



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Detekce submikroskopických aberací metodou array CGH

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Mgr. Pavla Horáková

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Nix, Ph.D.

České Budějovice 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Detekce submikroskopických aberací metodou array CHG jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské/diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské/diplomové práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské/diplomové práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2019

.....

podpis

Poděkování

Zde bych ráda poděkovala především Ing. Tomášu Nixovi, Ph. D. za vedení bakalářské práce, za cenné rady a připomínky, za čas věnovaný na konzultace a korektury práce. Také bych chtěla poděkovat zaměstnancům Laboratoře molekulární genetiky Oddělení lékařské genetiky Thomayerovy nemocnice, kde jsem mohla zpracovat praktickou část této práce. V neposlední řadě patří dík mé rodině za trpělivost a podporu po celou dobu mého studia.

Detekce submikroskopických aberací metodou array CGH

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá metodou array CGH (array Comparativ Genomic Hybridization – komparativní genomová hybridizace na čípech) a jejím využití v genetické diagnostice, a to jak prenatální tak i postnatální. Metoda slouží k určení aberantních míst, tedy chromozomových oblastí, ve kterých došlo ke změně počtu kopií sekvencí DNA. Lokalizace aberantních míst není předem známa, jedná se tedy o celogenomový screening. Metoda se používá při podezření na výskyt mikrolečného či mikroduplikačního syndromu. Také je ji možno použít v případech pacientů, u kterých se projevují patologické fenotypové změny, ale jiné metody změnu genetické výbavy neprokázaly.

Bakalářská práce se zaměřuje na stanovení diagnózy v prenatálním období a také na stanovení příčiny patologických projevů v postnatální diagnostice. Nejprve práce probírá postupy v klinické cytogenetice a poté se zabývá submikroskopickými změnami. Práce dále popisuje metodou array CGH, vysvětluje její princip, využití, vyhodnocení a interpretaci jejích výsledků. V poslední části práce statisticky vyhodnocuje data array CGH získaná na oddělení OLG Thomayerovy nemocnice v období 8/18 – 3/19.

Metoda array CGH může sloužit k doplnění rutinně prováděných cytogenetických vyšetření, umožňuje získat podrobnější informace o genetickém materiálu jedince, lze vyšetřit množství mikrolečných či mikroduplikačních syndromů. Na základě výsledků může být přesně stanovena diagnóza i prognóza pacientů.

Klíčová slova

Array CGH; cytogenetické vyšetření; karyotyp; submikroskopické aberace; mikroleční syndromy; postnatální vyšetření, prenatální vyšetření

Detection of submicroscopic aberrations using array CGH

Abstract

This thesis addresses array CGH method (Comparative Genomic Hybridization on microarrays) and its use in prenatal and postnatal genetic diagnosis. The method used was to determine the chromosomal areas in which the number of copies of DNA sequences had changed. Localizations of the aberrations sites are not known in advance; the issue is that of all genomic screening. The method is used in suspected cases of microdeletion and microduplication syndromes. It may also be used in cases of patients with pathological phenotypic changes, but other methods have shown no change in genetic makeup.

This thesis focuses on diagnosis in the prenatal period and investigates the causes of pathological symptoms in the postnatal diagnosis. Firstly, this thesis describes procedures in clinical cytogenetics and then it discusses submicroscopic changes. Secondly, the thesis looks into the array CGH method, explains its procedure and use, and evaluates and interprets its results. Finally, the work statistically evaluates the array CGH data procured in the OLG department in Thomayrova hospital from 8/ 8 to 3/19.

The array CGH method may be used to supplement routinely administered cytogenetic tests. It enables specialists to obtain more detailed information about the genetic material of an individual and examine the frequency of microdeletion and microduplication syndromes. The diagnosis and prognosis of patients may be determined based on the results.

Key words

Array CGH; cytogenetic examination, karyotype, submicroscopic aberrations, microdeletion

Obsah

1. Úvod	8
2. Literární přehled	9
2.1 Klinická cytogenetika	9
2.1.1 Indikace pro cytogenetická vyšetření	9
2.1.2 Materiál pro cytogenetická vyšetření a jeho kultivace	10
2.1.3 Příprava chromozómových preparátů	11
2.1.4 Barvení chromozómů – pruhování	12
2.1.5 Karyotyp	12
2.1.6 Standardizace v lidské cytogenetice	13
2.1.7 Výhody a nevýhody klasické cytogenetiky	14
2.2 Submikroskopické aberace	14
2.2.1 Mikrodeleční a mikroduplikační syndromy	15
2.2.2 Mentální retardace	16
2.2.3 Subtelometrické aberace u mentálních retardací	16
3. Cíle práce	17
4. Metodika	18
4.1 Metoda array CGH, CNV (copy number variation)	18
4.1.1 Princip array CGH	18
4.1.2 Interpretace dat	20
4.1.3 Interpretace CNV	20
4.1.4 ISCN	22
4.1.5 ISCA Consortium	22
4.2 Izolace DNA	23
4.2.1 Příprava na izolaci DNA z periferní krve	23
4.2.2 Příprava na izolaci DNA z plodové vody	24
4.2.3 Příprava na izolaci DNA z tkání	24
4.2.4 Postup izolace DNA	25
4.3 Příprava na metodu array CGH	25
4.4 Metodický postup arrayCGH	26
4.4.1 Příprava vzorků	27
4.4.2 Fluorescenční značení vzorků	28
4.4.3 Purifikace značené DNA	29
4.4.4 Stanovení stupně značení	30
4.4.5 Kombinování DNA pacientů a kontrolních DNA	30
4.4.6 Hybridizace	31

4.4.7	Promytí skla s microarray	33
4.4.8	Skenování	34
5.	Výsledky.....	37
5.1	Hodnocení nálezů	37
5.1.1	Hodnocení kvality analýzy	37
5.1.2	Hodnocení aberací	37
5.1.3	Vizualizace hodnocených nálezů	38
5.2	Interpretace výsledků	39
5.3	Výsledky zpracovaných čipů.....	39
5.4	Statistické vyhodnocení dat array CGH.....	42
6.	Diskuse.....	44
7.	Závěr.....	46
8.	Seznam literatury	47
9.	Seznam příloh	51
10.	Seznam použitých zkratk	58

1. Úvod

Cytogenetické vyšetření slouží především ke stanovení karyotypu nemocných s vrozenými vývojovými vadami, v prenatalní diagnostice k určení chromozómové výbavy plodu, ke zpřesnění diagnózy a určení prognózy některých nádorových onemocnění.

Metody klasické cytogenetiky stanovují především numerické a strukturní odchylky chromozómů. Jejich rozlišitelnost má ovšem své meze. Oproti tomu metoda array CGH umožňuje detekci nebalancovaných změn s velkou rozlišovací schopností. Toho je využíváno v klinické cytogenetické diagnostice k zachycení submikroskopických delecí a multiplikací, jejichž přesná lokalizace v genomu není předem známa. Nezanedbatelnou výhodou metody je i možnost provádění analýzy bez kultivace buněk.

Díky rutinnímu použití této metody na řadě pracovišť stále stoupá počet zachycených mikrodelečních a mikroduplikačních syndromů. Přesné stanovení diagnózy u pacientů, u kterých nebyl klasickými cytogenetickými ani molekulárně-genetickými metodami stanoven syndrom, je pro jejich budoucí prognózu často kausální.

2. Literární přehled

2.1 *Klinická cytogenetika*

Cytogenetika člověka je poměrně mladá a velmi úzce specializovaná vědecká disciplína. Přesný počet lidských chromozómů je znám teprve od roku 1956.

Zájmem oboru klinická cytogenetika je detekce odchylek chromozómů – tzn. aberací chromozómů. Aberací rozumíme změnu normálního počtu chromozómů nebo změnu jejich struktury. Součástí klinické cytogenetiky jsou prenatalní vyšetření (diagnostika chromozomálních aberací před narozením jedince, z materiálu nenarozeného plodu), postnatalní vyšetření (již narozeného jedince). V reprodukční medicíně jsou prováděna preimplantační vyšetření genetické výbavy embrya (Kočárek et al., 2010).

Hlavním bodem zájmu klinické cytogenetiky jsou ty chromozómové aberace, které jsou zodpovědné za konkrétní chorobné stavy. Dále cytogenetická vyšetření využívá i onkologie, neboť některé nálezy hrají významnou roli při vzniku určitých typů nádorů (Michalová, 1999).

Pomocí cytogenetického vyšetření je možné zjistit karyotyp pacienta a určit možné chromozomální aberace. U některých lze určit klinický význam, u některých je potřeba použít metodu s vyšší rozlišovací schopností a tedy i s vyšší výpovědní hodnotou (Kočárek et al., 2010).

2.1.1 *Indikace pro cytogenetická vyšetření*

Cytogenetická vyšetření se často provádějí v rámci prenatalní diagnostiky. Zde je jednou ze zásadních indikací pokročilý věk matky, jelikož pravděpodobnost chromozomálních aberací výrazně s vyšším věkem matky stoupá. Dalšími důvody pro cytogenetická vyšetření jsou pozitivní výsledky screeningu plodu – ultrazvukového a biochemického. Biochemický screening se provádí ze vzorku krve matky, stanovují se hladiny

specifických biochemických markerů (Hájek et al., 2000). Významný je také ultrazvukový screening plodu. Již v prvním trimestru lze odhalit množství vrozených vývojových vad. V 11. – 13. týdnu se vyšetřuje šíjové projasnění (NT – nuchální translucence). Měří se při něm nahromadění tekutiny v záhlaví plodu. Hodnoty šíjového projasnění jsou ovlivněny patologiemi plodu, např. výskytem Downova syndromu (Caldá, 2007). Pro invazivní prenatalní vyšetření jsou jednoznačné indikace: nález chromozomální aberace u jednoho z rodičů (např. chromozomální mozaicismus, přenašečství balancované aberace), vystavení rodičů mutagenním vlivům z vnějšího prostředí, opakované spontánní aborty, postižení potomstva z předcházejících gravidit chromozomovou aberací (Hájek, 2000).

V rámci postnatální diagnostiky jsou cytogenetická vyšetření indikována u pacientů, u kterých se projevují patologické fenotypové znaky – např. psychomotorická či mentální retardace a také u osob, které mají poruchu reprodukce. Pokud v těchto případech dojde k záchytu patologie, jedná se nejčastěji o vrozené aberace chromozómů (Kočárek et al., 2010).

Získané chromozomální aberace jsou prokazovány při onkocytogenetickém vyšetření a také u pacientů, kteří byli vystaveni významné expozici mutagenními látkami (Kočárek et al., 2010).

2.1.2 Materiál pro cytogenetická vyšetření a jeho kultivace

Pro cytogenetická vyšetření jsou používány různé typy kultivací buněk *in vitro*. Materiál se liší v závislosti na tom, zda se jedná o prenatalní nebo postnatální vyšetření.

V postnatální diagnostice je využívána periferní krev, kostní dřeň a vzorky různých tkání získané biopsií. V běžné klinické praxi je nejčastější vyšetření lymfocytů periferní krve. Odebírá se nesrážlivá krev do zkumavky s heparinem (lithným nebo sodným). Krev je kultivována v termostatu za přítomnosti kultivačního média. Jeho podstatnou složkou je rostlinný lektin fytohemaglutinin (PHA). Tento výtažek z fazolí stimuluje dělení T-lymfocytů (Michalová, 1999). Dále lze do roztoku přidat látky, které zesynchronizují dělení lymfocytů (např. roztok Synchronet) a látky, které zvýrazní pruhování

chromozomů (např. roztok CRA – Chromosome Resolution Additive). Na závěr kultivace se používá kolcemid, což je syntetický derivát kolchicinu. Je používán jako tzv. mitotický jed, který zastaví rozchod chromozómů v metafázi mitózy. Podstata jeho účinku spočívá v tom, že rozrušuje dělicí vřeténko. Ve vyšších koncentracích přispívá ke kondenzaci chromatinu a tím k větší spiralizaci chromozómů (Kočárek et al., 2010).

Pro prenatalní diagnostiku je využívána tkáň choriových klků a plodová voda. Lze použít i fetální krev. Typy těchto materiálů se odebírají v závislosti na stadiu gravidity. Choriové klky jsou odebírány mezi 10. – 12. týdnem, plodová voda mezi 12. – 20. týdnem. Odběr všech typů těchto materiálů je invazivní a je nutno ho provádět pod ultrazvukovou kontrolou, aby nedošlo k poškození plodu (Kočárek et al., 2010). Kultivace buněk choriových klků a plodové vody je delší než kultivace buněk periferní krve. Je zakládáno více tkáňových kultur, jsou kultivovány v různých termostatech a dále s nimi lze pracovat zvláště. Průběh kultivace (růst buněk) je kontrolován reverzním mikroskopem. Kultivace je také ukončena aplikací kolcemidu (Michalová, 1999).

Pro cytogenetickou analýzu je dále možno použít tkáň z potraceného embrya či plodu. Je kultivována stejným způsobem jako tkáň choriových klků.

