

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

Magistro darbas

**CHROMOSOMŲ STRUKTŪROS PERSITVARKYMŲ ĮVAIROVĖ LIETUVOJE IR
GENETINĖ JŲ REIKŠMĖ**

Magistrantė ŽIVILĖ ČIULADAITĖ

(parašas)

Darbo vadovas:
hab.dr., prof. V. Kučinskas

(parašas)

Konsultantas:
Vytautas Šliužas

(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja
hab. dr., prof. Z. Kučinskienė

leidžiama ginti

(parašas)

Darbo įteikimo data _____
Registracijos Nr. _____

TURINYS

SUTRUMPINIMŲ SARAŠAS	3
1. ĮVADAS.....	4
1.1. Darbo tikslas ir uždaviniai.....	5
2. LITERATŪROS APŽVALGA	6
2.1. Struktūrinius chromosomų persitvarkymus lemiantys veiksniai	6
2.2. Pakitusių chromosomų pasiskirstymas tarp gametų mejozės metu	9
2.3. Chromosomų struktūros persitvarkymų tipai	12
2.3.1. Tarpchromosominiai persitvarkymai	12
2.3.2. Viduchromosominiai persitvarkymai	19
2.3.3. Chromosomų struktūros persitvarkymų nustatymo metodai	24
3. TYRIMŲ METODIKA IR MEDŽIAGOS	26
3.1. Medžiagos	26
3.1.1. Tiriamoji medžiaga	26
3.1.2. Reagentai, naudojami limfocitų kultūros užsėjimui.....	26
3.1.3. Tirpalai, naudojami limfocitų kultūros fiksavimui	26
3.1.4. Tirpalai, naudojami chromosominio preparato dažymui G metodu	26
3.1.5. Tirpalai, naudojami FISH metodui.....	27
3.1.6. Žymenys, naudojami FISH metodui	28
3.2. Tyrimų metodai	29
3.2.1. Rutininis kariotipo tyrimas G metodu.....	29
3.2.2. Fluorescencinės <i>in situ</i> hibridizacijos metodas	31
4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	35
4.1. Subalansuoti chromosomų struktūros persitvarkymai.....	36
4.2. Nesubalansuoti chromosomų struktūros persitvarkymai.....	42
4.3. Rutininio citogenetinio tyrimo ir FISH metodo svarba	49
5. IŠVADOS	54
SUMMARY.....	55
PADĖKA	57
LITERATŪRA	58

SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS

- AS (angl. *Angelman syndrome*) – Angelman'o sindromas;
- bp (angl. *Base pair*) – bazių pora;
- DAPI (angl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*) – 4,6-diaamino-2-fenilindolas;
- DNR (angl. *DNA - Deoxyribonucleic acid*) – deoksiribonukleino rūgštis;
- DDT (angl. *DSB – double-strand break*) – dvigrandžiai DNR trūkiai;
- FISH (angl. *Fluorescence in situ hybridization*) – fluorescencinė *in situ* hibridizacija;
- ICE (angl. *Imprinting centre element*) – išpaudo centrinis elementas;
- kb (angl. *Kilobase*) – kilobazė;
- Mb (angl. *Megabase*) – megabazė;
- MMP25 (angl. *Matrix metalloproteinase 25*) – metalo matrikso proteinazę MMP25 koduojantis genas;
- NAHR (angl. *NAHR – nonallelic homologous recombination*) – nealelinė homologinė rekombinacija;
- PATTR (angl. *PATRRs – palindromic AT-rich repeats*) – palindrominiai AT turtingi regionai;
- PBS (angl. *Phosphate-buffered saline*) – fosfatinės druskos buferis;
- PWS (angl. *Prader-Willi syndrome*) – Prader - Willi sindromas;
- RNR (angl. *RNA – ribonucleic acid*) – ribonukleino rūgštis;
- SSC (angl. *Saline-sodium citrate*) – fiziologinis natrio druskos tirpalas;
- TKS (angl. *LCRs – Low-copy repeats*) – trumpos kartotinės sekos;
- TSP (angl. *TAR – telomere-associated repeats*) – su telomeromis susiję pasikartojimai;

1. ĮVADAS

XX-ame amžiuje genetika tapo sparčiai besivystančiu mokslu, o 1956m. tobulėjant naujiems tyrimo metodams atsirado nauja žmogaus genetikos kryptis – citogenetika, tirianti sveikų ir sergančių žmonių chromosomas. Pagrindinis chromosominių ligų diagnozavimo būdas – tai kariotipo tyrimas. Besivystant citogenetikai bei vis labiau plečiant jos pritaikymo galimybes imta suprasti jos svarbą šiuolaikiniuose moksliniuose tyrimuose bei klinikinėje diagnostikoje.

Chromosomų struktūros persitvarkymai gali lemti įvairius žmogaus sveikatos sutrikimus. Netgi chromosominės ligos, pvz., Dauno ar Ternerio sindromai, gali būti nulemtos ne chromosomų skaičiaus, bet chromosomų struktūros persitvarkymų. Chromosomų trūkiai gali vykti bet kurioje chromosomos dalyje, tai lemia įvairius chromosomų struktūros pokyčius, tačiau tik dalis jų yra suderinami su gyvybinėmis funkcijomis ir yra nustatomi postnataliai. Chromosomų struktūros persitvarkymai, priklausomai nuo to, subalansuoti ar nesubalansuoti, lemia įvairias dimorfines anomalijas arba vaisingumo problemas. Jų nustatymas yra svarbus genetiniam konsultavimui.

Kasdieniniuose klinikinuose tyrimuose yra naudojami klasikiniai citogenetiniai tyrimai, pvz. rutininis chromosomų G dažymas. Nors paprasta chromosomų analizė tiksliai identifikuoja chromosomų skaičiaus bei struktūros pakitimus, tačiau to nepakanka diagnozuojant mažesnius nei <5 Mb dydžio chromosomų struktūros pokyčius. Kaupiantis žinioms apie chromosomas, geno sandarą bei suprantant kai kurių genetinių ligų priežastis imta ieškoti naujų, efektyvesnių ir tikslesnių metodų.

1990 m. citogenetikoje pradėtas taikyti fluorescencinės *in situ* hibridizacijos metodas (FISH). FISH įgalino gauti informaciją apie žmogaus genomo regionus, kurie yra per maži, kad būtų galima juos pastebėti rutininiais citogenetiniais metodais. FISH tapo standartiniu metodu žinomų mikrolecijų ir mikroduliacijų nustatymui. Nuo 2006 m. FISH metodas sėkmingai pradėtas taikyti Vilniaus universiteto Santariškių klinikų Medicininės genetikos centro citogenetikos laboratorijoje.

Chromosomų analizė yra naudinga ne tik genetiniam konsultavimui. Chromosomų struktūros persitvarkymų įvairovė papildo mūsų žinias apie genomo organizaciją ir įtaką žmogaus vystymuisi.

