

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2024.11.34-39>

Создание собственных несерийных ДНК-зондов для выявления рекуррентной анеуплоидии по хромосоме 12 в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках человека методом FISH

Гумерова Л.И.¹, Жегло Д.Г.¹, Пожитнова В.О.¹, Свиридов Ф.С.¹, Кислова А.В.¹, Свиридова В.В.¹, Киселев Д.С.¹, Мингалёва Н.С.^{2,3}, Алсаллум А.^{2,3}, Горносталя Е.А.^{2,3}, Воронина Е.С.¹

1 – ФГБНУ Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1

2 – Московский физико-технический институт
141700, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский переулок, д. 9

3 – Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий
125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8

Введение. Спонтанные хромосомные aberrации в линиях индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) обнаруживаются с частотой около 20%, что препятствует их дальнейшему использованию в исследовательских и медицинских целях. Одним из наиболее рациональных подходов к рутинному контролю генетической стабильности иПСК является таргетное выявление рекуррентных аномалий кариотипа, 20-60% которых может составлять трисомия по хромосоме 12. Трисомия 12 приводит к нарушению способности к дифференцировке, динамики репликации и сопровождается быстрым вытеснением эуплоидного клона. **Цель.** Разработка протокола получения флуоресцентных ДНК-зондов, специфичных к перичентромерным повторам хромосомы 12, для выявления анеуплоидии методом FISH.

Результаты. Разработан двухстадийный протокол получения ДНК-зондов на основе ПЦР с геномной ДНК в качестве матрицы с последующим клик-химическим прямым мечением флуорохромом. На линиях иПСК с известными эуплоидным и анеуплоидным кариотипами отработаны условия гибридизации и подтверждена эффективность и специфичность выявления хромосомы 12 на метафазных пластинках и в интерфазных ядрах.

Выводы. FISH с собственными несерийными ДНК-зондами повышает доступность исследования копийности хромосомы 12 в иПСК, что способствует своевременному выявлению функционально значимых генетических нарушений в клеточных линиях.

Ключевые слова: FISH, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, иПСК, хромосома 12, центромера, анеуплоидия.

Для цитирования: Гумерова Л.И., Жегло Д.Г., Пожитнова В.О., Свиридов Ф.С., Кислова А.В., Свиридова В.В., Киселев Д.С., Мингалёва Н.С., Алсаллум А., Горносталя Е.А., Воронина Е.С. Создание собственных несерийных ДНК-зондов для выявления рекуррентной анеуплоидии по хромосоме 12 в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках человека методом FISH. *Медицинская генетика* 2024; 23(11): 34-39.

Автор для корреспонденции: Воронина Е.С.; e-mail: vekats@inbox.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ МГНЦ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 19.11.2024

Detection of recurrent chromosome 12 aneuploidy in human induced pluripotent stem cells using FISH with custom centromeric DNA-probes

Gumerova L.I.¹, Zheglo D.G.¹, Pozhitnova V.O.¹, Sviridov P.S.¹, Kislova A.V.¹, Sviridova V.V.¹, Kiselev D.S.¹, Mingaleva N.C.^{2,3}, Alsalloom A.^{2,3}, Gornostal E.A.^{2,3}, Voronina E.S.¹

1 – Research Centre for Medical Genetics
1, Moskvorechye st., Moscow, 115522, Russian Federation

2 – Moscow Institute of Physics and Technology
9, Institutsky lane, Dolgoprudny, Moscow region, 141700, Russian Federation

3 – Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies
8, Baltiyskaya st., Moscow, 125315, Russian Federation

Background. Approximately 20% of induced pluripotent stem cell (iPSC) lines spontaneously acquire chromosomal abnormalities, which hinders their use in research and medical applications. One rational approach for routine monitoring of genetic stability in iPSCs is the targeted detection of recurrent karyotype anomalies, 20-60% of which may involve trisomy of chromosome 12. Trisomy 12 leads to impaired differentiation capacity and replication dynamics and is associated with the rapid displacement of the euploid clone.

Aim. To develop a protocol for the production of fluorescent DNA probes for the detection of chromosome 12 aneuploidy.

Results. A two-stage protocol for obtaining DNA probes based on PCR, using genomic DNA as the template, has been developed, followed by direct click-labeling with a fluorochrome. Hybridization conditions have been optimized for iPSC lines with known euploid and aneuploid karyotypes, confirming the effectiveness and specificity of detecting chromosome 12 on metaphase spreads and in interphase nuclei.