2.1.3 Příprava chromozómových preparátů

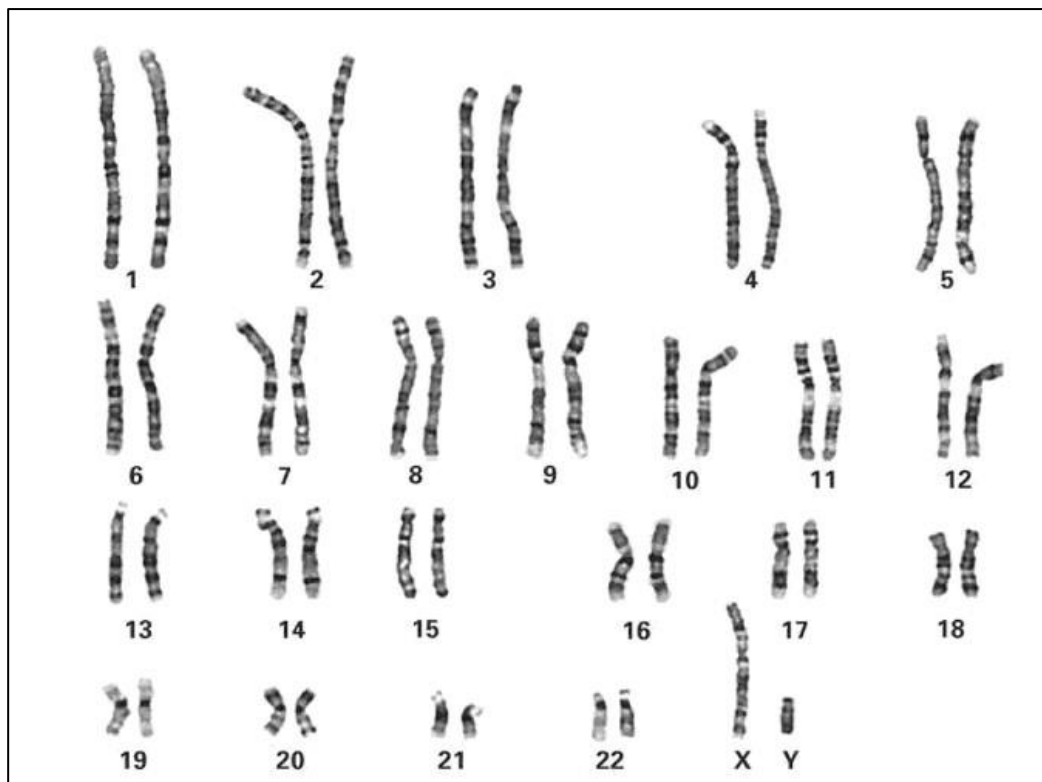
Cytogenetické chromozómové preparáty připravujeme z fixovaných buněčných suspenzí kapáním na namražená nebo mokrá podložní skla. Při použití takto upravených sklíček dojde k lepšímu rozložení buněk v preparátu. Fixované buňky pak na určitou dobu umístíme do hypotonického roztoku 0,075M KCl. Hypotonizace se provádí proto, aby došlo ke zvětšení buněk tím, že voda projde přes cytoplazmatickou membránu. Poté provedeme opakovanou fixaci směsí methanolu a kyseliny mravenčí v poměru 3:1. Cílem je získat preparát s množstvím mitóz v optimální hustotě vhodné pro barvení a odečítání (Michalová, 1999).

2.1.4 Barvení chromozómů – pruhování

Barvení chromozómů slouží k jejich vizualizaci a individuálnímu rozpoznání. Nejčastějšími způsoby barvení jsou různé pruhovací techniky, kterými vznikají proužky na metafázních chromozómech. Pruhování je viditelné až po jejich určité kondenzaci. Typický vzor proužků je v přímé souvislosti se stupněm kondenzace chromatinu. Proužek je definován jako část chromozómu, který lze zřetelně odlišit od dalšího úseku chromozómu (Shaffer et al., 2013). Nejběžnější barvicí technikou je G-pruhování. Dochází při něm k částečné degradaci proteinů trypsinem. Takto připravené preparáty poté barvíme Giemsovým roztokem (popř. roztokem eosin-methylenové modři podle Wrighta). Podle vzniklého pruhování je možné jednotlivé chromozómy identifikovat (Clark et Wall, 1996).

2.1.5 Karyotyp

Při mikroskopickém pozorování se chromozómy spočítají a vyfotografují nebo v současné době častěji zpracují počítačovou technikou. Chromozómy jsou tedy vyhodnoceny numericky a poté strukturně. Je kladen důraz na rozložení světlých a tmavých pruhů, jejich velikost a intenzitu barvení. Následně je sestaven karyotyp konkrétní buňky. Počet zkoumaných buněk (mitóz) je závislý na typu vyšetření (Michalová, 1999). Výsledný karyotyp je sestaven tak, že autozómy jsou očíslovány 1 až 22 sestupně podle jejich velikosti. Výjimkou je autozóm 21, který je menší než autozóm 22. Pohlavní chromozómy, gonozómy, jsou označeny písmeny X a Y. X označuje ženský a Y mužský pohlavní chromozóm (Shaffer et al., 2013).



Obrázek 1: Lidský karyotyp, muž, G-pruhování (Zdroj: Shaffer et al., 2013)

2.1.6 Standardizace v lidské cytogenetice

K usnadnění popisu cytogenetických nálezů byl vypracován standardizovaný systém nomenklatury ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature – Mezinárodní systém lidské cytogenetické nomenklatury). Tato nomenklatura má mezinárodní charakter i platnost (Michalová, 1999). ISCN je výsledek jednání několika genetických kongresů. První vydání bylo na konferenci v Denveru roku 1960. Od té doby se neustále vyvíjí. Obsahuje závazné popisy chromozómových patologií vrozených i získaných (popisovaných hlavně u maligních nádorů). Usnadňuje spolupráci a komunikaci mezi cytogenetiky. Díky ní panuje shoda při popisu a interpretaci karyotypů. V novějších vydáních jsou nové definice, příklady a oddíly. Je zde například uvedena nomenklatura pro metodu microarray (Simons et al., 2013).

2.1.7 Výhody a nevýhody klasické cytogenetiky

Klasické cytogenetické vyšetření chromozómů se používá jako prvotní určení možných chromozomových aberací. Je to stále nepoužívanější vyšetření v rutinní diagnostice. Umožňuje pohled na karyotyp pacienta, ze kterého lze odhalit nebalancované i balancované změny na úrovni chromozómů. To je nesporná výhoda metod klasické cytogenetiky. V neposlední řadě je potřeba zmínit i ekonomické důvody, pro které se tyto metody stále používají. Ale použití konvenčních pruhovacích metod má své limity a některé přestavby nelze tímto způsobem identifikovat (Kočárek, 2010). Limitující faktor rozpoznání aberací je jejich velikost. Obecně platí, že spolehlivě lze identifikovat pouze ty odchylky, jejichž velikost je větší než 5MB. Detekce submikroskopických aberací je tedy prakticky nemožná. Nevýhodou karyotypování je i nutnost kultivace buněk, zvláště u prenatálních vzorků (Hurd, 2010).

2.2 Submikroskopické aberace

Submikroskopické aberace jsou aberace relativně malého rozsahu, které označujeme také jako kryptické (skryté) přestavby. Řadíme sem mikrodelece a mikroduplikace. Klinický význam mají hlavně ty, které způsobují mikrodeleční a mikroduplikační syndromy. Jedná se o abnormality, které zpravidla nelze (nebo jen velmi výjimečně) zachytit metodami klasické cytogenetiky (Otová, 2008). Po roce 2000 bylo díky většímu využití molekulárně-cytogenetických metod zachyceno a popsáno množství mikrodelečních a mikroduplikačních syndromů (Weise et al., 2012).

Mikrodeleční a mikroduplikační syndromy jsou způsobeny zejména následkem nereciprokého crossing-overu, ke kterému dochází během meiotického dělení. U většiny pacientů vzniká aberace *de novo* a její výskyt ve více generacích je velmi vzácný. Pro tyto syndromy je zpravidla charakteristická autozomálně dominantní dědičnost, neúplná penetrace a variabilní expresivita. O neúplné penetraci hovoříme, když ne všichni jedinci v populaci nesoucí stejnou alelu, ji manifestují ve fenotypu. Variabilní expresivita je stav, kdy se stejný genotyp u více jedinců liší hloubkou projevu nebo přítomností dalšího znaku. Neúplná penetrace a rozdílná expresivita jsou vysvětlovány různými rozsahy

aberantních úseků, mozaicismem, vlivem pohlaví nositele nebo přítomností druhé mutace (Kočárek et al., 2010). Mikrodeleční a mikroduplikační syndromy bývají označovány jako „syndromy genů na sebe naléhajících“ (contiguous genes syndromes), jelikož se jedná o větší počet genů, které jsou lokalizovány v daném segmentu těsně vedle sebe v rámci jednoho chromozomu. Každý tento postižený gen ovlivňuje fenotypovou expresi nezávisle na ostatních genech. Tyto geny mohou mít značně odlišné funkce a výsledkem může být tedy velké spektrum symptomů (Weise et al., 2012).

2.2.1 Mikrodeleční a mikroduplikační syndromy

Existuje množství mikrodelečních a mikroduplikačních syndromů, které se často označují podle cytogenetické oblasti, ve které se daná aberace vyskytuje. Mezi nejznámější patří Di-Georgeův syndrom, což je mikrodelece 22q11.1, která je nejčastějším mikrodelečním syndromem u člověka. Jeho klinické projevy jsou značně variabilní, pohybují se od rozštěpů patra až po závažné srdeční a imunitní poruchy (Bahamat et al., 2014). Další častou mikrodelecí jsou syndromy Prader-Williho a Angelmanův, u kterých se vyskytuje delece na stejném úseku 15q11-q13. Pro Angelmanův syndrom jsou typické časté záchvaty, které doprovází ataktické pohyby končetin a strnulá chůze. Běžné je také závažné vývojové opoždění a mentální retardace. U Prader-Williho syndromu se po narození vyskytuje těžká hypotonie, špatná schopnost sání a polykání. Stejně jako u Angelmana i zde je charakteristická porucha psychomotorického vývoje a mentální retardace. Později nastupuje obezita a diabetes (Kočárek et al., 2010). Dalším známým mikrodelečním syndromem je Williams-Beurenův syndrom, způsobený delecí v oblasti 7q11.23. Charakteristické jsou typické rysy obličeje, mentální retardace a vrozené srdeční vady. Cévní stenózy u těchto pacientů tvoří závažné komplikace, jelikož zvyšují dispozici k infarktům (Huarte, 2013).

2.2.2 *Mentální retardace*

Mentální retardace je postižení, které je doprovázeno omezením intelektuálních funkcí a také omezením v adaptivním chování. Jedná se o jeden z hlavních důvodů k vyšetření klinickým pediatrem a neurologem. Pacient bývá indikován ke genetickému vyšetření (Tarpey et al., 2009). Za mentální retardaci považujeme stav, kdy u pacienta pozorujeme 3 významná kritéria. Jedním z nich je podprůměrná funkce obecného intelektuálního fungování. Tento jev se musí vyskytovat alespoň ve dvou oblastech dovedností (např. v komunikaci, osobní péči, akademické dovednosti nebo v sociální dovednosti). Třetím kritériem je nástup těchto projevů před 18. rokem života pacienta (Friedman et al., 2006). Měření intelektuálních funkcí probíhá prostřednictvím inteligenčního kvocientu (IQ). Hodnoty IQ pod 70 ukazují na mentální retardaci. Na základě IQ dělíme MR na lehkou (IQ 50 - 70), středně těžkou (IQ 35 - 50) těžkou (20 - 35) a hlubokou (IQ < 20) (Raymond, 2005). Prevalence výskytu MR v populaci je 1 - 3% (Haris, 2006). Poměr pohlaví u výskytu MR není vyrovnaný, o 40 - 90% převládají chlapci nad dívkami (Maulik et al., 2011). Příčiny vzniku mentálních retardací mohou být genetické, environmentální nebo mohou být výsledkem multifaktoriální dědičnosti, tzn. společného působení obou faktorů (Rauch et al., 2006).

2.2.3 *Subtelometrické aberace u mentálních retardací*

Mentální retardace může vzniknout genetickými abnormalitami. Značnou část tvoří aneuploidie, ale také velké delece a duplikace, které mají vliv na větší počet genů. Mezi další příčiny patří mutace jednotlivých genů a nelze vyloučit ani faktory vnějšího prostředí (Tarpey et al., 2009). Až u 60 % případů však není příčina identifikována a jedná se tedy o idiopatické mentální retardace. Zdá se, že za některé z nich jsou zodpovědné kryptické aberace (nejčastěji delece) v subtelomerických oblastech. V těchto regionech se totiž vyskytují oblasti bohaté na geny. Aberace v této lokalitě nacházíme u dětí s mírnou až středně těžkou mentální retardací s četností 7-10 % (Dawson et al., 2002).