1.1. Darbo tikslas ir uždaviniai

Šio darbo tikslas:

- įvertinti chromosomų struktūros persitvarkymų, nustatytų VUL SK MGC 2002 – 2008 m., įvairovę ir genetinę jų reikšmę;

Šiam tikslui pasiekti reikia išskirti keletą pagrindinių uždavinių:

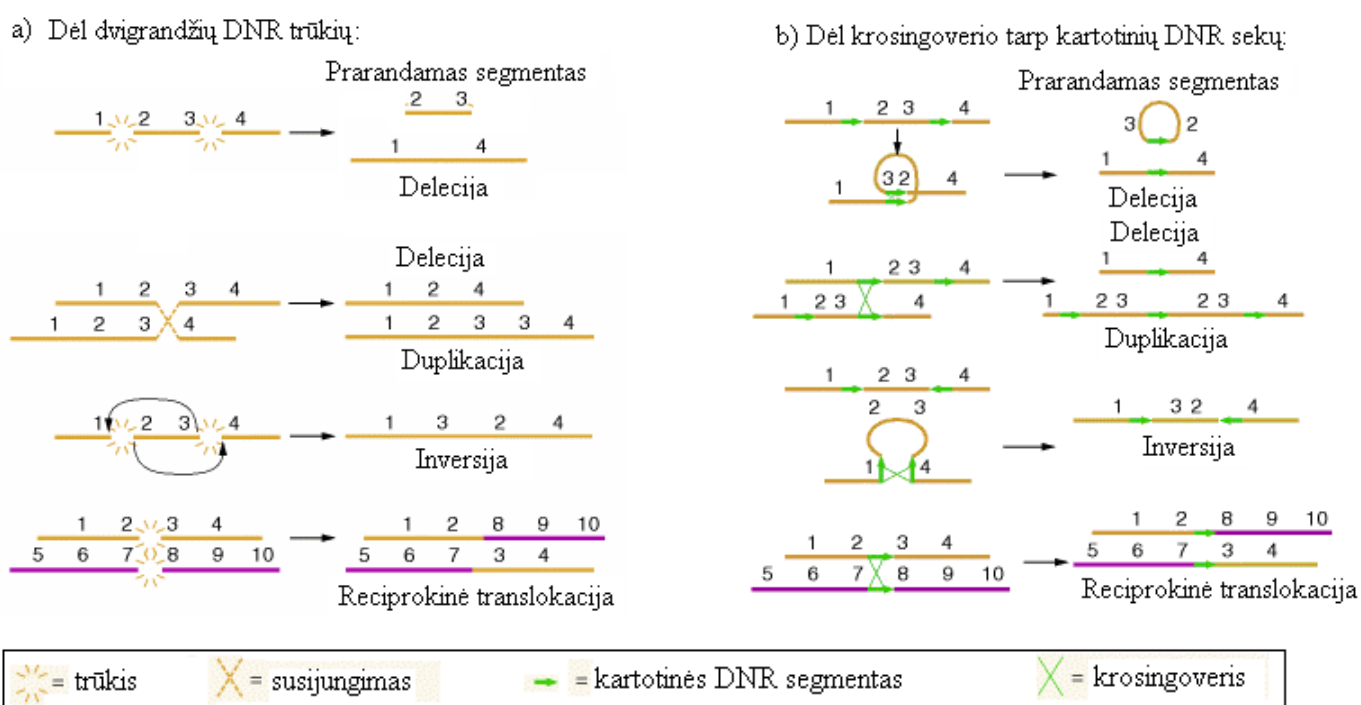
- įvertinti chromosomų struktūros persitvarkymų įvairovę ir palyginti su literatūroje pateikiamais duomenimis;
- identifikuoti chromosomą, kuriai būdinga didžiausia chromosomų struktūros persitvarkymų įvairovė;
- nustatyti chromosomos struktūros pakitimą 16p13.3 regione asmenims su lūpos ir/ar gomurio nesuaugimu taikant FISH metodą;
- įvertinti rutininio citogenetinio tyrimo ir FISH metodo svarbą identifikuojant chromosomų struktūros pakitimus;

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Struktūrinius chromosomų persitvarkymus lemiantys veiksniai

Vis daugėja žmogaus ligų, kurias lemia chromosomų struktūros persitvarkymai nestabiliuose genomo regionuose, kurių klinikinis fenotipas yra genų dozės pasikeitimo pasekmė. Vykstant chromosomų struktūros persitvarkymams gali būti pažeistas genas, prarasti arba įgyti dozei jautrūs genai, pasikeisti geno (-ų) padėtis.

Chromosomų struktūros persitvarkymai dažniausiai vyksta dėl neteisingo dvigrandžių trūkių taisymo, jonizuojančios spinduliuotės arba dėl judriųjų genomo elementų judėjimo. Kitas chromosomų struktūros persitvarkymų šaltinis yra homologinė rekombinacija tarp kartotinių sekų, kurios yra išsibarsčiusios po visą genomą. Chromosomų struktūros persitvarkymų kilmė pavaizduota 1 paveiksle.



1 pav. Chromosomų struktūros persitvarkymų formavimasis (pagal Griffiths ir kt., 1999).

Manoma, kad chromosomų persitvarkymai nėra atsitiktinis įvykis, o genomo polinkio persitvarkymams dėl sudėtingos genomo architektūros, kuri gali lemti genomo nestabilumą, rezultatas (Shaw ir Lupski, 2004).

Viduchromosominiai ir tarpchromosominiai persitvarkymai, kuriuos skatina regionui specifinės trumpos kartotinės sekos – TKS (angl. *LCR – Low-copy repeats*), susidaro dėl nealelinės homologinės rekombinacijos (angl. *NAHR – Nonallelic homologous recombination*) tarp paraloginių genomo segmentų. Regionui specifinės trumpos kartotinės sekos dar vadinamos duplikonais (nors pastarasis terminas yra abejotinas, kai egzistuoja daugiau nei 2 kopijos) paprastai susideda iš 10-400 kb DNR blokų, kuriems būdingas $\geq 97\%$ tapatumas. TKS gali turėti genų, genų fragmentų, pseudogenų, endogeniškų retrovirusinių sekų ar kitų paraloginių fragmentų (Stankiewicz ir Lupski, 2002).

Chromosomų trūkiai, dėl kurių vyksta chromosomų struktūros persitvarkymai, išsidėstę visame genome, tačiau vyrauja pericentromeriniuose ir subtelomeriniuose regionuose, ypač tuose, kurie turi sudėtingos architektūros genomo intervalus, tokius kaip TKS arba AT-turtingos palindrominės sekos (Shaw ir Lupski, 2004). Dydis, kryptis ir atsitiktinis TKS išsidėstymas turi įtakos genomo architektūrai, lemia nestabilumą bei polinkį į NAHR (Stankiewicz ir Lupski, 2002).

NAHR yra pagrindinis mechanizmas, reikalaujantis gilios ligų, susijusių su genomo persitvarkymais, analizės. TKS paprastai toje pačioje chromosomoje, bet kartais ir skirtingose chromosomose, gali veikti kaip NAHR substratai. NAHR tarp tokios pačios TKS orientacijos toje pačioje chromosomoje lemia delecijas ir dublikacijas, kai tuo tarpu NAHR tarp invertuotos TKS orientacijos toje pačioje chromosomoje lemia inversijas. NAHR taip pat gali vykti tarp TKS, esančių skirtingose chromosomose ir būti reciprokiųjų translokacijų priežastimi (Shaw ir Lupski 2004).

Inversijos vyksta NAHR mechanizmu dėka TKS, kurie genome išsidėstę invertuota orientacija. 67% AS sergančių probandų motinų ir 9% kontrolinių asmenų turi heterozigotines inversijas, to paties regiono, kurį praradę Angelman sindromu sergantys asmenys. Inversijos tarp TKS kopijų gali stimuliuoti netipiską, nenormalią rekombinaciją tarp chromosomų ar chromatidžių, lemdamos delecijas, dublikacijas ir translokacijas. Atsižvelgiant į tokių inversijų paplitimą normalioje populiacijoje, atrodo, kad dauguma individų turi didesnę riziką susilaukti vaikų, sergančių genetinėmis ligomis (Shaw ir Lupski, 2004).