Conclusions. FISH using custom DNA probes enhances the availability of chromosome 12 copy number analysis in laboratories, facilitating the timely detection of functionally significant genetic abnormalities in cell lines

Keywords: FISH, induced pluripotent stem cells, iPSC, chromosome 12, centromere, aneuploidy.

For citation: Gumerova L.I., Zheglo D.G., Pozhitnova V.O., Sviridov P.S., Kislova A.V., Sviridova V.V., Kiselev D.S., Mingaleva N.C., Alsalloum A., Gornostal E.A., Voronina E.S. Detection of recurrent chromosome 12 aneuploidy in human induced pluripotent stem cells using FISH with custom centromeric DNA-probes. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2024; 23(11): 34-39. (In Russian)

Corresponding author: Voronina E.S.; **e-mail:** vekats@inbox.ru

Funding. The work was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of Russia for the Research Centre for Medical Genetics.

Conflict of Interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 19.11.2024

Введение

Митотическая нестабильность является одним из фундаментальных свойств плюрипотентного состояния клеток [1, 2]. Частота спонтанного возникновения хромосомных aberrаций в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (иПСК) по разным оценкам может достигать 20-80% линий в зависимости от условий и продолжительности культивирования [3,4], а скорость вытеснения euploidного клона аномальным может измеряться несколькими пассажами [5]. В связи с этим генетический анализ иПСК рекомендуют проводить через каждые 10 пассажей [6-8].

Наиболее изученными и распространенными генетическими аномалиями иПСК на данный момент считаются крупные хромосомные aberrации и мутации, ассоциированные с онкогенезом. Некоторые анеуплоидии, возникшие *in vitro* или изначально присутствовавшие в репрограммируемых клетках, подвергаются спонтанной коррекции кариотипа, тогда как частичные или полные трисомии по хромосомам 1, 8, 12, 17, 20 и X, а также моносомии по хромосомам 10 и 18 способствуют лучшей адаптации клеток к культивированию, приводят к сохранению и доминированию аномального клона и выявляются как рекуррентные аномалии в культурах иПСК [6].

Трисомия по хромосоме 12 считается самой распространенной анеуплоидией в иПСК, а также характерна для эмбриональных плюрипотентных стволовых клеток, эмбриональной карциномы и герминогенного рака яичка. Относительная частота этой aberrации в линиях иПСК может достигать 64% от всех анома-

лий кариотипа, но в последние годы отмечено снижение доли трисомии 12 до 19-25% [4]. На хромосоме 12 расположены гены *NANOG*, *DPPA3* и *GDF3*, ассоциированные с плюрипотентностью, а также онкоген *KRAS* и регулятор клеточного цикла *CCND2*. Трисомия 12 и связанные с ней изменения транскриптома нарушают способность клеток к дифференцировке в мезенхимном направлении, чувствительность к апоптозу и противоопухолевым препаратам, а также способствуют дальнейшему накоплению мутаций [5, 9-12].

Для рутинного выявления рекуррентных анеуплоидий в иПСК, а также для уточнения результатов кариотипирования применяется метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Дополнительными преимуществами метода являются возможность анализа интерфазных ядер и учета большего числа клеток, а также меньшая зависимость результата исследования от квалификации исполнителя по сравнению с кариотипированием. Целью исследования было получение собственных центромер-специфичных ДНК-зондов для анализа копийности хромосомы 12 в иПСК. Особенностью разработанного протокола является простота выполнения и общедоступность реагентов.

Материалы и методы

Культивирование иПСК

Клетки, предназначенные для кариотипирования, культивировали в шестилуночных планшетах, покрытых матригелем IPS-Verified Star Matrigengel (ABW, Китай) в среде TeSR-E8 (StemCell Technologies Inc.) в инкубаторе с 5% CO₂ при 37° и ежедневной смене среды. При достижении 30-40% конфлюентности клетки син-

хронизировали истощением среды в течение одних дополнительных суток и внесением свежей порции среды за 24 часа до фиксации.

Получение цитогенетических препаратов

Клетки останавливали в митозе добавлением 0,1 мкг/мл демеколцина в течение 40–60 мин. (Sigma-Aldrich, США), снимали трипсинизацией, осаждали и проводили гипотоническую обработку 0,55% KCl при 37°C в течение 14 минут, фиксировали по 10 минут в трех сменах охлажденного метанола/ледяной уксусной кислоты 3:1. Полученные суспензии клеток наносили на охлажденные предметные стекла и высушивали.