3. Cíle práce

1. Zabývat se metodou array CGH, vysvětlit její princip, využití, metodiku a interpretaci získaných dat
2. Laboratorní práce – metodou array CGH zpracovat a vyhodnotit 2 čipy – 16 vzorků
3. Hodnocení a klasifikace nalezených CNV (změny v počtu kopií DNA)
4. Statistické vyhodnocení dat array CGH získaných na oddělení OLG Thomayerovy nemocnice za období 10/18-3/19

4. Metodika

Vzorky byly zpracovány v Laboratoři molekulární genetiky Oddělení lékařské genetiky Thomayerovy nemocnice.

4.1 *Metoda array CGH, CNV (copy number variation)*

Metoda array CGH je molekulárně genetická metoda. V prenatalní i postnatalní diagnostice slouží k zachycení drobných aberací, které klasické cytogenetické pruhovací techniky nejsou schopné detekovat. Při postnatalních vyšetření se stala metodou první volby u pacientů s mentální retardací, psychomotorickou retardací, autistickými projevy nebo s mnohočetnými vrozenými patologiemi (Kearney et al., 2011).

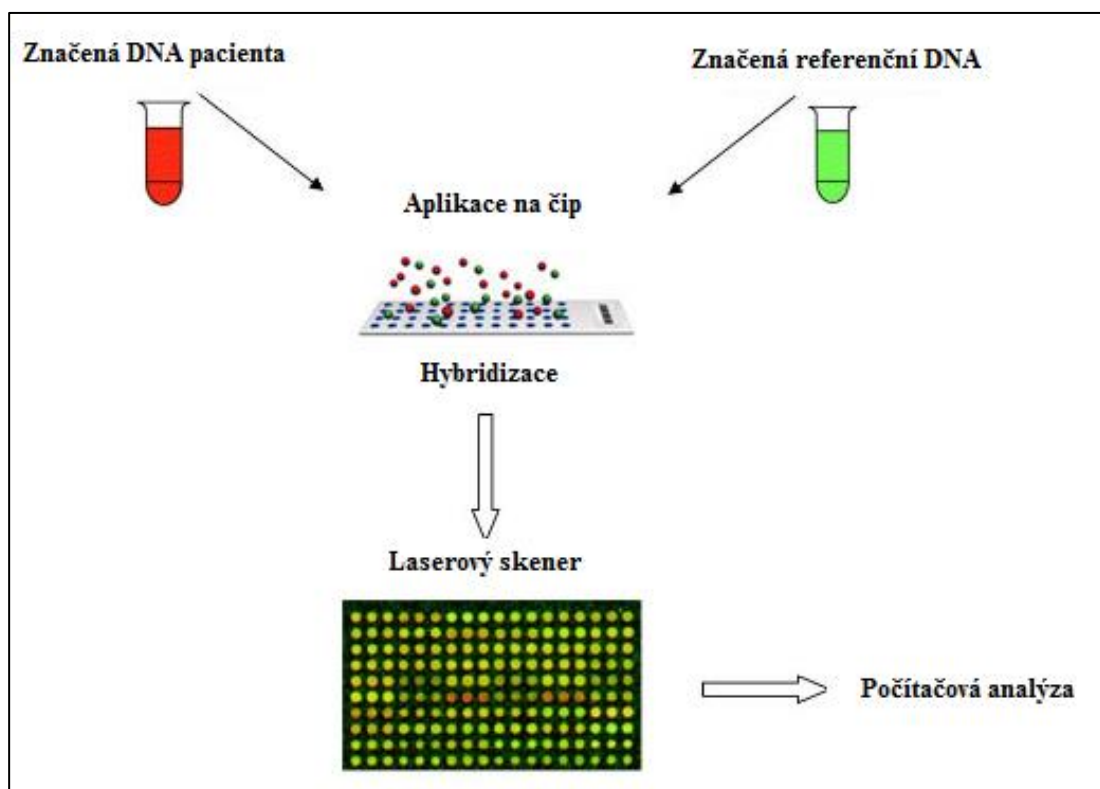
Metoda array CGH identifikuje CNV (Copy Number Variation – varianty v počtu kopií). CNV jsou segmenty DNA o velikosti mezi jednou kilobází (kb) do několika megabází (Mb). Podílí se na genetické variabilitě lidského genomu. Zahrnují delece a duplikace – tedy změny v počtu kopií. Pokud tyto delece a duplikace zasahují důležité geny, mohou mít vliv na jejich projev ve fenotypu. Některé CNV mají příčinnou souvislost s určitými mikrodelečními a mikroduplikačními syndromy (např. Williams-Beuren syndrom, DiGeorge syndrom). Další CNV se vyskytují jako polymorfismy bez zjevného vztahu k onemocnění (Madrigal et al., 2007).

4.1.1 *Princip array CGH*

Metoda je založena na principu porovnání intenzity fluorescence vyšetřované DNA a komerčně dodané referenční DNA (Banerjee, 2013). Nejčastěji jsou využívány oligotidunukleotidové sondy, které reprezentují celý genom. Tyto fragmenty DNA jsou ve formě malých teček navázány na podložním skle – čipu.

Po kvantifikaci a optimalizaci DNA vyšetřovaného vzorku (přečištění, ředění nebo zakoncentrování na doporučenou vstupní koncentraci) a referenční DNA jsou obě DNA denaturovány a naznačeny odlišnými fluorescenčními barvivy (Cy-3 a Cy-5). Po proměření koncentrace a absorbance a smíchání obou DNA je vytvořen hybridizační master mix, který je nanesen na Gasket slide a na ten je přiložen čip s imobilizovanými oligonukleotidovými sondami. Po té v hybridizační peci dochází k hybridizaci značených DNA se sondami na čipu. Po řádném odmytí čipového skla je potřeba ho co nejrychleji přenést do laserového skeneru (řádově v hodinách). Ve skeneru dochází k nasnímání intenzit signálů obou fluorochromů v každém místě sklíčka. Získaná data jsou zpracována a vizualizována analyzačním softwarem CytoGenomics. Následuje vyhodnocení detekovaných změn (Hurd, 2010).

Limity metody jsou nemožnost zachytit inverze, balancované aberace, bodové mutace a změny ploidie.



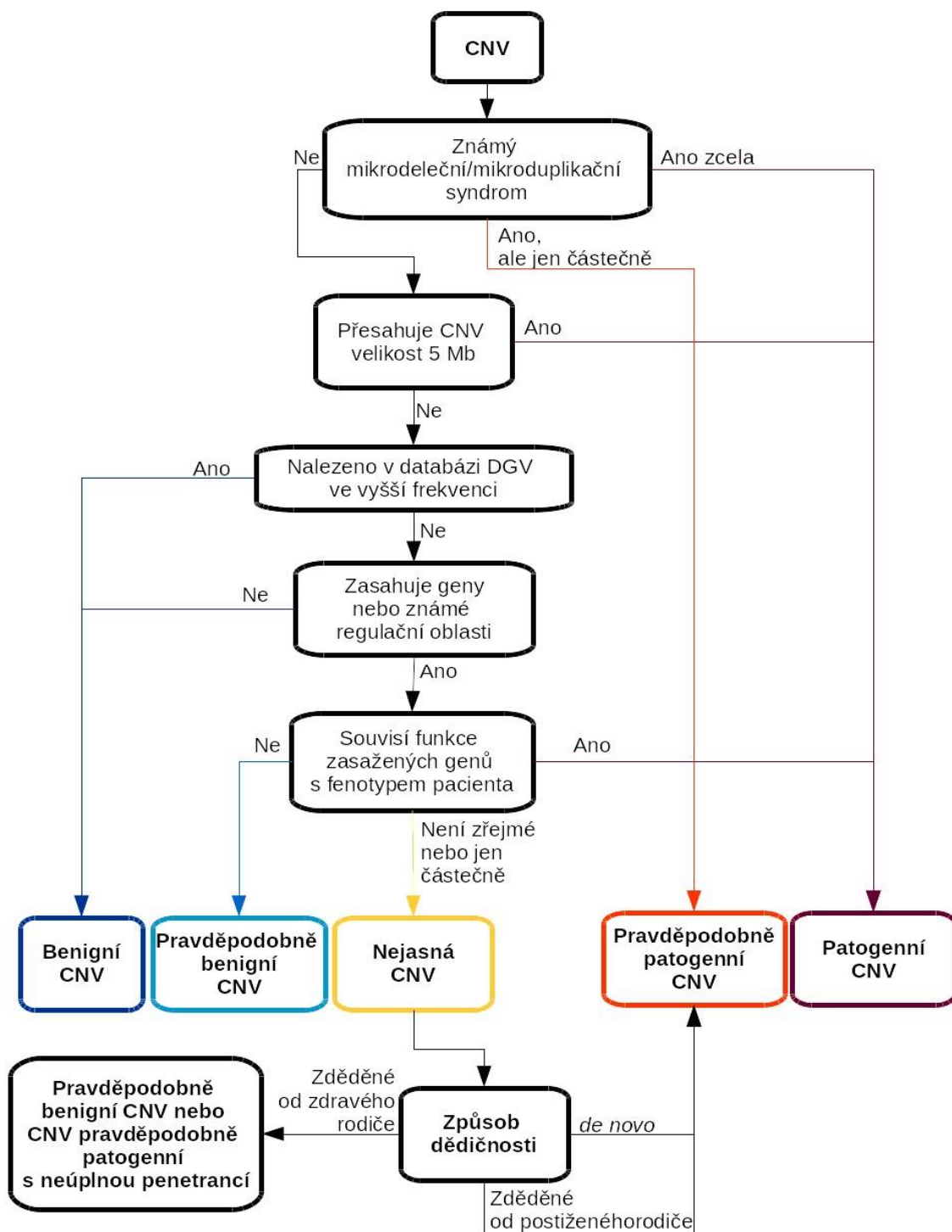
Obrázek 2: Schéma postupu metody array CGH (Zdroj: Šlégrová, 2017)

4.1.2 Interpretace dat

Údaje získané z laserového skeneru jsou vyhodnocovány softwarovými programy. Pro správné zařazení nalezené CNV do jednotlivých skupin napomáhají interní a externí databáze (Weise et al., 2012). Jednotnost interpretace zachycených CNV je podporována odbornými pokyny, podle kterých se CNV vyhodnocují. Tyto pokyny uvádějí doporučené kategorie pro interpretaci – patogenní, benigní a nejisté klinické významy. Jasně popsané CNV, které mají závažný vliv na klinický stav pacienta a které jsou uvedené ve více publikacích, řadíme mezi patogenní. Běžné polymorfismy řadíme do kategorie benigních nálezů. Kategorie varianta nejasného klinického významu zahrnuje velký rozsah výsledků, které podle současných poznatků nelze jednoznačně identifikovat jako benigní ani patogenní (Kearney et al., 2011).

4.1.3 Interpretace CNV

Při interpretaci CNV jsme v prvním kroku určovali, zda detekovaná aberace nezasahuje lokus pro již popsaný mikroleční či mikroduplikační syndrom. Ve druhém kroku jsme zjišťovali její velikost a teprve poté ji porovnali s databází DGV. V tomto kroku byl také zohledněn počet případů v DGV, u kterých byla daná CNV diagnostikována. Jelikož v DGV jsou uvedeny i CNV pozorované jen u jednoho jedince, v důsledku malého množství pozorování, to ještě neznamena, že tato CNV je nutně benigní. Ve čtvrtém kroku byla zjišťována funkce zasažených genů. CNV byla zařazena do jedné z pěti kategorií podle zjednodušeného rozhodovacího algoritmu, který popisuje obrázek 3.



Obrázek 3: Schéma zjednodušeného rozhodovacího algoritmu (Zdroj: Drábová, 2017)

4.1.4 ISCN

V posledních letech došlo k velkému rozvoji molekulárně-cytogenetických metod, jsou běžně využívány v laboratořích. Publikace ISCN věnuje v současné době pozornost zápisům jejich výsledků. Obsahuje také správnou nomenklaturu pro nálezy, které jsou získávány metodou array CGH. Vždy se nejdříve udává symbol „arr“, který je zkratkou pro metodu array CGH. U ženy se zapisují autozomy i zástupce gonozomů v jedné závorce, za níž se vyskytuje násobek, v jakém jsou dané chromozomy přítomny. V případě mužského pohlaví se používají závorky dvě. V první z nich jsou zapsány autozomy a ve druhé konstituce gonozomů. Jejich násobek je zaznamenán za koncem každé závorky.

Zápis normálních nálezů metodou array-CGH:

- **arr(1-22,X)x2** u ženy
- **arr(1-22)x2,(XY)x1** u muže

V případě abnormálního nálezu se za znaménkem „arr“ uvádí cytogenetická oblast chromozomu, jehož se aberace týká (např. arr 17p11.2). Poté následuje závorka, která obsahuje počátek a konec jednotlivých zasažených nukleotidů (např. 16,512,256-20,405,113). Za závorkou se opět udává počet detekovaných kopií (např. x3). Takový zápis by vypovídal o detekci třech kopií úseku 17p11.2. Jednalo by se tedy o duplikaci, která by byla zapsána takto:

- **arr 17p11.2(16,512,256-20,405,113)x3** (Shaffer et al., 2013).