Molekulinis mechanizmas, lemiantis terminalines delecijas, nėra žinomas, tačiau tikėtina, kad tai atspindi DNR sekos, esančios šalia žmogaus telomerų. Kiekvienos chromosomos galuose yra pasikartojanti seka – (TTAGGG)_n. Greta telomeros „kepurės“, proksimaliai, yra pasikartojančių sekų grupė, kurios vadinamos su telomeromis susijusiais pasikartojimais – TAK (angl. *TAR – telomere-associated repeats*). Kiekvienas TAK regionas gali būti padalintas į distalinį, trumpesnę sekų pasikartojimą (<2 kb), būdingą daugumai chromosomų, ir proksimaliau esantį regioną, turintį daugiau pasikartojančių sekų (10-40 kb) bei būdingą mažesnei chromosomų grupei. Taigi, kai kurios chromosomos turi tokius pačius TAK, o kai kurie subtelomeriniai regionai visai neturi TAK. Manoma, kad polimorfinis TAK pasiskirstymas gali lemti rekombinaciją tarp nehomologinių chromosomų (Brown

ir kt., 1990). Kitas mechanizmas, galintis paaiškinti citogenetiškai nustatomų terminalių delecijų formavimąsi, yra dvigrandžiai DNR trūkiai, vykstantys dėl nežinomų priežasčių.

Ir alelinė, ir nealelinė rekombinacija gali atlikti karštųjų taškų vaidmenį visame genome, kur vyksta užprogramuoti dvigrandžiai DNR trūkiai – DDT (angl. *DSB – double-strand break*) ir inicijuojama rekombinacija mejozės metu. (Shaw ir Lupski, 2004). Neabejotina, kad tam tikrų genomo vietų DNR architektūrinės savybės lemia jautrumą persitvarkymams (Stankiewicz ir Lupski, 2002). Pvz., PATTR – palindrominiai AT turtingi regionai (angl. *PATRRs – palindromic AT-rich repeats*) suformuoja segtuko/kryžiaus pavidalo struktūras, kurios fiziologinėmis sąlygomis yra tinkamos susidaryti DDT (Kurahashi ir kt., 2001). Kai kurie genomo regionai yra tokie tinkami chromosomų struktūros persitvarkymams, jog pasitaiko atveju, kai struktūriniai persitvarkymai įvyksta abiejose homologinėse chromosomose, pvz., 17-os (Potocki ir kt., 1999) ir 22-os chromosomų struktūros pakitimai (Wenger ir kt., 2000).

Tikslus DNR pažaidų, tokių kaip DDT, taisymas yra būtinas palaikant genomo vientisumą. Neteisingai suporuoti DDT lemia chromosomų struktūros persitvarkymus, pvz., translokacijas, kurios skatina mutagenezę arba netgi ląstelės žūtį. Yra daugybė mechanizmų, užtikrinančių tikslų DDT taisymą. Nors žinduolių ląstelėse homologinė rekombinacija yra pagrindinis DNR pažaidų taisymo būdas, yra didelė tikimybė, kad įvyks genomo persitvarkymai, kadangi didžioji dalis žinduolių genomo yra sudaryta iš pasikartojančių elementų. 1/3 žmogaus genomo dalį sudaro pasikartojantys elementai. Jie tarpininkauja rekombinacijai žmonių ląstelėse (Richardson ir kt., 1998).

Tikėtina, kad ligos, kurių pagrindas yra rekombinacija, vyksta dažniau negu ligos dėl replikacijos klaidų, kadangi replikacijos klaidas dažnai suranda ir ištaiso sudėtinga klaidas taisančių fermentų sistema. Priešingai, rekombinacijos klaidos ypač tarp nesutampančių homologinių segmentų, vyksta kaip normali rekombinacija ir neatpažįstama kaip klaida.

Tyrimai parodė, kad premejozinės replikacijos blokada gali trukdyti teisingai mejozinei rekombinacijai (Forde ir kt., 2000; Davis ir kt., 2001; Murakami ir Nurse, 2001). Dvigrandžiai DNR trūkiai gali susidaryti dėl uždelstos arba pažeistos replikacinės šakutės. Kartotinių sekų regionai, tokie kaip satelitiniai III regionai, esantys akrocentrinių chromosomų trumpuosiuose pečiuose, gali gaminti neįprastos struktūros DNR, kuri gali slopinti replikacinės šakutės judėjimą. Dėl to gali atsirasti dvigrandžiai DNR trūkiai, o dėl neteisingo DNR pažaidų taisymo vyksta chromosomų struktūros persitvarkymai.

2.2. Pakitusių chromosomų pasiskirstymas tarp gametų mejozės metu

Homologinės chromosomos mejozės I metu konjuguoja ir sudaro bivalentus. Įvykus chromosomos struktūros persitvarkymui konjugacija vyksta taip, kad atitiktų homologines sritis. Pavyzdžiui, intersticinių delecijų atveju, kad chromosomų konjugacija atitiktų homologines sritis, toje homologinėje chromosomoje, kuri yra normalios sandaros, susidaro kilpa: segmentas, neturintis homologo „praleidžiamas“. Tuo tarpu chromosoma su delecija chromosomos gale yra tik trumpesnė už normalią chromosomą.

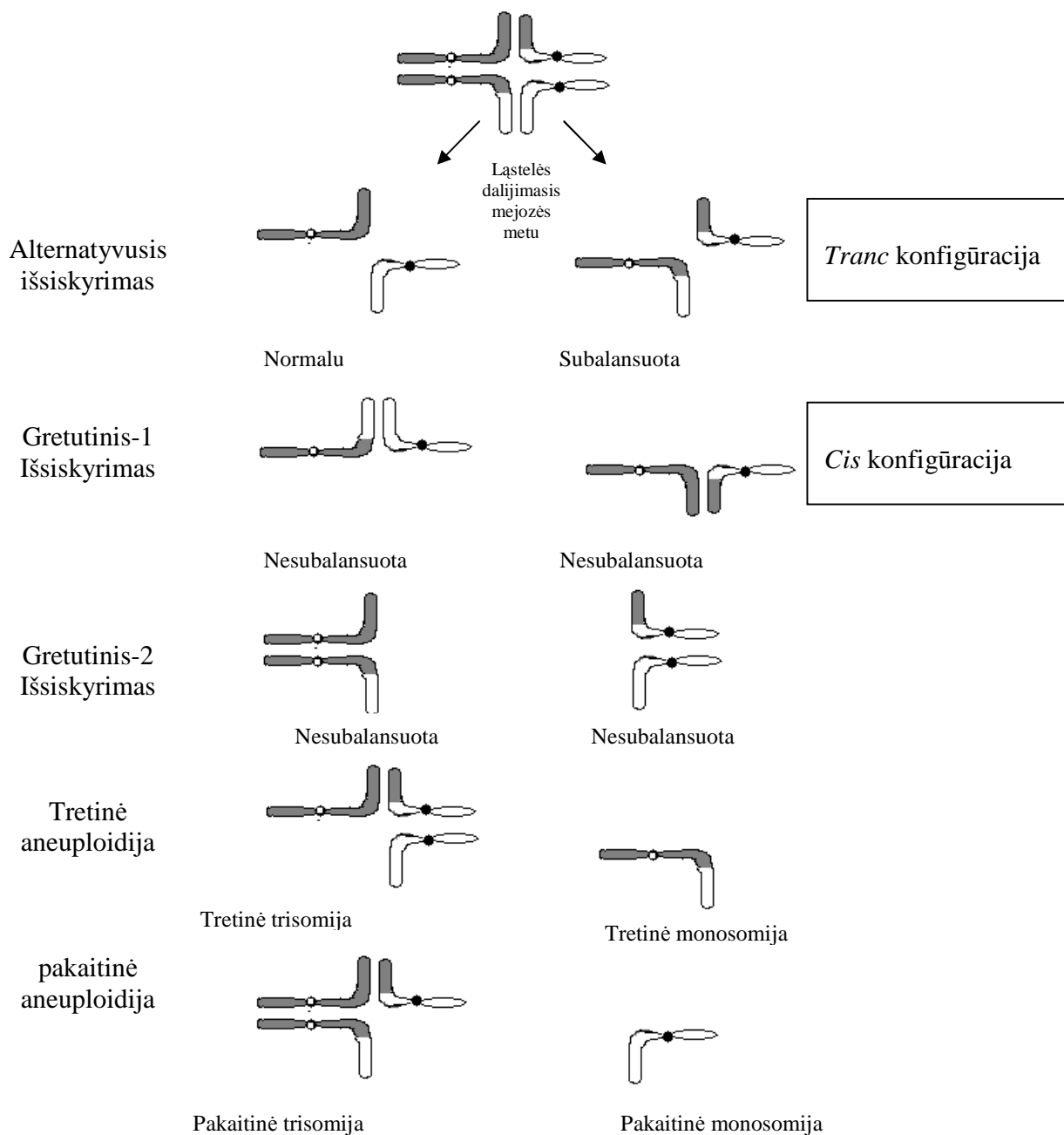
Mejozės I metu translokuotos chromosomos sudaro kvadrivalentus (reciprokinių translokacijų atveju) arba trivalentus (Robertsono translokacijų atveju). Tai aiškiausiai matoma pachiteno stadijoje. Detaliau vertėtų aptarti galimus translokuotų chromosomų išsiskyrimo būdus reciprokinės translokacijos atveju.