Кариотипирование методом

G-подобного окрашивания

Дифференциальное G-окрашивание хромосом проводили с помощью DAPI с контрастированием актиномицином D, заключали в фотозащитную среду Glycerol Mounting Medium – Anti-Fade with DAPI (Abcam, Великобритания).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Для получения фрагментов центромерных повторов, специфичных для хромосомы 12, были использованы ранее опубликованные праймеры к повтору D12Z3 (F:GATGAAGGAGTTTGGAGACACT; R:CTGTCTGAACATTACAGGAAGAAATC) [13]. Амплификация проводилась с использованием набора БиоМастер LR HS-ПЦР (2x) (Biolabmix, Россия) с добавлением в ПЦР-смесь 0,2 мМ аминок-11-dUTP (Люмипроб, Россия) на амплификаторе Eppendorf при режиме: денатурация 94° 5 мин., 25 циклов: 94° 20 сек., 60° 20 сек., 68° 45 сек. и финальная элонгация при 68° 4 мин. Для предсказания специфичности амплификации и возможных сайтов отжига полученного ампликона использовали он-лайн ресурсы *In-Silico* PCR и Blat геномного браузера UCSC, сборка T2T CHM13v2.0/hs1.

Амплификат оценивали методом электрофореза в 1% агарозном геле и осаждали в этаноле.

Флуоресцентное мечение

амино-11-ДНК ампликонов

Протокол клик-химического мечения основан на ранее опубликованном исследовании [14] с модификациями. Амплификат аминок-11-ДНК растворяли в 0,1 М NaHCO₃ pH 8,3–8,5 и вносили 1,5 мкл 20 мМ AF488-NHS эфира (Люмипроб, Россия) на 1 час при комнатной температуре, далее осаждали этанолом и растворяли в воде.

FISH

Препараты метафазных хромосом выдерживали 5 мин. в 2xSSC (0,3 М NaCl, 0,03 М NaCitate, pH 7,0) при 37°, проводили предобработку пепсином в 0,01 М HCl 5 мин. при 37°. Стекла инкубировали в фосфатно-солевом буфере (PBS) комнатной температуры 3 мин. и в растворе PBS с 50 мМ MgCl₂ 5 мин. Предфиксацию формалином (1% формалин в PBS/50 мМ MgCl₂) проводили при комнатной температуре в течение 10 мин., затем промывали в 2xSSC и в ddH₂O и дегидратировали в этаноле по 2 мин. при каждой концентрации (70%, 80%, 96%). Зонд растворяли в гибридизационном буфере, содержащем 10% сульфата декстрана MW > 500 000 (Sigma), 2xSSC и 50% или 70% деионизированного формамида (Sigma). Проводили совместную денатурацию препарата и зонда в гибридайзере LFHS-A10, программа денатурации 7 мин. при 76° и гибридизации 42° в течение 18 ч. Постгибридизационная отмывка включала двухминутную инкубацию в 2xSSC при 70°, 1-минутную инкубацию в 2xSSC при комнатной температуре и промывку в ddH₂O. Препараты заключали в глицериновую фотозащитную среду с DAPI (Abcam), анализ проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Zeiss Axio Imager A2 при увеличении 1000x и 200x.

Результаты и обсуждение

Получение ДНК-зондов, специфичных к хромосоме 12

Центромеры человека образованы тандемными повторами 171 п.н. альфа-сателлитной ДНК, сложно организованными в повторы более высокого порядка, при этом высокая степень гомологии между центромерами разных хромосом затрудняет их дифференцирование при гибридизации. При получении ДНК-зондов на основе ПЦР в ряде случаев в качестве матрицы может быть использована геномная ДНК, например, опубликованы праймеры для получения зондов к центромерам хромосом 1, 3, 6, 7, 17, X [15], но большинство протоколов подразумевает использование в качестве основы для зондов или матрицы для ПЦР хромосом-специфичных библиотек (VAC-клоны, микродиссекция или сортирование хромосом, клеточные гибриды) [16, 17]. Это ограничивает возможности рутинного получения собственных зондов лабораториями, не обладающими соответствующими коллекциями библиотек или специализированным оборудованием для их получения.