4.1.5 ISCA Consortium

ISCA Consortium (The International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium) - Konsorcium mezinárodních standardů pro cytogenomické čipy je organizace, která se snaží o zlepšení kvality vyšetření v rámci klinické cytogenetiky, s využitím nových molekulárně-cytogenetických technologií. Pracovní skupina podílející se na ISCA je složená z lékařských genetiků, osob z výzkumu a bioinformatiků. Jejich cílem je shromažďování vědeckých informací, které napomáhají při interpretaci výsledků tím, že

dokazují souvislost detekovaných nálezů s klinickými fenotypy. Skupina se také zabývá vývinem standardů pro design čipů. Jeden z hlavních úkolů je podpora jednotného výkladu CNV (Riggs et al., 2012, Miller et al., 2010).

4.2 *Izolace DNA*

Pro metodu array CGH je vstupní materiál DNA z různých biologických materiálů: periferní krev, plodová voda, choriové klky a potrácená tkáň. DNA získáváme izolačním kitem *QIAmp DNA Blood Mini Kit*, který je komerčně dodáván spolu s potřebnými reagensy. Podle charakteru biologického materiálu jsou při přípravě vzorků k izolaci DNA určité odlišnosti. Při samotné izolaci DNA je postup shodný pro všechny typy vzorků. Uvedené postupy se řídí pokyny, které jsou uvedeny v doporučené příručce izolačního kitu *QIAmp DNA Blood Mini Kit*.

4.2.1 *Příprava na izolaci DNA z periferní krve*

Biologickým materiálem je plná krev odebraná z periferní žíly do odběrové zkumavky s přídavkem protisrážlivého činidla EDTA. Přístrojové vybavení, reagensie a pomůcky pro izolaci DNA z periferní krve jsou uvedeny v tabulce 1.

Tab. 1: Vybavení pro izolaci DNA z periferní krve

Přístrojové vybavení	Sterilní box, vortex, centrifuga
Reagensie	Izolační kit QIAmp DNA Blood Mini Kit, proteáza, eluční pufr, ethanol
Pomůcky	1,5 ml zkumavky, automatické pipety, sterilní špičky, buničina, stojánky, popisovač

4.2.2 Příprava na izolaci DNA z plodové vody

Plodová voda je odebíraná do odběrové zkumavky bez protisrážlivého činidla a bez transportního média. Nejprve je centrifugována a poté se pracuje se supernatantem. Přístrojové vybavení, reagentie a pomůcky pro izolaci DNA z plodové vody jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab. 2: Vybavení pro izolaci DNA z plodové vody.

Přístrojové vybavení	Sterilní box, vortex, centrifuga
Reagentie	Izolační kit QIAmp DNA Blood Mini Kit, proteáza, eluční pufr, ethanol
Pomůcky	1,5 ml zkumavky, automatické pipety, pasturovy pipety, sterilní špičky, buničina, stojánky, popisovač

4.2.3 Příprava na izolaci DNA z tkání

Vzorky choriových klků a potracené tkáně jsou do laboratoře dodávány ve zkumavkách s transportním médiem. Tyto tkáně, očištěné v PBS pufru, je třeba připravit k izolaci DNA nakrájením a rozmělněním na malé části pomocí skalpelů a injekčních jehel. Přístrojové vybavení, reagentie a pomůcky pro izolaci DNA z choriových klků a potracené tkáně jsou uvedeny v tabulce 3.

Tab. 3: Vybavení pro izolaci DNA z choriových klků a potracené tkáně.

Přístrojové vybavení	Sterilní box, vortex, centrifuga, tepelná deska pro 1,5 ml zkumavky
Reagentie	Izolační kit QIAmp DNA Mini Kit, proteáza, eluční pufr, PBS pufr, ethanol
Pomůcky	1,5 ml zkumavky, automatické pipety, sterilní špičky, pasturovy pipety, petriho misky, skalpely, injekční jehly, buničina, stojánky, popisovač

4.2.4 Postup izolace DNA

Celý proces izolace DNA probíhá ve sterilním boxu.

1. Do 1,5 ml zkumavky se automatickou pipetou nadávkuje 200 μ l připraveného vzorku, 20 μ l proteázy a 200 μ l lyzačního pufru. Lyzační pufr je součástí izolačního kitu.
2. Zkumavka se vortexuje asi 5 sekund.
3. Zkumavka se vloží na 10 minut při 56°C do držáku předem nahřáté tepelné desky.
4. Poté se přidá 200 μ l ethanolu a zkumavka se protřepe na vortexu.
5. Následuje přenesení směsi do QIAmp Spin zkumavky, která je opatřená kolonkou.
6. Centrifugace 1 minutu při otáčkách 10 000xg.
7. Poté probíhají 2 filtrace pomocí promývacích roztoků, které jsou obsaženy v izolačním kitu. Během promývání se zkumavky centrifugují 1 minutu při otáčkách 10 000xg a kolonky se přendávají do nových prázdných zkumavek.
8. Další centrifugace probíhá při stejných otáčkách 2 minuty na sucho, bez použití promývacího roztoku.
9. Kolonka je umístěna do 1,5 ml popsané zkumavky, do kolonky je napipetován eluční pufr, poslední centrifugace trvá 1 minutu při otáčkách 10 000xg.

4.3 Příprava na metodu array CGH

Přístroje a pomůcky:

Agilent Microarray Scanner

Centrifugy

Centrifuga MiniSpin

Hybridizační pec (s otočným nástavcem na hybridizační komůrky), kalibrovaná na teplotu 67 °C

Termocyklery

Magnetická míchačka s ohřevem

Magnetická míchačka bez ohřevu
Centrifugy
Spektrofotometr NanoDrop
Qubit Fluorometer
Pipety
Skleněné kyvety se stojánkem
Dóza na mikroskla s víčkem
Držáček závěsný k vložce do dózy na mikroskla s víčkem
Termostat
Vortex
Hybridizační komůrka
Gasket slide

Reagencie:

Sure Tag Complete DNA Labeling Kit
SurePrint G3 ISCA V2 CGH Kit 8x60K
Oligo aCGH/ChIP.on-chip Wash Buffer 1
Oligo aCGH/ChIP.on-chip Wash Buffer 2
Cot-1 DNA (1,0 mg/ml)
Oligo aCGH/ChIP-on-chip Hybridization Kit
Microarray Slide Backing 8x60K
Pufr 1xTE (pH 8,0) molecular grade
Ethanol
3M acetát sodný
PCR voda

4.4 Metodický postup arrayCGH

Tento postup se řídí doporučenou příručkou pro genomickou analýzu metodou microarray CGH pro formát 8x60k od firmy Agilent Technologies. Verze protokolu 7.4, která je platná od srpna 2015. Jedno čipové sklo je určeno celkem pro 8 pacientů a na každého z nich připadá 60 000 oligonukleotidových sond.

4.4.1 Příprava vzorků

Pro analýzu array CGH je důležité použít DNA o vysoké čistotě a integritě. Čistotu lze změřit pomocí spektrofotometru NanoDrop, který porovnává poměry absorbance při vlnových délkách 260/280 a 260/230 nanometrů. Hodnota poměru 260/280 by se měla pohybovat v rozmezí 1,8-2,0 a hodnota poměru 260/230 by měla být vyšší než 1,2.

Pokud DNA není dostatečně čistá, lze ji jednoduchým způsobem přechistit pomocí precipitace. Do zkumavky se přidá 1/10 objemu DNA vychlazeného octanu sodného (3M) a 2-2,5 násobek etanolu. Poté se vzorek inkubuje minimálně 2 hodiny při -20°C (lze nechat v mrazáku přes noc), po té centrifugovat 15000g 30 minut, supernatant přechistit 70% ethanolem, opět stočit na 2-5 minut, supernatant nechat vyschnout a resuspendujeme peletku v PCR vodě.

DNA vzorku se upravuje destilovanou vodou bez nukleáz na objem 13 μ l tak, aby její koncentrace odpovídala 300 ng. Objem DNA vzorku a vody vypočítá program Excel, v němž je připravována tabulka pro ředění vzorků. Stejně pracujeme také s referenční DNA, která je dodávána komerčně, její parametry jsou tedy předem známy. Počet vzorků vyšetřovaných žen musí souhlasit s počtem ženských kontrolních DNA. Pro mužské pohlaví platí stejné pravidlo.

Tab. 4: Stanovení koncentrace DNA po ethanolovém přechištění, naředění TE pufrem.

	Kód DNA	Jméno	pohlaví	konc. DNA [ng/ μ l]	objem DNA [μ l]	objem vody [μ l]	Poznámky
1_1	A141-18	Pacient 1	F	171	3,5	9,5	
1_2	652-18	Pacient 2	F	895	0,7	12,3	
1_3	742-18	Pacient 3	M	1023	0,6	12,4	
1_4	719-18	Pacient 4	F	969	0,6	12,4	
2_1	758-18	Pacient 5	M	934	0,6	12,4	
2_2	792-18	Pacient 6	F	708	0,8	12,2	
2_3	796-18	Pacient 7	F	940	0,6	12,4	
2_4	794-18	Pacient 8	M	1027	0,6	12,4	
9	M1		M	329	1,8	11,2	
10	M2		M	329	1,8	11,2	
11	M3		M	406	1,5	11,5	
12	F1		F	383	1,6	11,4	

13	F2		F	383	1,6	11,4	
14	F3		F	383	1,6	11,4	
15	F4		F	383	1,6	11,4	

4.4.2 Fluorescenční značení vzorků

K fluorescenčnímu značení vzorků se použije Sure Tag Complete DNA Labeling Kit.

- Ke každému připravenému vzorku i referenci se přidá 2,5 μ l Random primeru. Každý vzorek je vhodné dobře promíchat opakovaným propipetováním.
- Následuje denaturace a fragmentace v termocykleru 10 minut při 98°C a po té ochlazení na 4°C.
- Vzorky se odstředí na centrifuze 1 minutu při 6000 x g.
- Pokud objem vzorku není 15,5 μ l, upraví se na požadovaný objem destilovanou vodou.
- Příprava dvou značících Master Mixů (jeden s Cy-3 a jeden s Cy-5) pro značení vzorků pacientů a kontrol.

Tab. 5: Reagencie pro značení 8 vzorků DNA pacientů a 8 kontrolních DNA

Složka	Objem na 8 reakcí [μ l]
5x Reaction Buffer - 5 μ l	42,5
10x dNTPs -2.5 μ l	21,3
Cy-3 nebo Cy-5 - 1.5 μ l	12,8
Exo(-) Klenow - 0.5 μ l	4,3

- Do mikrozkušavek s 15,5 ml vzorku/reference se přidá 9,5 ml Master Mixu.
- Pulzně vortexovat, pak stočit.
- Proces značení pokračuje v termocykleru 2 hodiny při 37°C a 10 minut při 65°C. Poté dojde k ochlazení na 4°C.
- V tomto kroku je možné analýzu zastavit a vzorky uskladnit ve tmě až na 1 měsíc při teplotě -20°C.

Vzhledem k tomu, že je v Master Mixu obsažen enzym Klenow, pracujeme s chladicí destičkou. Fluorescenční barviva Cy-5 a Cy-3 (Cyanin-5 a Cyanin-3) nevystavujeme světlu. Vzorky pacientů jsou značeny pomocí Cy-5 a kontrolní vzorky jsou značeny fluorescenčním barvivem Cy-3.

4.4.3 Purifikace značené DNA

- Vzorky odstředit 1 minutu 6000 x g.
- Připravit 1 purifikační kolonku pro každý vzorek, označit je na víčka i kolonku. Kolonku vložit do 2 ml sběrné mikrozkušavky.
- Ke každé reakční směsi přidat 430 μ l TE pufru (pH = 8), poté nanést na kolonku ve sběrné zkumavce.
- Zkušavky vortexovat, pak centrifugovat při laboratorní teplotě v purifikačních kolonkách 14 000g 10 minut.
- Kolonky přenést do nových sběrných zkumavek, dopipetovat 480 μ l pufru TE (pH = 8)
- Opět centrifugace při laboratorní teplotě 14 000g 50 minut.
- Kolonky se vyjmou ze sběrných zkumavek a dnem vzhůru přendají do čistých sběrných zkumavek.
- Následuje centrifugace 1 minutu při 1 000x g a laboratorní teplotě.
- Změření objemu vzorku.
- Odebere se 1,5 μ l od každého vzorku, aby se mohl určit výtěžek naznačené DNA a specifická aktivita.
- Po dobu měření uchovávat vzorky v lednici.

4.4.4 Stanovení stupně značení

Za použití přístroje NanoDrop ověříme, zda značení DNA proběhlo v pořádku. Přístroj disponuje programem pro měření inkorporace fluorescenčního barviva Cy3 a Cy5 do DNA. Měříme 2 μl značeného vzorku. Tato hodnota by měla být úměrná koncentraci vzorku a uvádí se v jednotkách $\text{pmol}/\mu\text{l}$.



Obrázek 4: Přístroj NanoDrop (Zdroj: vlastní)

4.4.5 Kombinování DNA pacientů a kontrolních DNA

- Vždy je nutné kombinovat DNA stejného pohlaví. Pokud by došlo ke smíchání DNA pacienta mužského pohlaví s kontrolní DNA ženy (nebo naopak), hodnocení by pro pohlavní chromozomy nebylo informativní.
- Při míchání se používají vypočtené objemy vzorku pacienta a kontrolního vzorku, tak aby celkový objem dal dohromady 16 μl .