Vykstant I mejozės dalijimuisi, keturios chromosomos, sudarančios kvadrivalentą tarp dviejų dukterinių ląstelių pasidalinti gali keliais būdais. Vienu atveju, 2 chromosomos sudarančios kvadrivalentą patenka į vieną ląstelę ir dvi į kitą (2:2 išsiskyrimas). Kitu atveju, kvadrivalentą sudarančios chromosomos, tarp dviejų dukterinių ląstelių pasiskirsto santykiu 3:1 (3:1 išsiskyrimas). Pagal chromosomų pasiskirstymą tarp dviejų dukterinių ląstelių, skiriami keturi išsiskyrimo būdai: alternatyvusis (angl. *alternate*), gretutinis (angl. *adjacent*), tretinė aneuploidija (angl. *tertiary aneuploidy*), pakaitinė aneuploidija (angl. *interchange aneuploidy*) (2 pav.).

Kiekviena reciprokinė translokacija turi specifinį chromosomų išsiskyrimo būdą, kuris priklauso nuo susiformavusio kvadrivalento charakteristikų, t.y. nuo chromosomų dalyvaujančių persitvarkyme, trūkio taškų, translokuotų segmentų ilgio. Alternatyviojo ir gretutinio-1 išsiskyrimo metu chromosomos, turinčios homologines centromeras, paskirstomos į priešingus ląstelės polius, todėl šie išsiskyrimo būdai yra dažniausi. Pastebėta, kad persitvarkyme dalyvaujant akrocentrinei chromosomai arba susiformavus labai asimetriniam kvadrivalentui, vyrauja 3:1 išsiskyrimo būdas (Benet ir kt., 2005).

Alternatyviojo išsiskyrimo metu, priešingos centromeros tempiamos į priešingus ląstelės polius, t.y. viena centromera eina į vieną dukterinę ląstelę, kita į kitą. Alternatyvusis yra vienintelis chromosomų išsiskyrimo būdas, po kurio susidaro nepraradusios genetinės medžiagos gametos – viena gameta yra normalaus kariotipo, kita – su subalansuota reciprokine translokacija.

Gretutinio išsiskyrimo metu, gretimos chromosomos keliauja kartu. Galimi du šio išsiskyrimo variantai: gretutinis-1 ir gretutinis-2. Pastarasis daug retesnis. Jo metu gretimos homologinės centromeromis chromosomos patenka į tą pačią dukterinę ląstelę. Vykstant gretutiniam-1 išsiskyrimui, į dukterines ląsteles patenka nehomologinės chromosomos.

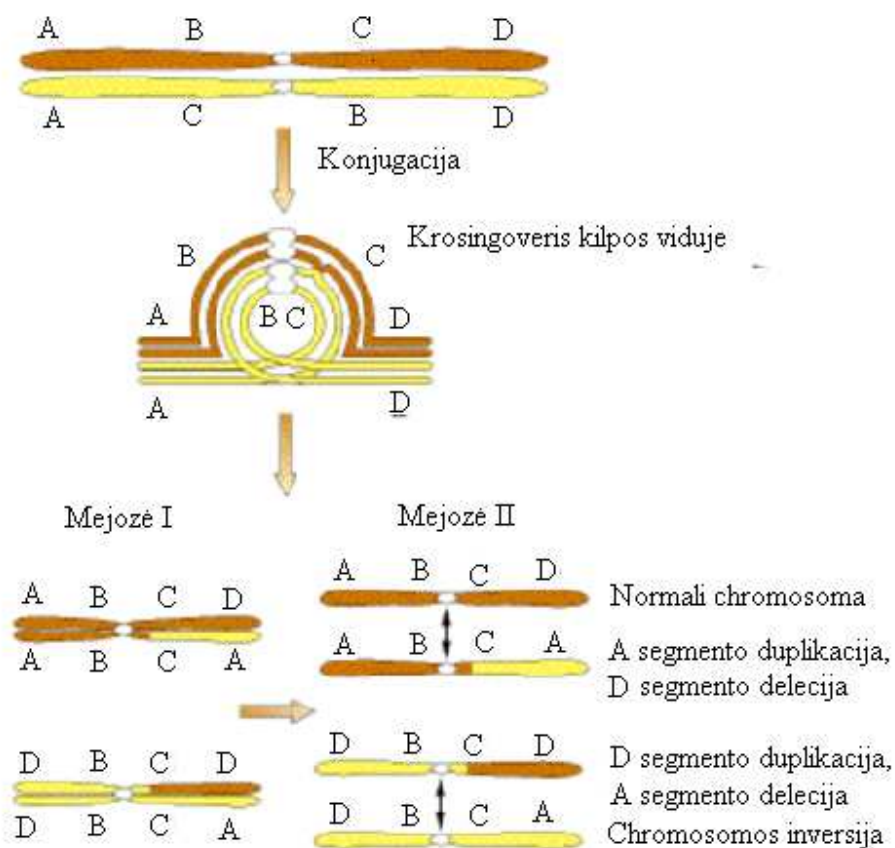


2 pav. Kvadrivalentā sudarančīū chromosomū īšsīskyrīmo būdai (pagal Rickards, 1983).

Vykstant 3:1 īšsīskyrīmui (2 pav.) susīdaro gametos, turīnčios 24 arba 22 chromosomas. 24 chromosomas turīnčiai gametai susīliejus su normalia, susīdaro gyvybinga zigota turīnti 47 chromosomas. Kai translokuotas nedīdēlis fragmentas, dažnīausīai ī vīenā gametā patenka dvi normalios chromosomas īš kvadrīvalento ir vīena translokuota – susīdaro tretinē trisomija (angl. *tertiary trisomy*). Daug rečīiau pasīreīškīa pakaitinē trisomija, kai ī dukterīnē lāstelē patenka dvi translokuotos ir vīena normali

chromosomos. Toks išsiskyrimas vyksta, kai translokacijoje dalyvauja trisomiškai gyvybingos chromosomos (13, 18 arba 21) (Gardner ir Sutherland, 2004). Po apvaisinimo susidaro zigota su trisomija. Dėl šios priežasties, gimsta naujagimiai su Patau sindromu (13 chromosomos trisomija), Edvarso sindromu (18 chromosomos trisomija), Dauno sindromu (21 chromosomos trisomija).