Группе Contreras-Galindo с соавт. удалось подобрать уникальные ПЦР-праймеры к маркерным участкам центромер всех хромосом человека, кроме 19-й,

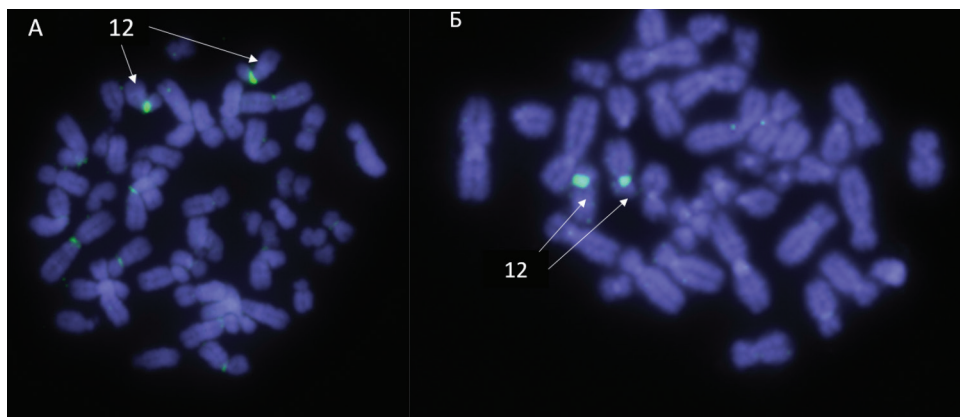


Рис. 1. Влияние концентрации формамида на специфичность гибридизации зонда. А. Гибридизация зонда на метафазных хромосомах при использовании буфера с 50% формамидом. Б. Гибридизационные сигналы на метафазных хромосомах при концентрации формамида 70%.

Fig. 1. Effect of formamide concentration on probe hybridization specificity. A. Probe hybridization on metaphase chromosomes using a buffer with 50% formamide. B. Hybridization signals on metaphase chromosomes at a formamide concentration of 70%.

предназначенные для изучения копийности повторов методом количественной ПЦР [13]. Для создания ДНК-зондов, специфичных к центromере хромосомы 12, мы провели классическую ПЦР на матрице геномной ДНК с праймерами к D12Z3, опубликованными этой группой, с получением продукта размером 785 п.н. Согласно UCSC *in silico* PCR (сборка T2T CHM13v2.0/hs1), ПЦР-продукт синтезируется исключительно с хромосомы 12, однако теоретически может отжигаться на гомологичные районы хромосом 7, 10, 5, 16, 19 (UCSC Blat).

Размер получаемого ПЦР-продукта позволяет использовать его в качестве зонда без предварительной фрагментации. Мечение фрагментов ДНК малого размера методом ник-трансляции нецелесообразно, поэтому включение метки проводили через введение в реакционную ПЦР-смесь модифицированного основания amino-11-dUTP. Далее проводили клик-реакцию очищенного ПЦР-фрагмента, содержащего аминогруппы, с активированным (NHS) эфиром

флуорохромов AF488 (зеленый спектр эмиссии) или AF594 (красный).

Амино-модификация аналога тимина не затрудняет его взаимодействие с полимеразой и обеспечивает высокую плотность включения его в состав ПЦР-продукта, неферментативная конъюгация зонда с флуорохромом повышает воспроизводимость и эффективность мечения. Таким образом, был создан ДНК-зонд на основе ампликонов с геномной ДНК в качестве матрицы, напрямую связанный с флуорохромом.

Подбор условий FISH для специфичной гибридизации зондов на центromере хромосомы 12

Для предотвращения кросс-гибридизации центromерных ДНК-зондов с нецелевыми хромосомами гибридизацию и отмывки проводят в жестких условиях. Мы использовали стандартный температурный режим (совместная денатурация препарата и зонда при 76° и гибридизация при 42°) и два варианта гибридизационного буфера, содержащего 50% и 70% формамида.

Таблица. Анализ числа копий хромосомы 12 в ИПСК с использованием собственных центromерных FISH-зондов.

Table. Chromosome 12 copy number analysis in iPSCs using custom centromeric DNA-probes.