- Vzorek a kontrola k němu přiřazená by měly mít podobnou hodnotu inkorporace fluorescenčního barviva do DNA.
- V tomto kroku je možné analýzu zastavit a vzorky uskladnit ve tmě až na 1 měsíc při teplotě -20°C.

Tab. 6: Kombinace vzorku s referencí.

	Kód DNA	Jméno	konc. DNA [ng/μl]	absorbance [pmol/μl]	pohlaví	vzorek vs reference	objem DNA [μl]
1_1	A141-18	Pacient 1	371,0	13,26	F	13	8,3
1_2	652-18	Pacient 2	344,0	13,54	F	14	8,4
1_3	742-18	Pacient 3	418,0	14,52	M	12	8,0
1_4	719-18	Pacient 4	372,0	13,58	M	10	8,2
2_1	758-18	Pacient 5	380,7	14,52	M	9	8,2
2_2	792-18	Pacient 6	326,0	11,93	M	11	8,5
2_3	796-18	Pacient 7	332,7	12,4	F	16	7,2
2_4	794-18	Pacient 8	344,5	11,41	F	15	7,8
9	M1		395,7	11,55	M	5	7,8
10	M2		393,8	11,18	M	4	7,8
11	M3		371,5	11,09	M	6	7,5
12	F1		420,5	12,34	M	3	8,0
13	F2		400,1	11,3	F	1	7,7
14	F3		377,7	10,95	F	2	7,6
15	F4		326,8	9,11	F	8	8,2
16	F5		271,6	7,97	F	7	8,8

4.4.6 Hybridizace

- Blokovací činidlo (10x Blocking agent) se připravuje předem, rozpuštěním lyofilizovaného činidla v destilované vodě bez nukleáz 60 minut při pokojové teplotě.
- Příprava hybridizačního Mater Mixu.

Tab. 7: Hybridizační Master Mix

Složka	Objem na 1 reakci [μ l]	Objem na 8 reakcí + 2 navíc [μ l]
Cot-1 DNA	2	20
10x aCGH Blocking Agent	4,5	45
2x HI-RPM Hybridization Buffer	22,5	225
Celkový objem	29	290

- Ke každému vzorku o objemu 16 μ l se přidá 29 μ l Master Mixu pro hybridizaci. Objem reakční směsi by měl být 45 μ l.
- Propipetovat cca 6x, lehce vortexovat a krátce stočit.
- Následuje inkubace v termocykleru, nejdříve 3 minuty při 98°C a poté 30 minut při 37°C.
- Vzorky odstředit 1 minutu při 6000g.
- Hybridizace musí následovat ihned poté, pokud to není možné, je potřeba udržovat teplotu reakční směsi na 37 °C.
- Gasket slide se položí do hybridizační komůrky gumovým těsněním nahoru a do jednotlivých oblastí se opatrně pipetuje směs – bez bublin. Potom se přiloží čip aktivní stranou dolů a barkodem nahoru.
- Hybridizační komůrka se uzavře ochranným sklem a dotáhne šroubkem.
- Následuje alespoň 16 hodin hybridizace při 67°C v hybridizační peci, ve které vzorky rotují rychlostí 20 rpm otáček.

Tab. 8: Pozice na podložním skle, do kterých jsou nanášeny jednotlivé hybridizační směsi.

BARCODE	Array 1_1 č. 1	Array 1_2 č. 2	Array 1_3 č. 3	Array 1_4 č. 4
	Array 2_1 č. 5	Array 2_2 č. 6	Array 2_3 č. 7	Array 2_4 č. 8



Obrázek 5: Hybridizační pec (Zdroj: vlastní)

4.4.7 *Promytí skla s microarray*

- Nechat předehřát promývací pufr 2 (Agilent Oligo aCGH/Chip-on-Chip Wash Buffer 2) na teplotu 37 °C přes noc. Pufr předehřívát v plastové láhvi po destilované vodě, nechat předehřát i dózu.
- Promýt dózy na mikroskla, vložky a míchadla ultračistou vodou.
- Po hybridizaci vyjmout komůrku z hybridizační pece, povolít šroubky a sejmut ochranné sklo.
- Pogumované sklíčko s přiloženým čipovým sklem ponořit do dózy s odmývacím roztokem 1 a oddělit je od sebe pinzetou.
- Dále pracujeme pouze s čipovým sklem, které umístíme do další dózy s odmývacím roztokem 1 na 5 minut za stálého míchání pomocí magnetického

míchadla. Poté ponoříme sklíčko do předem nahřátého roztoku 2 na 37°C a za stálého míchaní promýváme 1 minutu.

Tab. 9: Promývání array CGH

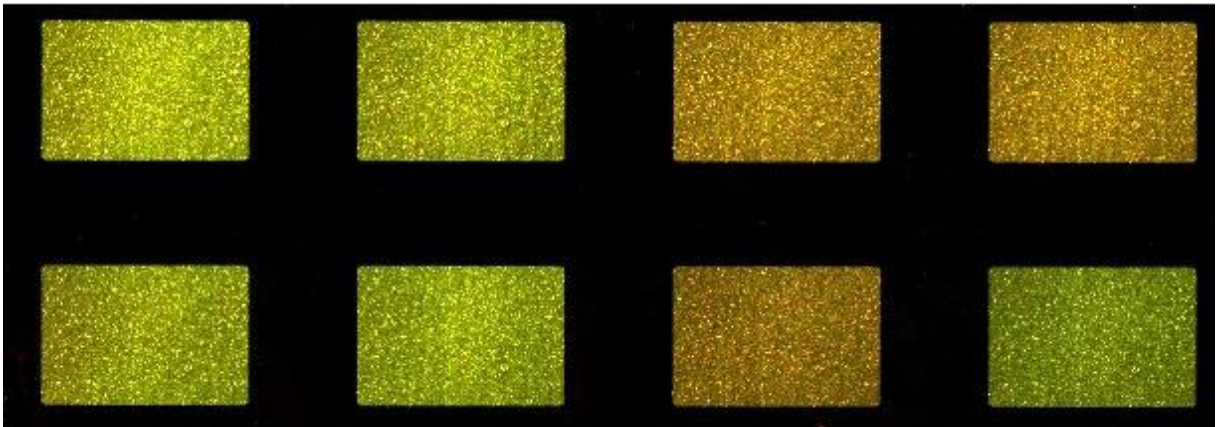
Dóza	Promývací pufr	Teplota	Poznámky	Čas
1	WB 1	RT	při promývání v dóze č. 1 musí být sklo stále ponořené CHVÍLI NECHAT SKLA SAMOSTANĚ ODPADNOUT	po dobu oddělení skel
2	WB 1	RT	vložit vložku a míchadlo; z dózy č. 2 přendáváme sklo ve vložce rychle do dózy č. 3	5 min
3	WB 2	37 °C	vložit míchadlo; z dózy č. 3 vyndáváme sklo velmi pomalu	1 min

4.4.8 Skenování

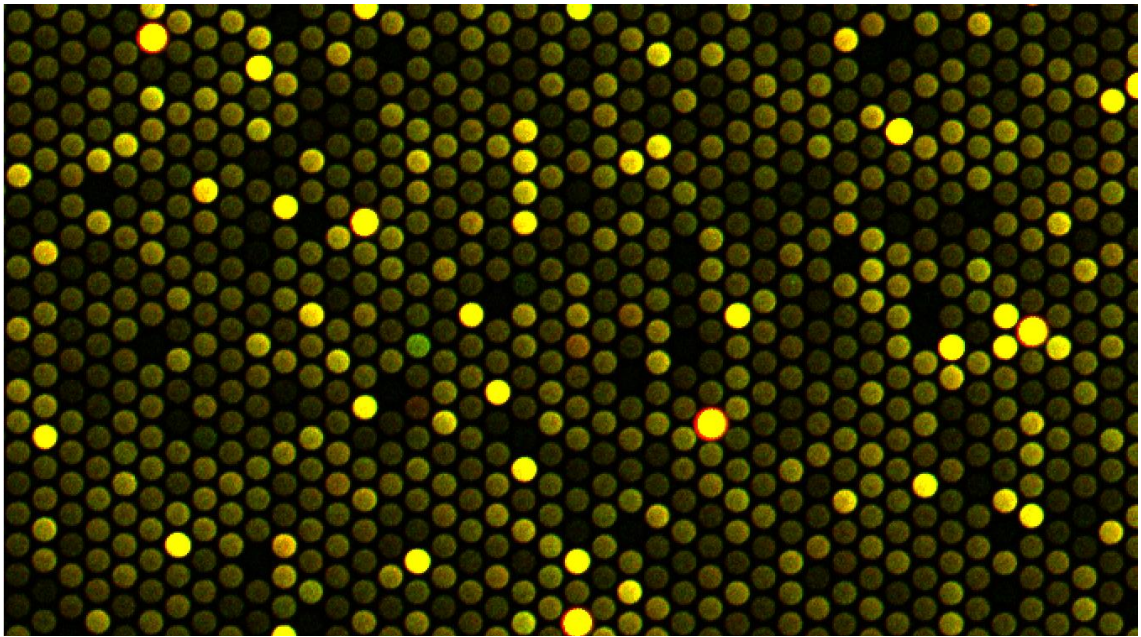
Skla je potřeba naskenovat co nejrychleji, aby nedošlo k poškození oxidanty a tím snížení intenzity signálu. Čipové sklo vložené do speciálního držáku je umístěno do laserového skeneru. Fluorescenční barvivo Cy5 je skenováno při 633 nm a barvivo Cy3 při 532 nm. Jednotlivá pole čipu jsou ozářena excitačním světlem o těchto vlnových délkách. Poté dochází k vyzáření přebytečné energie ve formě fluorescenčního světla. Výstupy z laserového skeneru jsou extrahovány do softwarového programu *Agilent Feature Extraction*. Získaná data jsou poté přenesena do interpretačního programu, ve které lze jednotlivé nálezy hodnotit a určit jejich klinický význam.



Obrázek 6: Laserová skener (Zdroj: vlastní)



Obrázek 7: Oskenované čipové sklo pomocí laserového skeneru. Signály pozorované pomocí programu *Agilent Feature Extraction* (Zdroj: vlastní)



Obrázek 8: Detail předchozího čipu

5. Výsledky

5.1 Hodnocení nálezů

K hodnocení nálezů jsou využívány interpretační programy. V našem případě se jedná o softwarový program Agilent CytoGenomics 4.0.2.21 od firmy Agilent Technologies.

5.1.1 Hodnocení kvality analýzy

Nejprve zkontrolujeme kvalitu provedené analýzy. Program CytoGenomics automaticky generuje hodnoty, které určují, zda je kvalita analýzy vynikající, vyhovující nebo nevhovující. Mezi tyto parametry patří standardní odchylka (SD – standard derivation) a poměry intenzit signálů vůči pozadí.

Tab. 10: Hodnoty parametřů, které určují kvalitu analýzy

Parametr	Vynikající kvalita	Vyhovující kvalita	Nevyhovující kvalita
Hodnota SD	< 0,2	< 0,3	= 0,3 nebo > 0,3
Poměr intenzit signálů vůči pozadí	> 100,0	> 30,0	= 30 nebo < 30,0