Inversijų nešiotojai skirtingai nei asmenys, kurie turi translokaciją, gamina tik genetiškai subalansuotas gametas, jeigu nevyksta krosingoveris invertuotame segmente. Nesubalansuotos chromosomos susidaro dėka rekombinacijos invertuotame segmente vykstant krosingoveriui tarp invertuotos ir normalaus homologo. Konjugavus chromosomoms, kurių vienoje yra normali genų seka, o kitoje inversija, susidaro sudėtinga kilpa („mirties kilpa“) (3 pav.), kuri leidžia kaip įmanoma geriau sulygiuoti ir suporuoti sutampančius invertuotos chromosomos ir normalaus jos homologo segmentus. Įvykus krosingoveriui invertuotame segmente susidaro viena normali, viena invertuota ir dvi rekombinantinės chromosomos, kurių vienas petys yra duplikuotas, kitame – delecija. (3 pav.).



3 pav. Chromosomų pasiskirstymas mejozės metu įvykus krosingoveriui pericentrinės inversijos atveju (pagal Griffiths ir kt., 1999).

2.3. Chromosomų struktūros persitvarkymų tipai

Chromosomų struktūros persitvarkymai gali būti subalansuoti ir nesubalansuoti. Subalansuotų chromosomų struktūros persitvarkymų atveju, sutrikdoma DNR molekulė abiejuose trūkio taškuose, kuriems neteisingai susijungus įvyksta translokacija ar inversija. Subalansuotų chromosomų struktūros persitvarkymų atveju genetinės informacijos kiekis nepakinta, tačiau trūkio taškai gali būti geno viduje. Tokiu atveju, sutrikdoma geno funkcija. Kartais vykstant tokiam susijungimui, susidaro naujas genas, koduojantis hibridinį baltymą.

Nesubalansuotų chromosomos struktūros persitvarkymų atveju – delecijų, duplikacijų, izochromosomų, žiedinių ar markerinių chromosomų, nesubalansuotų translokacijų, pakinta pažeistos chromosomos dalies genų dozė. Kaip ir visos chromosomos aneuploidija, prarasta arba įgyta papildoma segmento kopija gali sutrikdyti normalų genų balansą.

Pagal tai, kiek chromosomų dalyvauja persitvarkyme, chromosomų struktūros pokyčiai skirstomi į tarpchromosominius ir viduchromosominius.

2.3.1. Tarpchromosominiai persitvarkymai

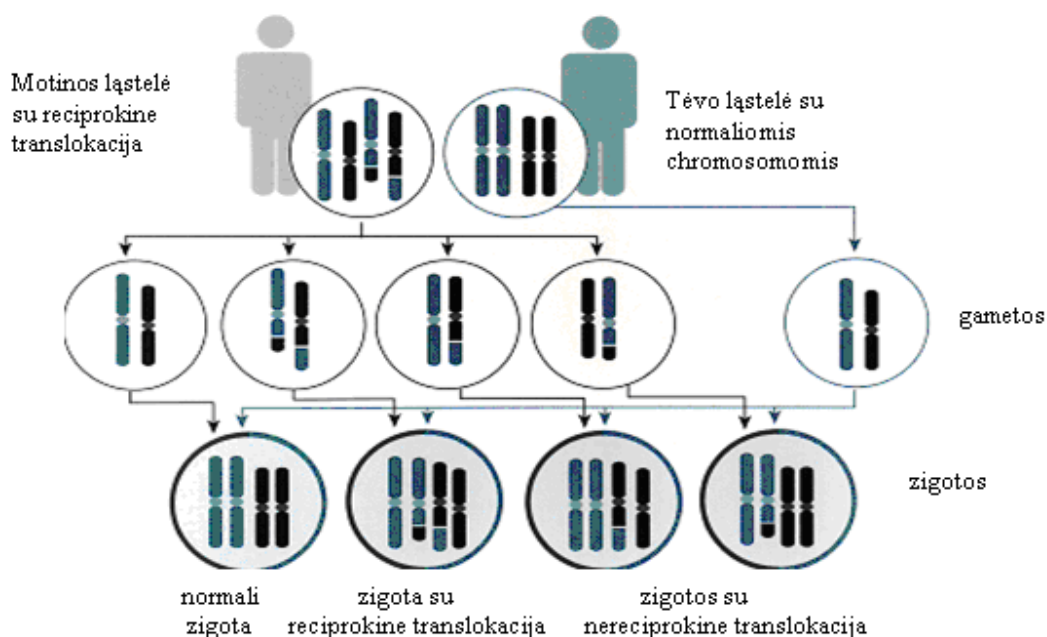
Reciprokinės translokacijos

Reciprokinės translokacijos – tai chromosomų pokyčiai, vykstantys tarp nehomologinių chromosomų, joms apsikeičiant segmentais. Reciprokinių translokacijų dažnis svyruoja nuo 1/400 iki 1/1000 (Ruiz ir kt., 2005). Dažnai šis chromosomų persitvarkymas individo fenotipe nepasireiškia, kadangi reciprokinė translokacija yra genetiškai subalansuota, t.y. po apsikeitimo segmentais nepakinta bendras genetinės medžiagos kiekis. Asmenys, kurių fenotipui translokacijos neturi reikšmės, vadinami subalansuotų translokacijų nešiotojais. Nors translokacijų nešiotojams fenotipo pakitimai nepasireiškia, jie dažnai turi problemų susijusių su reprodukcija dėl sutrikusios spermatogenezės arba oogenezės, kadangi susidaro chromosomiškai nesubalansuotos gametos. Tačiau vykstant translokacijoms, gali būti pažeisti svarbūs, trūkio vietoje esantys genai, tuomet pasireiškia tam tikri fenotipo sutrikimai. Siūloma keletas mechanizmų, aiškinančių, kodėl kai kurios subalansuotos translokacijos susijusios su fenotipo pakitimais:

- Recessyvosios mutacijos dėl translokacijos gali atsirasti ir pasireikšti, kai iš tėvo ir motinos paveldima tame pačiame gene įvykusi mutacija;
- Gali pasireikšti padėties efektas, kuris keičia šalia translokacijos taško esančių genų veiklą;
- Dėl tėvams nebūdingos disomijos, akivaizdžiai subalansuota translokacija gali būti subalansuota struktūriškai, bet ne funkciškai (dėl imprintingo);

- Jei toks pats chromosomos persitvarkymas įvyko vieno iš tėvų genome, bet nesukėlė fenotipo pakitimų, daugiau subtilių persitvarkymų gali vykti mejozes metu, pvz., netolygaus krosingoverio metu;
- Persitvarkymai gali būti daug sudėtingesni negu atrodo ir gali būti nepastebimi atliekant rutininį citogenetinį tyrimą. Citogenetiškai akivaizdžiai subalansuotos translokacijos gali turėti smulkius sudėtingus chromosomų persitvarkymus, kurie nustatomi naudojant papildomus metodus. Šią hipotezę patvirtino Patsalio ir jo kolegų (2004) atliktas tyrimas. Siekiant nustatyti smulkius sudėtingus chromosomų persitvarkymus, buvo iširta 20-ties pacientų kariotipai su akivaizdžiai subalansuotomis translokacijomis. FISH analizė atskleidė 3 „paslėptas“ translokacijas (Patsalis ir kt., 2004).