линия	1 сигнал	2 сигнала	3 сигнала	n
Px 1-2 cl 12	54	671	296	1021
	5,28%	65,7%	28,99%	
МАК-F	39	586	16	641
	6,08%	91,42%	2,49%	

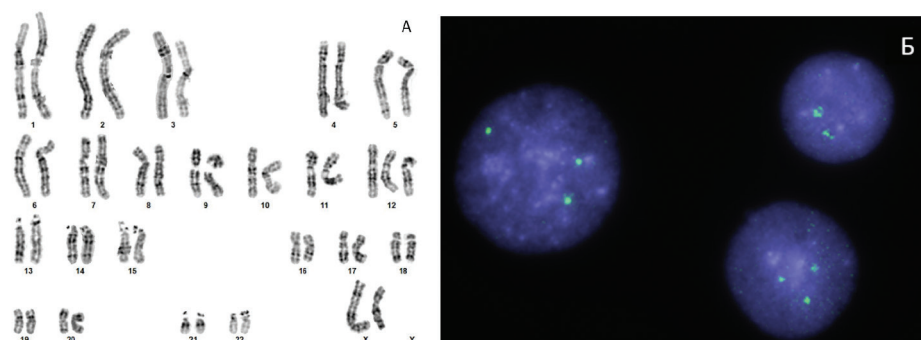


Рис. 2. Выявление анеуплоидного клона в линии iPСК PX 1-2 cl 12. А. Кариограмма аномального клона (47XX,+12) Б. Репрезентативное изображение сигналов FISH в интерфазных ядрах, получаемое при гибридизации с зондами, направленными к хромосоме 12.

Fig. 2. Detection of an aneuploid clone in the iPСК line PX 1-2 cl 12. А. Karyogram of the abnormal clone (47XX,+12) Б. Representative image of FISH signals in interphase nuclei obtained by hybridization with probes directed to chromosome 12.

Оба протокола позволили получить FISH-препараты удовлетворительного качества (рис. 1), но концентрация формамида 70% полностью подавляла неспецифическую гибридизацию без потери яркости сигналов хромосомы 12.

Исследование с помощью собственных ДНК-зондов копийности хромосомы 12 на линиях iPСК с известными эуплоидным и анеуплоидным кариотипами

Для изучения возможностей полученного зонда при оценке анеуплоидии по хромосоме 12 мы использовали две линии iPСК, кариотип которых был оценен методом G-окрашивания. По результатам кариотипирования в линии МАК-F все метафазные пластинки имели нормальный мужской кариотип, а в линии PX 1-2 cl 12 была обнаружена дополнительная хромосома 12 в 23,5% (4 из 17) метафазных пластинок (рис. 2А).

Результат FISH-анализа интерфазных ядер в двух линиях представлен в таблице. Частота выявленной моносомии составила 5-6% в обеих линиях, что согласуется с результатами, получаемыми при использовании серийных зондов [18] и, вероятно, отражает величину погрешности метода, связанную с неабсолютной эффективностью гибридизации или потерей части сигналов, расположенных на разном фокусном расстоянии в объеме ядра. Гибридизация с собственным ДНК-зондом позволила детектировать трисомию по хромосоме 12 в 29% интерфазных ядер линии PX 1-2 cl 12 (рис. 2Б), что свидетельствует об эффективности и высокой точности выявления аномального клона. Небольшая доля (2,5%) ядер с тремя сиг-

налами, выявленными в эуплоидной линии МАК-F, соответствует фоновому уровню анеуплоидий по аутосомам, регистрируемому различными исследователями в iPСК [19,20].

Заключение

Нами предложен простой протокол создания собственных ДНК-зондов для выявления центромер хромосомы 12, позволяющий в два этапа (за один день) получать высокоэффективные и специфичные зонды с использованием общедоступного лабораторного оборудования и реактивов. Продемонстрирована возможность применения собственных ДНК-зондов для выявления рекуррентной трисомии по хромосоме 12 в линиях iPСК.

Литература/ References

1. Deng C., Ya A., Compton D.A., Godek K.M. A pluripotent developmental state confers a low fidelity of chromosome segregation. *Stem Cell Reports*. 2023;18(2):475-488. doi: 10.1016/j.stemcr.2022.12.008.
2. Milagre I., Pereira C., Oliveira R.A. Compromised Mitotic Fidelity in Human Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2023 Jul 25;24(15):11933. doi: 10.3390/ijms241511933.
3. Al Delbany D., Ghosh M.S., Krivec N., et al. De Novo Cancer Mutations Frequently Associate with Recurrent Chromosomal Abnormalities during Long-Term Human Pluripotent Stem Cell Culture. *Cells*. 2024;13(16):1395. doi: 10.3390/cells13161395.
4. Stavish D., Price C.J., Gelezauskaitė G., et al. Feeder-free culture of human pluripotent stem cells drives MDM4-mediated gain of chromosome 1q. *Stem Cell Reports*. 2024;19(8):1217-1232. doi: 10.1016/j.stemcr.2024.06.003.
5. DuBose C.O., Daum J.R., Sansam C.L., Gorbosky GJ. Dynamic Features of Chromosomal Instability during Culture of Induced Pluripotent Stem Cells. *Genes (Basel)*. 2022;13(7):1157. doi: 10.3390/genes13071157.