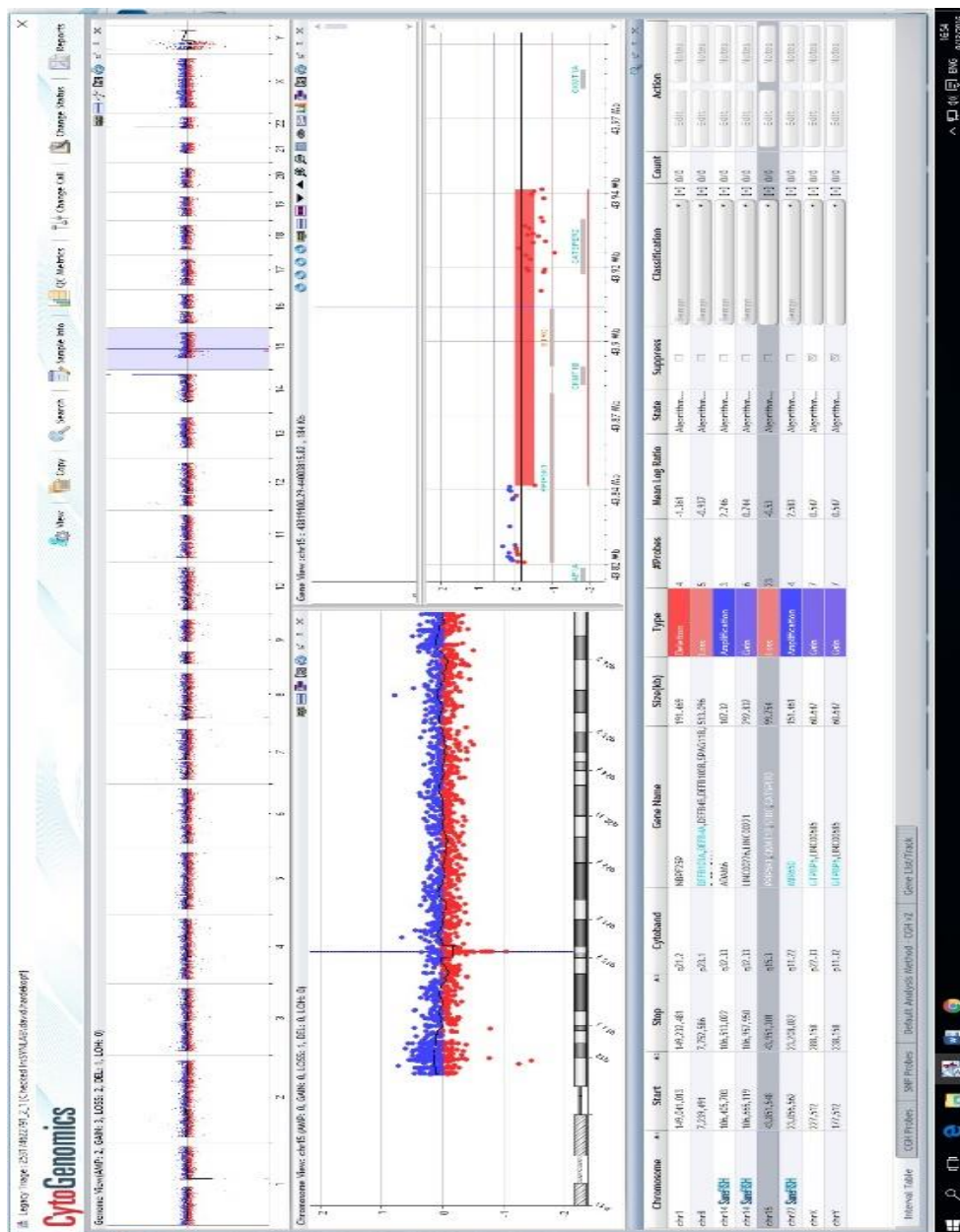
5.1.2 Hodnocení aberací

Jednotlivé nálezy můžeme zhodnotit, pokud má vzorek alespoň vyhovující kvalitu. Program CytoGenomics zobrazuje celý genom pacienta i jednotlivé chromozomy. Na oblasti, ve kterých se nacházejí duplikace/delece, detailně zaostřuje. Program nás informuje, zda se aberace nachází v intronové, či exonové oblasti, popřípadě kolik exonů se v zasažené oblasti nachází. Zobrazí také tabulku, ve které jsou informace o

jednotlivých nálezech - uvádí cytogenetickou oblast na chromozomu, druh aberace, velikost aberace, zasažené geny, počet sond v dané oblasti, počátek a konec jednotlivých zasažených nukleotidů.

5.1.3 Vizualizace hodnocených nálezů

Obrázek 9: Náhled na výsledek pacienta v programu Agilent CytoGenomics 4.0.2.21 od firmy Agilent Technologies. (Zdroj: vlastní)



5.2 Interpretace výsledků

K určování klinického významu nalezených CNV slouží řada databází. Program CytoGenomics je s nimi přímo spojen. Mezi nejpoužívanější databáze patří například OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), která zahrnuje komplexní přehled lidských genů a jejich popis. Další známá databáze je DGV (Database of genomic variants), která získává data z populačních studií a obsahuje tedy většinou CNV považované za benigní (MacDonald et al., 2013). Hojně využívaná je DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Human using Ensembl Resources), databáze variant nepovažovaných za benigní.

5.3 Výsledky zpracovaných čipů

Vzhledem k obtížnosti i finanční náročnosti této metody, jsem vzorky nezpracovávala sama, ale byla jsem jejich zpracování přítomna a podílela jsem se na něm.

Čip 1:

Pacient 1: muž, 32 let, vzorek – periferní krev

indikace: patologický nález plodu

Pacient 2: žena, 32 let, vzorek – periferní krev

indikace: patologický nález plodu

Pacient 3: žena, 8 let, vzorek – periferní krev

indikace: LMD

Pacient 4: chlapec, 1 rok, vzorek – periferní krev

indikace: PMR

Pacient 5: dívka, 3 roky, vzorek – periferní krev

indikace: PMR, dětský autismus

Pacient 6: chlapec, 15 let, vzorek – periferní krev

indikace: PMR

Pacient 7: dívka, 2 roky, vzorek – periferní krev

indikace: PMR

Pacient 8: žena, 30 let, vzorek – plodová voda

indikace: podezření na chromozomální aberace plodu

Tab. 11: Výsledky čipu 1

Číslo pacienta	Chromozóm	Lokalita	Typ aberace	Hodnocení
1	chr7	q11.23	Gain	pravděpodobně benigní
	chr10	q25.2	Loss	pravděpodobně patogenní
	chrX	q21.31	Gain	varianta nejasného významu
2	chr7	p21.1	Gain	benigní
	chr16	p11.2 - p11.1	Gain	benigní
	chr17	q21.31	Loss	pravděpodobně benigní
3	chr14	q32.33	Loss	varianta nejasného významu
4	chr5	p15.33	Loss	pravděpodobně benigní
	chr5	p15.33	Loss	benigní
	chr7	q34	Loss	pravděpodobně benigní
	chr8	p23.3	Gain	pravděpodobně benigní
	chr9	q34.3	Loss	pravděpodobně patogenní
	chr10	p15.1	Loss	pravděpodobně benigní
	chr17	q21.31	Gain	pravděpodobně benigní
5	chr6	p25.3	Gain	benigní
	chr8	p23.1	Loss	benigní
	chr10	q23.1	Gain	pravděpodobně benigní
	chr15	q11.2	Loss	varianta nejasného významu
	chr16	p11.2 - p11.1	Gain	pravděpodobně benigní
	chr17	q21.31	Loss	pravděpodobně benigní
6	chr3	p26.3	Deletion	varianta nejasného významu
	chr9	p23	Loss	varianta nejasného významu
7	chr1	q21.2	Loss	pravděpodobně benigní
	chr2	q34	Gain	varianta nejasného významu
	chr4	p16.3	Gain	benigní
	chr5	q33.1	Gain	pravděpodobně benigní
	chr6	p25.3	Loss	benigní
	chr8	p23.1	Loss	benigní
	chr14	q11.2	Loss	pravděpodobně benigní
	chr17	q21.31	Loss	pravděpodobně benigní
8	chr2	q13	Gain	varianta nejasného významu
	chr6	p25.3	Loss	benigní

Čip 2:

Pacient 9: chlapec, 2 roky, vzorek – periferní krev

indikace: PMR

Pacient 10: dívka, 3 roky, vzorek – periferní krev

indikace: PMR, autismus

Pacient 11: muž, 32 let, vzorek – periferní krev

indikace: rodinná anamnéza, u dcery PMR, otec pacienta 7

Pacient 12: žena, 30 let, vzorek – periferní krev

indikace: rodinná anamnéza, u dcery PMR, matka pacienta 7

Pacient 13: žena, 33 let, vzorek – periferní krev

indikace: rodinná anamnéza, u syna mikroduplikace na chromozómu X

Pacient 14: chlapec, 14 let, vzorek – periferní krev

indikace: MR, rozštěp rtu a patra

Pacient 15: dívka, 2 roky, vzorek – periferní krev

indikace: PMR, stigmatizace

Pacient 16: chlapec, 1 rok, vzorek – periferní krev

indikace: PMR, hypotonie

Tab. 12: Výsledky čipu 2

Číslo pacienta	Chromozóm	Lokalita	Typ aberace	Hodnocení
9	chr10	q26.3	Gain	benigní
	chr13	q12.11	Gain	benigní
	chr17	p11.2	Gain	benigní
	chr22	q12.2	Loss	varianta nejasného významu
10	chr3	q29	Loss	malé aberace
	chr17	q21.31	Loss	benigní
11	chr1	q21.2	Gain	malé aberace
	chr1	q32.2	Gain	malé aberace
	chr2	q31.1	Gain	malé aberace
	chr2	q31.1	Gain	malé aberace
	chr2	q34	Gain	varianta nejasného významu
	chr4	p16.3	Gain	malé aberace
	chr4	q26	Loss	benigní
	chr5	p13.3	Gain	benigní
	chr6	p25.3	Loss	benigní
	chr16	p13.11	Deletion	varianta nejasného významu
chrX	p11.23	Gain	benigní	

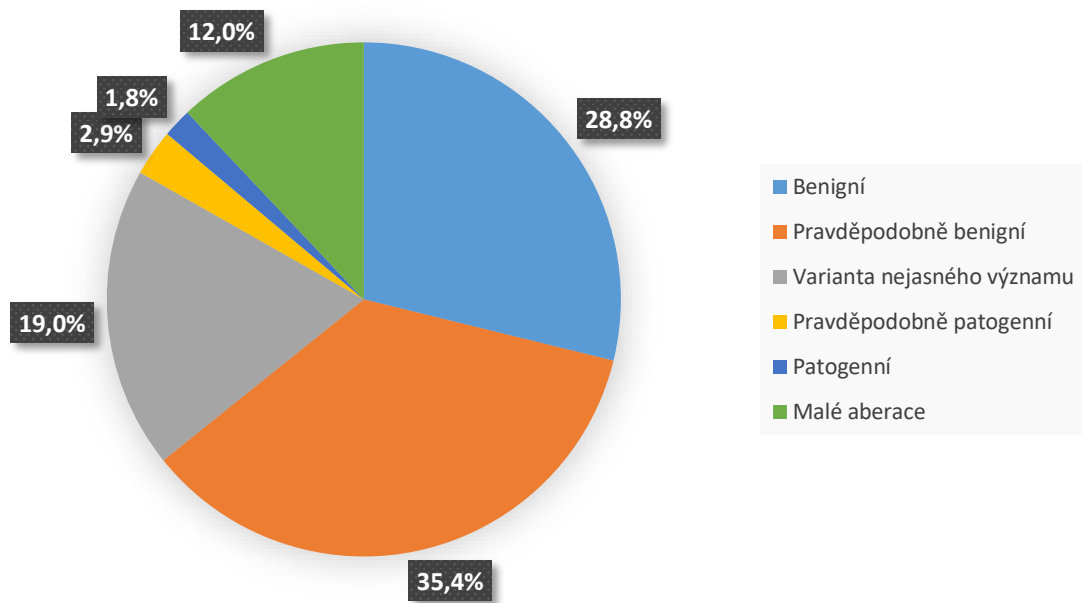
	chrX	q27.1	Gain	benigní
	chrX	q28	Gain	benigní
12				bez aberace
13	chr22	q11.21	Loss	benigní
	chrX	p22.32 - p22.31	Gain	varianta nejasného významu
14	chr2	q13	Loss	nález ověřit
	chr4	p16.1	Gain	benigní
	chr10	p12.1	Loss	varianta nejasného významu
	chr17	q21.31	Loss	benigní
	chrX	p22.31	Gain	varianta nejasného významu
15	chr1	q21.2	Loss	benigní
	chr6	q22.1	Loss	benigní
16	chr5	q13.2	Loss	nález ověřit
	chr5	q35.1	Loss	malé aberace
	chr11	q13.4	Loss	varianta nejasného významu
	chr13	q34	Gain	varianta nejasného významu
	chr15	q11.2	Loss	malé aberace

5.4 Statistické vyhodnocení dat array CGH

Statisticky jsem vyhodnocovala data array CGH získaná na oddělení OLG Thomayerovy nemocnice za období 10/18-3/19 (viz. příloha 1). Byla získána data od 69 pacientů. Do statistiky nejsou zahrnuty vzorky, ve kterých nebyly detekovány žádné CNV, jsou zpracovány pouze údaje od pacientů, u kterých byly prokázány změny v počtu kopií DNA.

Tab. 13: Počty detekovaných aberací

Kategorie aberace	Počet	Procento
Benigní	79	28,8%
Pravděpodobně benigní	97	35,4%
Varianta nejasného významu	52	19,0%
Pravděpodobně patogenní	8	2,9%
Patogenní	5	1,8%
Malé aberace	33	12,0%
Celkem	274	100%



Obrázek 10: Graf procentuálního rozložení detekovaných variant CNV

6. Diskuse

CNV jsou podle dostupné literatury řazeny do pěti kategorií: patogenní, pravděpodobně patogenní, varianta nejasného významu, pravděpodobně benigní a benigní. Pro potřeby této laboratoře byla zavedena ještě další kategorie – malé aberace. Je používána v případě, kdy se změna týká malého počtu bází a je lokalizována v intronové oblasti genu. Při hodnocení to nemá vliv na výsledek, který je vydáván pacientovi. Je identifikována spíše pro budoucí účely, pro další vyhodnocování čipů, pro případy, že by v oblasti, které jsou zasaženy, byly v budoucnu identifikovány nějaké geny.