Vyrų bei moterų nevaisingumas ir chromosomų struktūros persitvarkymai yra glaudžiai susiję. Dažna nevaisingumo priežastis yra reciprokinės translokacijos. Vidutiniškai 50% chromosomiškai nesubalansuotų spermatozoidų susidaro dėl reciprokinių translokacijų (Shi ir Martin, 2001). Genetiškai nesubalansuotų gametų produkcija yra griežtai susijusi su translokacijomis ir padidina pasikartojančių persileidimų bei nesveikų palikuonių gimimo tikimybę (Gianaroli ir kt., 2002).



4 pav. Gametos, galinčios susidaryti asmeniui, turinčiam subalansuotą reciprokinę translokaciją, ir zigotos, galinčios susidaryti susiliejus normaliai ir reciprokinę translokaciją turinčiais gametoms (Greenwood medical centre).

Taigi, nors subalansuotų translokacijų nešiotojai yra normalūs, jie gali produkuoti genetiškai nesubalansuotas gametas ir susilaukti palikuonių su genetiškai nesubalansuotu kariotipu. 4 paveiksle pavaizduota, kokios gametos gali susidaryti asmeniui, turinčiam subalansuotą translokaciją, ir zigotos, susidarančios po susiliejimo su normalia gameta.

Empiriniai duomenys rodo, kad translokacijos nevienodai įtakoja vyrų ir moterų, turinčių tą pačią translokaciją, vaisingumą. Tai lemia skirtingas kvadrivalento elgesys formuojantis vyriškosios lyties ir moteriškosios lyties gametoms mejozės metu. Atranka gali veikti prieš spermatozoidus su genetiškai nesubalansuota chromosomine sudėtimi, ypač jei jiems būdingas genetinės medžiagos perteklius (Gianiaroli ir kt., 2002).

Spermatozoidų citogenetiniai tyrimai padeda suprasti chromosomų mejozinio išsiskyrimo mechanizmą. Tiesioginis spermatozoidų chromosomų tyrimas tapo įmanomas kariotipuojant spermatozoidus po išsiskverbimo į žiurkėno oocitus ir, visai neseniai, naudojant FISH metodą (Morel ir kt., 2004). Translokacijų nešiotųjų spermatozoidų kariotipo FISH tyrimai parodė tarpchromosominio efekto pasireiškimą kai kurių translokacijų atvejais (Blanco ir kt., 2000; Morel ir kt., 2001; Oliver- Bonet ir kt., 2001; Shi ir Martini, 2001). Chromosomiškai nesubalansuotos gametos gali susidaryti ne tik dėl translokacijoje dalyvaujančių chromosomų dalinės aneuploidijos, bet ir chromosomų, nesusijusių su translokacija. Tarpchromosominis efektas priklauso nuo translokacijoje dalyvaujančių chromosomų bei trūkio taškų chromosomoje (Blanco ir kt., 2000; Estop ir kt., 2000). Gianaroli ir jo kolegų atlikti tyrimai (Gianaroli ir kt., 2002) su reciprokinėmis translokacijų nešiotojais parodė, kad 81% embrionų, turinčių chromosomiškai nesubalansuotą kariotipą, susidaro dėl chromosomų, dalyvaujančių translokacijoje, tuo tarpu Robertsono translokacijų nešiotųjų – žymiai mažiau 58%. Tai galima paaiškinti skirtingu skirtingų tipų translokacijų elgesiu mejozės metu.

Ar chromosomų persitvarkymai gali pakeisti kitų chromosomų elgesį mejozės metu, visada buvo diskutuotinas klausimas žmogaus genetikoje (Gianaroli ir kt., 2002). Tarpchromosominis efektas, nustatytas spermatozoiduose, yra mažas palyginus su chromosomų pakitimais nustatytais žmogaus embrionų besidalijančiose ląstelėse (Marquez ir kt., 2000; Magli ir kt., 2001; Bielanska ir kt., 2002).

Nereciprokinės translokacijos

Nereciprokinėmis translokacijomis vadinamos tokios translokacijos, po kurių susidaro genetiškai nesubalansuotas kariotipas, kuriam būdinga translokacijoje dalyvaujančių chromosomų skirtingų segmentų monosomija, disomija ir trisomija (Pedersen ir kt., 2000).

Tokio tipo translokacijos nustatomos maždaug 1 iš 2000 asmenų (Mohan ir kt., 2003). Individai su nesubalansuotu genomu, dažnai yra asmenų, turinčių subalansuotą translokaciją, palikuonys. Tai lemia translokacijos nešiotųjų produkuojamų genetiškai nesubalansuotų gametų susiliejimas su normalia gameta. Kadangi prarasta arba įgyta chromosomos dalis gali turėti genus svarbius vaisiaus augimui ir vystymuisi, dėl nesubalansuotų translokacijų vyksta persileidimai arba gimsta naujagimiai su tam tikrais patologiniais sutrikimais (protiškai atsilikę ir kt.). Nesubalansuoti subtelomeriniai chromosomų persitvarkymai apibūdinami, kaip svarbi protinio atsilikimo bei pasikartojančių savaiminių persileidimų priežastis.

Robertsono translokacijos

1916m. amerikietis, vabzdžių citogenetikas, W.R.B. Robertson, pirmasis aprašė translokuotas chromosomas, kurios susidarė susijungus 2 akrocentrinėms chromosomoms. Jo garbei, toks chromosomų persitvarkymas buvo pavadintas Robertsono translokacijomis (Gardner ir Sutherland, 2004).

Robertsono translokacijos yra vienas iš didžiausių chromosomų persitvarkymų, tačiau paprastai nėra susiję su fenotipo pakitimais, jei kariotipas yra subalansuotas (Perry ir kt., 2005). Šio tipo translokacijų pasitaiko 1 iš 1000 asmenų (Ruiz ir kt., 2005). Translokacijos gali vykti tarp homologinių ir nehomologinių chromosomų.

Tėvinės kilmės ir translokacijos formavimosi stadijos (mejozinės ar mitotinės) nustatymas yra svarbūs aiškinantis translokacijų susidarymo mechanizmą. Robertsono translokacijos gali formuotis postzigotiškai arba mejozės metu. Translokacijos formavimosi laikas gali būti nustatomas lyginant alelius, esančius derivatinėse chromosomose, su normalių tėvinių chromosomų aleliais.

Bandyopadhyay ir jo kolegos (Bandyopadhyay ir kt., 2001) atliko tyrimus, siekdami išsiaiškinti Robertsono translokacijų kilmę. Robertsono translokacijas jie suskirstė į 2 grupes: dažnas – rob(13q;14q) ir rob(14q;21q), bei retas – visas likusias Robertsono translokacijas tarp nehomologinių chromosomų. Tyrimų rezultatus palyginus su anksčiau atliktais, paaiškėjo, kad dažnų Robertsono translokacijų atveju chromosomų trūkio taškai yra pastoviuose regionuose ir įvyksta oogenezės metu. Tuo tarpu retų Robertsono translokacijų atveju, pastebėta, kad trūkio taškai ir formavimosi stadijos labai įvairios.

Žmogaus akrocentrinių chromosomų trumpiesiems pečiams yra būdingas didelis sekų panašumas, nors kai kurios sekos nėra būdingos visoms akrocentrinėms chromosomoms (Bandyopadhyay ir kt., 2001). Visos akrocentrinės chromosomos gali dalyvauti Robertsono translokacijose, tačiau skirtingas jų pasiskirstymas nėra atsitiktinis.

Robertsono translokacijose dalyvauja D ir G grupių chromosomos. D grupei priklauso 13, 14 ir 15, o G – 21 ir 22 chromosomos. Apie 80% Robertsono translokacijų susidaro susijungiant dviems D grupės

chromosomoms. Retesnės yra translokacijos, dalyvaujant D ir G grupių chromosomoms. Iš jų dažniausiai pasitaikanti – rob(14;21) translokacija. Rečiausios translokacijos tarp 21 ir 22 chromosomų (Gardner ir Sutherland, 2004).

