77(4):366-370.
44. Langer, S., Kraus, J., Jentsch, I., Speicher, M.R. (2004): Multicolor chromosome painting in diagnostic and research applications. *Chromosome Res* 12(1):15-23.
45. Nietzel, A., Rocchi, M., Starke, H., Heller, A., Fiedler, W., Wlodarska, I., Loncarevic, I.F., Beensen, V., Claussen, U., Liehr, T. (2001): A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). *Hum Genet* 108(3):199-204.
46. Lengauer, C., Speicher, M.R., Popp, S., Jauch, A., Taniwaki, M., Nagaraja, R., Riethman, H.C., Donis-Keller, H., D'Urso, M., Schlessinger, D., et al. (1993): Chromosomal bar codes produced by multicolor fluorescence in situ hybridization with multiple YAC clones and whole chromosome painting probes. *Hum Mol Genet* 2(5):505-512.
47. Schröck, E., du Manoir, S., Veldman, T., Schoell, B., Wienberg, J., Ferguson-Smith, M.A., Ning, Y., Ledbetter, D.H., Bar-Am, I., Soenksen, D., Garini, Y., Ried, T. (1996): Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273(5274):494-497.
48. Schröck, E., Zscheschang, P., O'Brien, P., Helmrich, A., Hardt, T., Matthaei, A., Stout-Weider, K. (2006): Spectral karyotyping of human, mouse, rat and ape chromosomes--applications for genetic diagnostics and research. *Cytogenet Genome Res* 114(3-4):199-221.
49. Fan, Y.S., Zhang, Y., Speevak, M., Farrell, S., Jung, J.H., Siu, V.M. (2001): Detection of submicroscopic aberrations in patients with unexplained mental retardation by fluorescence in situ hybridization using multiple subtelomeric probes. *Genet Med* 3(6):416-421.
50. Tonon, G., Roschke, A., Stover, K., Shou, Y., Kuehl, W.M., Kirsch, I.R. (2000): Spectral karyotyping combined with locus-specific FISH simultaneously defines genes and chromosomes involved in chromosomal translocations. *Genes Chromosomes Cancer* 27(4):418-423.
51. Zhang, J., Meltzer, P., Jenkins, R., Guan, X.Y., Trent, J. (1993): Application of chromosome microdissection probes for elucidation of BCR-ABL fusion and variant Philadelphia chromosome translocations in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 81(12):3365-3371.

52. Meltzer, P.S., Guan, X.Y., Burgess, A., Trent, J.M. (1992): Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. *Nat Genet* 1(1):24-28.
53. Falzetti, D., Vermeesch, J.R., Matteucci, C., Ciolli, S., Martelli, M.F., Marynen, P., Mecucci, C. (2000): Microdissection and FISH investigations in acute myeloid leukemia: a step forward to full identification of complex karyotypic changes. *Cancer Genet Cytogenet* 118(1):28-34.
54. 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(4):399-407.
55. Cheung, S.W., Shaw, C.A., Yu, W., Li, J., Ou, Z., Patel, A., Yatsenko, S.A., Cooper, M.L., Furman, P., Stankiewicz, P., Lupski, J.R., Chinault, A.C., Beaudet, A.L. (2005): Development and validation of a CGH microarray for clinical cytogenetic diagnosis. *Genet Med* 7(6):422-432.
56. Veltman, J.A., de Vries, B.B. (2006): Diagnostic genome profiling: unbiased whole genome or targeted analysis? *J Mol Diagn* 8(5):534-539.

6. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

- ASD – atriálny septálny defekt
- BAC – bakteriálny arteficiálny chromozóm
- BP – breakpoint (bod zlomu)
- cen – centroméra
- CES – cat-eye syndróm, resp. dicentrický chromozóm 22
- CGH – comparative genomic hybridization (komparatívna genómová hybridizácia)
- CVS – chorionic villus sampling (odber choriových klkov)
- der(22) – derivovaný chromozóm 22
- dic(22) – dicentrický chromozóm 22
- FISH – fluorescenčná *in situ* hybridizácia
- i(18p) – izochromozóm 18p
- i(8p) – izochromozóm 8p
- i(9p) – izochromozóm 9p
- ICSI – intra cytoplasmic sperm injection (intracytoplazmatická injekcia spermie)
- idic – izodicentrický
- inv dup(15) – chromozóm 15 s invertovanou duplikáciou
- MD – microdissection (mikrodisekcia)
- M-FISH - multicolor FISH (multifarebná fluorescenčná *in situ* hybridizácia)
- min – minute (malý marker chromozóm)
- NOR – nukleolárny organizátor
- p – krátke ramienko chromozómu
- PAC – arteficiálny chromozóm bakteriofága P1
- PCR – polymerase chain reaction (polymerázová reťazová reakcia)
- PKS – Pallisterov-Killianov syndróm, resp. izochromozóm 12p
- q – dlhé ramienko chromozómu
- r – ring (kruhový)
- SKY – spectral karyotyping (spektrálna karyotypizácia)
- sSMC – small supernumerary marker chromosome (malý nadpočetný marker chromozóm)
- UPD – uniparentálna dizómia