V jednom případě se jednalo o vyšetření plodové vody, protože screeningové genetické testy krve matky v prvním trimestru ukázaly na riziko chromozomální aberace. Výsledky potvrdily výskyt aberace, která je podle současné dostupné literatury včetně databází hodnocena jako pravděpodobně benigní nebo varianta nejasného významu, která může být asociována s poruchami autistického spektra, hypotonií, poruchami motoriky, faciální dysmorfii, opožděným vývojem a poruchami učení. Uvádí se, že tato varianta bývá velmi často zděděná po jednom z rodičů

U patnácti pacientů byla jako vzorek použita periferní krev, jednalo se tedy o vyšetření jejich vlastního genomu. Z toho u deseti z nich byl důvodem vyšetření jejich patologický fenotypový projev. Vždy se jednalo o nějaké formy psychomotorické retardace, často v kombinaci s další vadou, např. stigmatizací, rozštěpem patra. V těchto případech šlo o děti různého stáří. U pacienta číslo 4 byla nalezena mikrolece oblasti 9q34.3 o velikosti 15 kb. Tento nález je podle současné dostupné literatury hodnocena jako pravděpodobně patogenní nebo patogenní. K fenotypovým projevům této delece patří PMR, hypotonie, obličejové abnormality a pulmonální stenóza.

Pět pacientů byli dospělí lidé. U dvou byl indikací k vyšetření patologický nález plodu. V tomto případě se zjišťuje, zda patologie plodu je získaná od jednoho z rodičů nebo jde o mutaci *de novo*. Toto zjištění je důležité pro prognózu další gravidity. U prvního pacienta byla detekována patologie, která může mít v pozdějším věku vliv na vznik karcinomu prostaty. Pacientka 13 podstoupila array CGH analýzu, protože u jejího syna byla nalezena mikroduplikace na chromozómu X. U ní byla detekována ta samá aberace, ale patologie se fenotypu neprojevila díky přítomnosti druhého chromozómu X. Pacienti 11 a 12 jsou rodiče dívky s PMR. V matčině genomu žádná aberace nalezena nebyla.

V otcově genomu byly nalezeny některé stejné změny jako u dívky, ale protože on sám je zdravý, pravděpodobně tyto aberace vliv na PMR nemají.

Za období 8/18 – 3/19 bylo vyšetřeno 97 pacientů, u kterých byl zjištěn výskyt chromozomálních abnormalit. Celkem bylo nalezeno 274 aberací. Detekováno bylo 1,8% jasně patogenních CNV, 2,9% pravděpodobně patogenních CNV a 19% variant nejasného významu. Zbýlých 76,3% řadíme do kategorií, které nemají vliv na klinický stav pacienta.

7. Závěr

Metoda array CGH se používá ve stále větším rozsahu. Lze ji považovat za perspektivní a kvalitní metodu. Jsou pro ni vytvořeny interpretační programy umožňující standardizovanou analýzu dat získaných array CGH. Obsah databází používaných k interpretaci nálezů je dále rozšiřován a aktualizován.

Díky této metodě je možná detekce submikroskopických aberací, která často přispívá k objasnění příčin klinických abnormalit u pacientů a umožňuje tak propojit genotyp s fenotypem.

Používá se u pacientů, u kterých byl klasickými cytogenetickými nebo i jinými molekulárně-genetickými metodami stanoven normální genetický profil a přesto se v jejich fenotypu projevují abnormality. Slouží také k upřesnění nálezu z předešlých vyšetření. Často se používá k upřesnění rodinné anamnézy zdravých rodičů s patologiemi u potomků nebo plodu. Posouvá tak cytogenetickou diagnostiku na molekulární úroveň.

8. Seznam literatury

1. BAHAMAT, A., LARY, S. A., PEER ZADA, A. A., AL-QAHTANI, M. H., 2014. The evaluation of DiGeorge syndrome gene deletion using molecular cytogenetic techniques. *BMC Genomics* [online]. **15**(S2) [cit. 2018-12-01]. DOI: 10.1186/1471-2164-15-S2-P30. Dostupné z: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-S2-P30>
2. BANERJEE, D., SHAH, P. S., 2013. *Array comparative genomic hybridization: protocols and applications*. New York: Humana Press, 382 s. ISBN 1627032800.
3. CALDA, P., 2007. *Ultrazvuková diagnostika v těhotenství: pro praxi*. Praha: Profema. 500 s. ISBN 978-80-903706-1-6.
4. CLARK, M., WALL, W. J., 1996. *Chromosomes: the complex code*. London: Chapman & Hall. 356 s. ISBN 0-412-55530-1.
5. DAWSON, AJ., PUTNAM, S., SCHULTZ, J. et al., 2002. Cryptic chromosome rearrangements detected by subtelomere assay in patients with mental retardation and dysmorphic features. *Clinical Genetics* [online]. **62**(6), 488-494 [cit. 2019-02-10]. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2002.tb02255.x.
6. DRÁBOVÁ, J., 2017. *Detekce a stanovení rozsahu nebalancovaných chromozomových aberací metodou aCGH u pacientů s mentální retardací a vrozenými vývojovými vadami*. Praha. Dizertační práce. 2.LF UK
7. FIRTH, H. V., RICHARDS, S. M., BEVAN, A. P. et al., 2009. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *The American Journal of Human Genetics* [online]. **84**(4), 524-533 [cit. 2019-03-02]. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.03.010. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929709001074>
8. FRIEDMAN, J. M., BAROSS, A., DELANEY, A. D. et al., 2006. Oligonucleotide Microarray Analysis of Genomic Imbalance in Children with Mental Retardation. *The American Journal of Human Genetics* [online]. **79**(3), 500-513 [cit. 2019-02-09]. DOI: 10.1086/507471. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707627499>
9. HÁJEK, Z., MACEK, M., KULOVANÝ, E., 2000. *Základy prenatální diagnostiky*. Praha: Grada. 423 s. ISBN 80-7169-391-X.

10. HARRIS, J. C., 2006. *Intellectual disability: understanding its development, causes, classification, evaluation, and treatment*. New York: Oxford University Press. 448 s. ISBN 9780195178852.
11. HUARTE, N., GARCÍA-GUERETA, L. and LAPUNZINA, P., 2013. Williams-Beuren syndrome: Usual face, unusual heart. *Open Journal of Genetics* [online]. **03**(01), 79-81 [cit. 2018-12-09]. DOI: 10.4236/ojgen.2013.31009. Dostupné z: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?>
12. HURD, D., 2010. Delving Deep Into the Genetic Basis of Disease. *Americal Biotechnology Laboratory* [online]. **28**(3) [cit. 2018-12-09]. Dostupné z: https://www.ogt.com/assets/0000/1747/PR_ABL_Delving_Deep_into_Genetic_Disease_Low_Res_010310.pdf
13. KEARNEY, H. M., THORLAND, E. C., BROWN, K. K., QUINTERO-RIVERA F., SOUTH S. T., 2011. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genetics in Medicine* [online]. **13**(7), 680-685 [cit. 2019-02-07]. DOI: 10.1097/GIM.0b013e3182217a3a. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1097/GIM.0b013e3182217a3a>
14. KOČÁREK, E., PÁNEK, M. a NOVOTNÁ, D., 2010. *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 2., upr. vyd. Praha: Karolinum. 134 s. ISBN 978-80-246-1880-7.
15. MACDONALD, J. R., ZIMAN, R., YUEN, R. K. C., FEUK, L., SCHERER, S. W., 2013. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Research* [online]. **42**(D1), D986-D992 [cit. 2018-12-27]. DOI: 10.1093/nar/gkt958. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkt958>
16. MADRIGAL, I., RODRÍGUEZ-REVENGA, L., ARMENGOL, L. et al., 2007. X-chromosome tiling path array detection of copy number variants in patients with chromosome X-linked mental retardation. *BMC Genomics* [online]. **8**(1) [cit. 2019-01-08]. DOI: 10.1186/1471-2164-8-443. Dostupné z: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-8-443>
17. MAULIK, P. K., MASCARENHAS, M. N., MATHERS, C. D., DUA, T., SAXENA, S., 2011. Prevalence of intellectual disability: A meta-analysis of population-based studies. *Research in Developmental Disabilities* [online]. **32**(2),

- 419-436 [cit. 2019-03-22]. DOI: 10.1016/j.ridd.2010.12.018. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891422210003082>
18. MICHALOVÁ, K., 1999. *Úvod do lidské cytogenetiky*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. 172 s. ISBN 80-7013-281-7.
19. MILLER, D. T., ADAM, M. P., ARADHYA, S. 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* [online]. **86**(5), 749-764 [cit. 2019-03-09]. DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.04.006. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929710002089>
20. OTOVÁ, B., KOHOUTOVÁ, M., 2014. *Lékařská biologie a genetika*. 2., nezměněné vydání. Praha: Karolinum. 124 s. ISBN 978-80-246-2835-6.
21. Příručka pro genomickou analýzu metodou microarray-CGH pro formát 8x60k od firmy Agilent Technologies (verze protokolu 7.4, platná od srpna 2015).
22. Příručka pro izolaci DNA kitem *QIAmp DNA Blood Mini Kit*, 2010.
23. RAUCH, A., HOYER, J., GUTH S., et al. 2006. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *American Journal of Medical Genetics Part A* [online]. **140A**(19), 2063-2074 [cit. 2019-02-22]. DOI: 10.1002/ajmg.a.31416. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.a.31416>
24. RAYMOND, F. L., 2005. X linked mental retardation: a clinical guide. *Journal of Medical Genetics* [online]. **43**(3), 193-200 [cit. 2019-03-09]. DOI: 10.1136/jmg.2005.033043. Dostupné z: <http://jmg.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jmg.2005.033043>
25. RIGGS, E. R., CHURCH, D. M., HANSON, K. et al., 2012. Towards an evidence-based process for the clinical interpretation of copy number variation. *Clinical Genetics* [online]. **81**(5), 403-412 [cit. 2019-01-21]. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2011.01818.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-0004.2011.01818.x>
26. SHAFFER, L. G., MCGOWAN-JORDAN, J., SCHMID, M., 2013. *ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature (2013)*. Basel: Karger. 140 s. ISBN 9783318022537.
27. SIMONS, A., SHAFFER, L. G., HASTINGS, R. J., 2013. Cytogenetic Nomenclature: Changes in the ISCN 2013 Compared to the 2009 Edition.

- Cytogenetic and Genome Research* [online]. **141**(1), 1-6 [cit. 2019-02-01]. DOI: 10.1159/000353118. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/353118>
28. ŠLÉGROVÁ S., 2016. Detekce submikroskopických aberací metodou array-CGH. Brno. Atestační práce. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských oborů.
29. TARPEY, P. S., SMITH, R., PLEASANCE, E. et al., 2009. A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nature Genetics* [online]. **41**(5), 535-543 [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1038/ng.367. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ng.367>
30. WEISE, A., MRASEK, K., KLEIN, E. et al., 2012. Microdeletion and Microduplication Syndromes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* [online]. **60**(5), 346-358 [cit. 2019-01-09]. DOI: 10.1369/0022155412440001. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1369/0022155412440001>

9. Seznam příloh

Příloha 1: Data získaná array CGH

Číslo pacienta	Chromozóm	Lokalita	Typ aberace	Hodnocení
1	chr1	p36.13	Loss	pravděpodobně benigní
	chr1	q21.2	Loss	pravděpodobně benigní
	chr4	p16.3	Gain	benigní
2	chr12	p13.31	Loss	benigní
3	chr14	q11.2	Loss	benigní
4	chr14	q32.33	Loss	pravděpodobně benigní
5	chr22	q12.2	Loss	pravděpodobně benigní
6	chr5	q13.2	Loss	pravděpodobně patogenní
	chr17	q25.3	Loss	pravděpodobně benigní
7	chr14	q11.2	Loss	benigní
8	chr6	q16.1	Loss	pravděpodobně benigní
	chr10	q11.22	Loss	benigní
	chrX	p22.33	Deletion	pravděpodobně benigní
	chrX	p22.32	Deletion	pravděpodobně benigní
	chrY	p11.32	Deletion	pravděpodobně benigní
9	chr12	q21.32	Deletion	pravděpodobně benigní
	chr17	q21.31	Gain	benigní
	chr22	q12.2	Loss	pravděpodobně benigní
	chr15	q11.2	Gain	benigní
10	chr14	q32.33	Loss	pravděpodobně benigní
11	chr7	q11.21	Loss	benigní
	chr16	p11.2 - p11.1	Gain	pravděpodobně benigní
12	chr7	q11.21	Loss	benigní
13	chr14	q32.33	Loss	pravděpodobně benigní
	chr15	q13.1	Loss	pravděpodobně benigní
14	chr17	p13.3	Deletion	pravděpodobně benigní
	chrX	q27.2	Loss	pravděpodobně benigní
15	chr1	q25.3 - q31.1	Deletion	patogenní
	chr14	q32.33	Loss	pravděpodobně benigní
	chr22	q11.21	Loss	patogenní
16	chr1	q31.3	Loss	pravděpodobně patogenní
	chr6	p25.3	Gain	pravděpodobně benigní
	chr14	q32.33	Loss	pravděpodobně benigní
	chr21	q21.1	Loss	benigní
17	chr1	p36.13	Loss	benigní
18	chr2	q31.1	Gain	pravděpodobně benigní
	chr4	q25	Gain	pravděpodobně benigní
	chr7	p21.1	Gain	pravděpodobně benigní