Nehomologinių chromosomų poravimasis mejozės metu ir rekombinacija tarp homologinių šių chromosomų sekų gali lemti rekombinantinių chromosomų susiformavimą. Dauguma dažniausiai nustatomų Robertsono translokacijų vyksta mejozės metu formuojantis kiaušialąstei. Oogenezės metu tam tikri veiksniai sutelkia specifines akrocentrines chromosomas labai arti vieną kitos ir tai palengvina translokacijų formavimąsi. Toks veiksnys gali būti branduolėlio formavimasis, kurio metu akrocentrinių chromosomų trumpieji pečiai susijungia, padidindami poravimosi ir parologinių segmentų rekombinacijos galimybę.

Susijungus 2 akrocentrinėms chromosomoms prarandamas vienas iš dviejų BOC – branduolėlio organizacinių centrų (angl. *NOR* – *nucleolar organizer region*), esantis akrocentrinės chromosomos trumpajame petyje. Taigi individai su Robertsono translokacija turi 9 BOC vietoj 10. Ne visi BOC yra aktyvūs, dauguma individų turi 4-7 aktyvius BOC ląstelėje. Tačiau minimalus aktyvių BOC skaičius yra būtinas, kad ląstelė normaliai funkcionuotų. Nepakankamas aktyviai funkcionuojančių BOC skaičius vaisiuje gali sukelti savaiminį persileidimą (Gardner ir Sutherland, 2004).

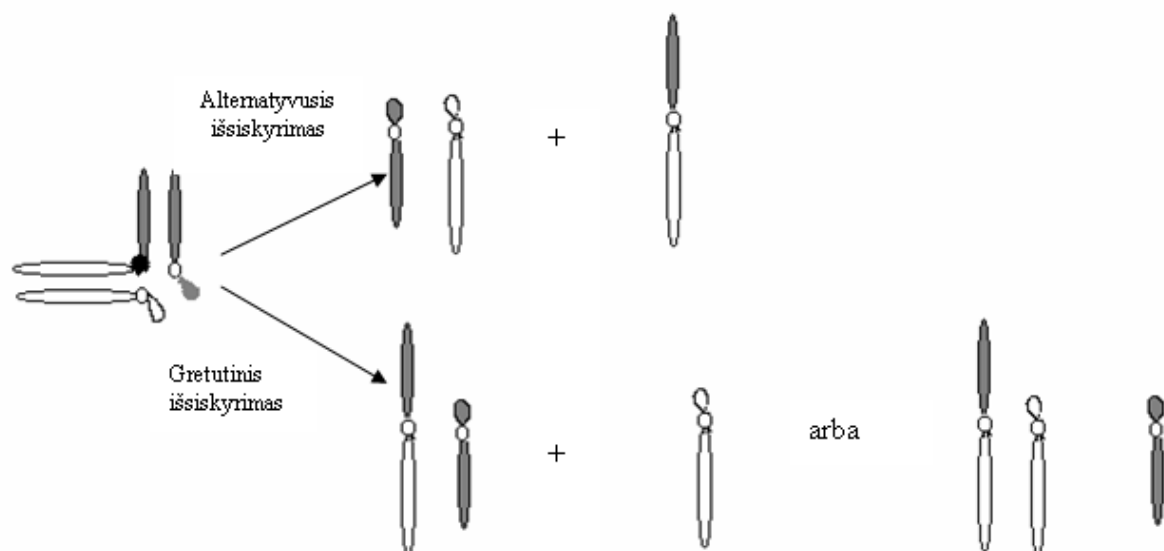
Skiriami trys Robertsono translokacijų formavimosi mechanizmai:

- Susijungimas per centromerą;
- Susijungimas po trūkio viename trumpajame petyje ir vienam ilgajame petyje;
- Susijungimas po trūkių abiejuose trumpuosiuose pečiuose;

Pirmaisiais dviem atvejais, susidariusi translokuota chromosoma turi vieną centromerą (monocentrinė). Trečiuoju atveju, susidaro dicentrikas. Kartais dicentrinėse chromosomose viena centromera suspaudžiama ir chromosoma funkcionuoja kaip monocentrinė (Gardner ir Sutherland, 2004).

Įvykus Robertsono translokacijai tarp nehomologinių chromosomų, joms konjuguojant mejozės metu susidaro trivalentas, sudarytas iš derivatinės chromosomos ir dviejų normalių chromosomų. 5 paveiksle pavaizduoti galimi translokuotų chromosomų išsiskyrimo atvejai. Alternatyviojo išsiskyrimo metu susidaro normalios arba subalansuotos, turinčios tokią pat translokaciją kaip ir nešiotojas, gametos, o gretutinio išsiskyrimo metu susidaro nesubalansuotos gametos (Gutierrez-Mateo ir kt., 2005). Nesubalansuotų gametų susidarymo tikimybė priklauso nuo translokacijos nešiotėjo lyties, chromosomų, dalyvaujančių Robertsono translokacijoje, bei specifinių translokacijos savybių (Pardo-Manuel de Villena ir Sapienza, 2001). Alternatyvusis išsiskyrimas yra dažnesnis nei gretutinis. Luciani ir kt. (1984) nustatė, kad pachitenos stadijoje trivalentas visada yra cis konfigūracijos, galbūt todėl vyrauja alternatyvusis

išsiskyrimo būdas (Morel ir kt., 2001). Po gretutinio išsiskyrimo susidaro dviejų tipų disominės ir dviejų tipų nulisominės gametos. Jeigu translokacijoje dalyvauja to paties dydžio chromosomos (D;D arba G;G), translokacija labiau linkusi išsiskirti alternatyviu būdu, negu skirtingo dydžio (D;G) (Gianaroli ir kt., 2002).

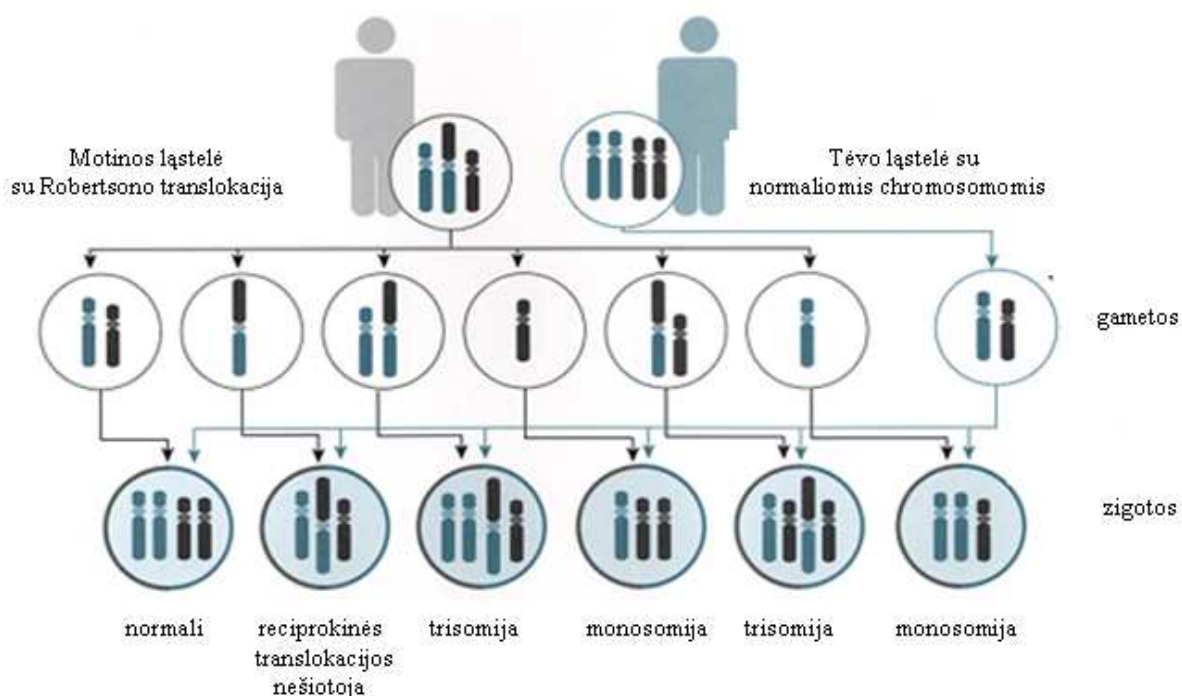


5 pav. Chromosomų, dalyvaujančių Robertsono translokacijoje, išsiskyrimas (pagal Gardner ir Sutherland, 2004).