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2024.11.34-39>

Medical genetics 2024. Vol. 23. Issue 11

6. Baker D., Hirst A.J., Gokhale P., et al. Detecting Genetic Mosaicism in Cultures of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2016;7(5):998-1012. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.10.003.
7. Ludwig T.E., Andrews P.W., Barbaric I., et al. ISSCR standards for the use of human stem cells in basic research. *Stem Cell Reports*. 2023;18(9):1744-1752. doi: 10.1016/j.stemcr.2023.08.003.
8. McIntire E., Taapken S., Leonhard K., Larson A.L. Genomic Stability Testing of Pluripotent Stem Cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2020 Mar;52(1):e107. doi: 10.1002/cpsc.107.
9. Ben-David U., Arad G., Weissbein U. et al. Aneuploidy induces profound changes in gene expression, proliferation and tumorigenicity of human pluripotent stem cells. *Nat Commun*. 2014; 5, 4825. Doi: 10.1038/ncomms5825.
10. Khademi N.S., Farivar S., Bazrgar M., et al. Aneuploidy Rate and Stemness in Low-Level Mosaic Human Embryonic Stem Cells in the Presence/Absence of Bortezomib, Paclitaxel, and Lapatinib. *Cells Tissues Organs*. 2024;213(1):17-23. doi: 10.1159/000526199.
11. Lamm N., Ben-David U., Golan-Lev T., et al. Genomic Instability in Human Pluripotent Stem Cells Arises from Replicative Stress and Chromosome Condensation Defects. *Cell Stem Cell*. 2016;18(2):253-61. doi: 10.1016/j.stem.2015.11.003.
12. Yanagihara K., Hayashi Y., Liu Y., et al. Trisomy 12 compromises the mesendodermal differentiation propensity of human pluripotent stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2024;60(5):521-534. doi: 10.1007/s11626-023-00824-9.
13. Contreras-Galindo R., Fischer S., Saha A.K. et al. Rapid molecular assays to study human centromere genomics. *Genome Res*. 2017;27(12):2040-2049. doi: 10.1101/gr.219709.116.
14. Sharma R., Meister P. Generation of Inexpensive, Highly Labeled Probes for Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). *STAR Protoc*. 2020;1(1):100006. doi: 10.1016/j.xpro.2019.100006.
15. Lengauer C., Dunham I., Featherstone T., Cremer T. Generation of alphoid DNA probes for fluorescence in situ hybridization (FISH) using the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol*. 1994; 33: 51-61. doi: 10.1385/0-89603-280-9:51. PMID: 7894592.
16. Zhigalina D.I., Skryabin N.A., Vasilieva O.Y. et al. FISH Diagnostics of Chromosomal Translocation with the Technology of Synthesis of Locus-Specific DNA Probes Based on Long-Range PCR. *Russ J Genet*. 2020; 56:739-746. <https://doi.org/10.1134/S1022795420060150>
17. Durm M., Haar F.M., Hausmann M., et al. Optimization of fast-fluorescence in situ hybridization with repetitive alpha-satellite probes. *Z Naturforsch C J Biosci*. 1996;51(3-4):253-61. doi: 10.1515/znc-1996-3-418.
18. Пожитнова В.О., Свиридова В.В., Кислова А.В., и др. Аномалии кариотипа в линиях индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных от российских доноров. *Медицинская генетика*. 2023;22(12):59-66. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.12.59-66>
19. Dekel-Naftali M., Aviram-Goldring A., Litmanovitch T., et al. Screening of human pluripotent stem cells using CGH and FISH reveals low-grade mosaic aneuploidy and a recurrent amplification of chromosome 1q. *Eur J Hum Genet*. 2012;20(12):1248-55. doi: 10.1038/ejhg.2012.128.
20. Peterson S.E., Westra J.W., Rehen S.K., et al. Normal human pluripotent stem cell lines exhibit pervasive mosaic aneuploidy. *PLoS One*. 2011;6(8):e23018. doi: 10.1371/journal.pone.0023018.