	chr7 chr11 chr11 chr15 chr20 chrX	q34 p15.5 q13.2 q11.2 q13.32 q23	Loss Loss Deletion Gain Gain Gain	pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní
18	chr6 chr9 chr14	p21.1 p24.3 q11.2	Gain Gain Loss	varianta nejasného významu varianta nejasného významu benigní
19	chr1 chr14 chrX	q21.2 q32.33 p11.23	Loss Loss Loss	benigní pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní
20	chr14	q32.33	Loss	benigní
21	chr2 chr5 chr6 chr8 chr10 chr15 chrX	q31.1 q13.2 q16.3 p11.1 p15.1 q11.2 p11.22	Gain Loss Gain Gain Loss Loss Gain	benigní pravděpodobně patogenní pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní
22	chr1 chr7 chr14 chr22	p35.1 - p34.3 q34 q11.2 q12.2	Loss Loss Loss Loss	pravděpodobně patogenní pravděpodobně benigní benigní pravděpodobně benigní
23	chr8 chr14 chr15	p11.1 q32.33 q11.2	Loss Loss Loss	varianta nejasného významu pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní
24	chrX	p22.32 - p22.31	Gain	patogenní
25	chr2 chr6 chr17 chr15 chr16 chr14	q37.3 p25.3 q21.31 q24.1 p13.3 q11.2	Loss Loss Loss Gain Gain Loss	pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní varianta nejasného významu pravděpodobně benigní benigní
26	chr1 chr14 chrX	q31.1 q11.2 p13.32	Gain Gain Gain	pravděpodobně benigní benigní benigní
27	chr17 chr19 chrX chrX	q31.1 q11.2 p21.2 q11.21	Gain Gain Gain Gain	pravděpodobně benigní benigní pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní
28	chr2 chr6 chr7 chr15	q31.1 p25.3 p21.1 q11.2	Gain Gain Gain Gain	pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní

	chr22 chrX	q11.22 p11.23	Amplification Loss	pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní
29	chr3 chr19	p26.3 q13.2 - q13.31	Loss Gain	pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní
30	chr17 chr19 chrX chrX	q24.3 q13.43 p11.22 p11.22	Gain Gain Gain Loss	benigní pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní
31	chr5 chr17 chr18 chr20 chrX	q35.2 q24.3 p11.32 p11.21 - p11.1 p11.23	Amplification Gain Deletion Gain Gain	pravděpodobně benigní benigní pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní benigní
32	chr2 chr4 chr7 chr11 chr15 chr20	q31.1 q25 p21.1 p15.5 q11.2 q13.32	Gain Gain Gain Loss Gain Gain	pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní
33	chr10 chrX	q11.22 p22.32	Loss Deletion	pravděpodobně benigní varianta nejasného významu
34	chr2 chr2 chr4 chr4	p24.3 q31.1 q11 q11	Loss Gain Loss Loss	malé aberace pravděpodobně benigní malé aberace malé aberace
35	chr2 chr2 chr13 chr16	p16.2 - p16.1 p11.2 - p11.1 q14.2 p13.12 - p13.11	Loss Loss Loss Loss	varianta nejasného významu varianta nejasného významu varianta nejasného významu pravděpodobně patogenní
36	chr2 chr2 chr13 chr16 chr17 chrY	p16.2 - p16.1 p11.2 - p11.1 q14.2 p13.12 - p13.11 q21.31 q11.222	Loss Loss Loss Loss Gain Gain	varianta nejasného významu varianta nejasného významu varianta nejasného významu pravděpodobně patogenní pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní
37	chr1 chr10 chr16	p21.1 q26.3 q23.1	Loss Gain Gain	varianta nejasného významu benigní varianta nejasného významu
38	chr7 chr10 chrX	q11.23 q25.2 q21.31	Gain Loss Gain	pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní pravděpodobně benigní
39	chr7 chr16 chr17	p21.1 p11.2 - p11.1 q21.31	Gain Gain Loss	benigní benigní pravděpodobně benigní
40	chr14	q32.33	Loss	varianta nejasného významu

41	chr5	p15.33	Loss	pravděpodobně benigní
	chr5	p15.33	Loss	benigní
	chr7	q34	Loss	pravděpodobně benigní
	chr8	p23.3	Gain	pravděpodobně benigní
	chr9	q34.3	Loss	pravděpodobně patogenní
	chr10	p15.1	Loss	pravděpodobně benigní
	chr15	q11.2	Gain	pravděpodobně benigní
	chr17	q21.31	Gain	pravděpodobně benigní
42	chr6	p25.3	Gain	benigní
	chr8	p23.1	Loss	benigní
	chr10	q23.1	Gain	pravděpodobně benigní
	chr15	q11.2	Loss	varianta nejasného významu
	chr16	p11.2 - p11.1	Gain	pravděpodobně benigní
	chr17	q21.31	Loss	pravděpodobně benigní
43	chr3	p26.3	Deletion	varianta nejasného významu
	chr9	p23	Loss	varianta nejasného významu
44	chr1	q21.2	Loss	pravděpodobně benigní
	chr2	q34	Gain	varianta nejasného významu
	chr4	p16.3	Gain	benigní
	chr5	q33.1	Gain	pravděpodobně benigní
	chr6	p25.3	Loss	benigní
	chr8	p23.1	Loss	benigní
	chr14	q11.2	Loss	pravděpodobně benigní
	chr17	q21.31	Loss	pravděpodobně benigní
45	chr2	q13	Gain	varianta nejasného významu
	chr6	p25.3	Loss	benigní
46	chr3	p26.3	Gain	varianta nejasného významu
	chr3	q13.11	Loss	varianta nejasného významu
	chr4	q21.1	Gain	varianta nejasného významu
	chr4	q28.3	Gain	pravděpodobně benigní
	chr4	q32.1	Gain	varianta nejasného významu
	chr6	q22.31	Gain	varianta nejasného významu
	chr7	q11.21	Loss	benigní
	chr11	p15.4	Loss	benigní
	chr11	q22.1	Gain	varianta nejasného významu
	chr13	q21.1	Gain	benigní
	chr14	q32.33	Gain	varianta nejasného významu
	chrX	p22.33 - p22.32	Gain	benigní
	chrX	p21.1	Gain	varianta nejasného významu
47	chr5	q13.2	Loss	nález ověřit
48	chr2	q13	Gain	varianta nejasného významu
	chr7	p22.3	Deletion	varianta nejasného významu
	chr15	q11.2	Gain	benigní
49	chr10	q11.22	Loss	benigní
	chr16	p13.11	Loss	pravděpodobně patogenní

	chr16	p11.2 - p11.1	Gain	pravděpodobně benigní
50	chr1	q42.2	Gain	pravděpodobně benigní
	chr5	q21.3	Gain	malé aberace
	chr10	q11.22	Loss	benigní
	chr22	q11.21	Loss	malé aberace
51	chr7	q34	Loss	benigní
	chr14	q11.2	Loss	benigní
	chr16	p11.2 - p11.1	Gain	benigní
	chr17	q11.2	Loss	patogenní
52	chr2	q24.2	Loss	malé aberace
	chr4	q34.1	Gain	pravděpodobně benigní
	chrY	q11.222	Gain	malé aberace
53	chr4	p16.3	Gain	pravděpodobně benigní
54	chr4	q25	Gain	malé aberace
	chr7	q34	Loss	pravděpodobně benigní
	chr8	p23.1	Gain	benigní
	chr10	q26.3	Gain	benigní
	chr11	q13.2	Loss	malé aberace
	chr11	q25	Gain	benigní
	chr14	q11.2	Loss	pravděpodobně benigní
	chr15	q15.3	Gain	malé aberace
55	chr2	q31.1	Gain	benigní, malé aberace
	chr4	p16.3	Gain	benigní
	chr4	q13.1	Gain	varianta nejasného významu
	chr4	q28.3	Loss	benigní
	chr8	p23.1	Gain	benigní
	chr8	p11.1	Loss	benigní, malé aberace
	chr15	q13.1	Loss	malé aberace
	chr20	p11.21 - p11.1	Gain	varianta nejasného významu
	chr21	q21.1	Loss	benigní
chrX	p11.23	Loss	benigní, malé aberace	
56	chr2	q31.1	Gain	benigní, malé aberace
	chr6	q24.2	Loss	malé aberace
	chr7	p21.1	Loss	malé aberace
	chrX	p11.23	Loss	benigní, malé aberace
57	chr2	q13	Gain	benigní
	chr2	q36.1	Gain	varianta nejasného významu
	chr4	q35.2	Gain	malé aberace
	chr7	p22.3	Deletion	malé aberace
	chr9	q33.1	Gain	varianta nejasného významu
	chr13	q32.3	Loss	varianta nejasného významu
	chr15	q11.2	Gain	benigní
	chr21	q21.1	Loss	benigní
chrX	p22.33	Gain	malé aberace	
chrX	p22.33	Loss	malé aberace	

	chrX	p22.33	Loss	malé aberace
	chrX	p22.31	Loss	varianta nejasného významu
	chrX	p22.2	Loss	malé aberace
	chrX	q21.1	Loss	malé aberace
58	chr5	q13.2	Loss	nález ověřit
	chr16	p11.1	Gain	malé aberace
	chrX	q22.3	Gain	malé aberace
	chrX	q24	Gain	malé aberace
59	chr17	q24.1 - q25.3	Gain	patogenní
60	chr2	q32.3	Loss	varianta nejasného významu
	chr2	q37.3	Loss	benigní
	chr6	p25.3	Loss	benigní
61	chr3	p26.3	Gain	varianta nejasného významu
	chr3	q13.11	Loss	varianta nejasného významu
	chr4	q21.1	Gain	varianta nejasného významu
	chr4	q28.3	Gain	pravděpodobně benigní
	chr4	q32.1	Gain	varianta nejasného významu
	chr6	q22.31	Gain	varianta nejasného významu
	chr7	q11.21	Loss	benigní
	chr8	q13.3	Gain	malé aberace
	chr11	p15.4	Loss	benigní
	chr11	q22.1	Gain	varianta nejasného významu
	chr13	q21.1	Gain	benigní
	chr14	q32.33	Gain	varianta nejasného významu
	chrX	p22.33 - p22.32	Gain	benigní
	chrX	p22.11	Gain	malé aberace
chrX	p21.1	Gain	varianta nejasného významu	
62	chr4	q32.1	Gain	varianta nejasného významu
63	chr10	q26.3	Gain	benigní
	chr13	q12.11	Gain	benigní
	chr17	p11.2	Gain	benigní
	chr22	q12.2	Loss	varianta nejasného významu
64	chr3	q29	Loss	malé aberace
	chr17	q21.31	Loss	benigní
65	chr1	q21.2	Gain	malé aberace
	chr1	q32.2	Gain	malé aberace
	chr2	q31.1	Gain	malé aberace
	chr2	q31.1	Gain	malé aberace
	chr4	p16.3	Gain	malé aberace
	chr4	q26	Loss	benigní
	chr5	p13.3	Gain	benigní
	chr6	p25.3	Loss	benigní
	chr16	p13.11	Deletion	varianta nejasného významu
	chrX	p11.23	Gain	benigní
	chrX	q27.1	Gain	benigní

	chrX	q28	Gain	benigní
66	chr22	q11.21	Loss	benigní
	chrX	p22.32 - p22.31	Gain	varianta nejasného významu
67	chr2	q13	Loss	nález ověřit
	chr4	p16.1	Gain	benigní
	chr10	p12.1	Loss	varianta nejasného významu
	chr17	q21.31	Loss	benigní
	chrX	p22.31	Gain	varianta nejasného významu
68	chr1	q21.2	Loss	benigní
	chr6	q22.1	Loss	benigní
69	chr5	q13.2	Loss	nález ověřit
	chr5	q35.1	Loss	malé aberace
	chr11	q13.4	Loss	varianta nejasného významu
	chr13	q34	Gain	varianta nejasného významu
	chr15	q11.2	Loss	malé aberace

10. Seznam použitých zkratk

Array-CGH – Array-Comparative genomic hybridization (komparativní genomová hybridizace na čípech)

CNV – copy number variation (varianty v počtu kopií)

CRA – Chromosome Resolution Additive (přísada pro vyšší rozlišení chromozomů)

Cy3 – Cyanin 3

Cy5 – Cyanin 5

DECIPHER – Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Human using Ensembl Resources

DGV – Database of Genomic Variants

EDTA – kyselina etylendiamintetraoctová

FISH – Fluorescence in situ hybridization (Fluorescenční *in situ* hybridizace)

ISCA Konsorcium – The international Standards for Cytogenomic Arrays Consortium (mezinárodních standardů pro cytogenomické čipy)

ISCN – An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (Mezinárodní systém lidské cytogenetické nomenklatury)

LMD – lehká mozková dysfunkce

NT – Nuchální Translucence (šíjové projasnění)

OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man

PBS – fosfátový pufr

PMR – psychomotorická retardace

SD – Standard Deviation (standardní odchylka)

TAR – Telomere Associated Repeats (repetitivní sekvence asociované s telomerickými oblastmi chromozomů)

TE pufr – Tris/EDTA pufr