Susijungus 2 akrocentrinėms chromosomoms per trumpuosius pečius, pažeidžiami tik BOC genai, todėl Robertsono translokacijų nešiotojams paprastai būdingas normalus fenotipas. Tačiau translokacija gali turėti įtakos vaisingumui dėl sutrikusios gametogenezės arba palikuonims dėl nesubalansuotų gametų produkcijos. Nesubalansuotoms zigotoms būdinga trisomija arba monosomija. Paprastai tik trisominės zigotos gali išgyventi pilną nėštumo laikotarpį (Rouz ir kt., 2005).

Dauguma moterų ir vyrų, kurie yra Robertsono translokacijų nešiotojai, yra vaisingi, tačiau yra didelė tikimybė, kad įvyks savaiminis persileidimas arba gimis chromosomiškai nesubalansuotu kariotipu naujagimis su tam tikrais fenotipo pakitimais. 6 paveiksle parodyta, kokios gametos gali susidaryti asmeniui, Robertsono translokacijos nešiotojui, ir zigotos, kurios susidaro po susiliejimo su normalia gameta. Iš normalios zigotos arba iš zigotos, turinčios subalansuotą translokaciją vystysis genetiškai normalus embrionas. Dauguma nesubalansuotų zigotų, kurioms būdinga trisomija – tam tikros chromosomos perteklius, arba monosomija – tam tikros chromosomos trūkumas, neišgyvena (įvyksta persileidimas pirmajame nėštumo trimestre). Tačiau pasitaiko atvejų, kai zigotos, turinčios genetinės medžiagos perteklių, išlieka gyvybingos visą nėštumo laikotarpį, tačiau gimęs naujagimis turi įvairių

anomalijų. Tai priklauso nuo to, kurios chromosomos trisomija susidaro. Pavyzdžiui, zigota su 21 chromosomos trisomija išgyvena, tačiau gimsta naujagimis su Dauno sindromu.



6 pav. Gametos, galinčios susidaryti asmeniui, Robertsono translokacijos nešiojui, ir zigotos, susidaranti po susiliejimo su normalia gameta (Greenwood medical centre).

Pastebėta, kad translokacijų nešiojais kartais susilaukia palikuonių su įvairiomis anomalijomis ir defektais dėl translokacijoje nedalyvaujančių chromosomų. Tarpchromosominis efektas ypač svarbus Robertsono translokacijų atveju. Nustatyta daug atvejų, kai embrionams būdinga translokacijoje nedalyvaujančių chromosomų aneuploidija (Gianaroli ir kt., 2002; Pujol ir kt., 2003). Gianaroli ir jo kolegų tyrimai parodė, kad aneuploidija dėl translokacijoje nedalyvaujančių chromosomų yra dažnesnė Robertsono translokacijų nešiojų embrionams (31%) nei reciprokinė translokacijų nešiojų embrionams (6%) (Gianaroli ir kt., 2002).

Pastebėta, kad Robertsono translokacijų nešiojos dažniau tampa nėščios negu reciprokinė translokacijų nešiojos galbūt todėl, kad susidaro mažesnis skaičius nesubalansuotų embrionų (Munne ir kt., 2000). Vyrai Robertsono translokacijų nešiojai produkuoja mažiau spermatozoidų turinčių translokaciją (3,4-36%) negu reciprokinė translokacijų nešiojai (47,5-81,0%) (Egozcue ir kt., 2003).

2.3.2. Viduchromosominiai persitvarkymai

Viduchromosominiai persitvarkymai yra citogenetinės aberacijos, kuriose dalyvauja viena chromosoma, pavyzdžiui, intersticinės ir terminalinės delecijos, intersticinės duplikacijos, markerinės ir žiedinės chromosomos, inversijos, izochromosomos. Kai kuriuose persitvarkymuose gali dalyvauti vienas homologas (seserinių chromatidžių pokytis), tuo tarpu kitose abi homologinės chromosomos (rekombinacija tarp homologų) (Shaffer ir Lupski, 2000).

Inversijos

Inversija – tai chromosomos struktūros pakitimas, kai įvykus dviems trūkiams chromosomoje, vidinis segmentas pasisuka 180° kampu ir vėl susijungia. Inversijos yra vienas dažniausių chromosomų struktūros persitvarkymų (Forrester ir Merz, 2007).

Inversijos diagnozuojamos 2,1 iš 10000 gimusiųjų. (Forrester ir Merz, 2007). Inversijų dažnis atliekant prenatalinę citogenetinę analizę paprastai yra didesnis (5-64 iš 10000) (Crandall ir kt., 1980; Ferguson-Smith ir Yates, 1984; Chaabouni ir kt., 2001; Horger ir kt., 2001; Ryall ir kt., 2001) lyginant su postnatalinės analizės duomenimis, kadangi prenatalinis kariotipo tyrimas paprastai atliekamas kai įtariama vaisiaus chromosomų patologija.

Inversijos sudaro apie 5% visų chromosomų struktūros persitvarkymų (Forrester ir Merz, 2007), nors yra maždaug 10 kartų retesnės nei kiti subalansuoti chromosomų persitvarkymai (Robertsono translokacijų dažnis 1/1000; reciprokinių translokacijų- 1/625 (Shafer ir Lupsky, 2000)). Pericentriinių inversijų dažnis varijuoja 0.012 – 0.07%, paracentriinių – 0.01 – 0.05% (Gardner ir Sutherland, 2004). Skirtingai nei translokacijos, kurios yra dažniausia reprodukcinų funkcijų sutrikimo priežastis, dauguma inversijų nustatomos tik prenatalinės diagnostikos metu arba dėl nenormalaus fenotipo (Youings ir kt., 2004). Tikimybė inversijos nešiotojui susilaukti palikuonio su genetiškai nesubalansuotu kariotipu yra apie 1%, daug mažesnė nei reciprokinių translokacijų nešiotojams (atitinkamai 2,7% ir 19,2% tikimybė subalansuotų ir nesubalansuotų translokacijų nešiotojams) (Youings ir kt., 2004).

Skiriami 2 inversijų tipai: paracentrinė inversija, kai pasisukantis 180° kampu chromosomos segmentas neturi centromeros; pericentrinė, kai apgretame segmente yra centromera. Konjugavus chromosomoms, kurių vienoje yra normali genų seka, o kitoje inversija, susidaro sudėtinga kilpa („mirties kilpa“). Pericentriinių inversijų atveju, kilpa sudėtingesnė. Kadangi inversijos dažniausiai yra subalansuotas persitvarkymas, nepakinta genetinės medžiagos kiekis, todėl jos yra gyvybingos ir nesukelia ypatingų anomalijų fenotipo lygyje.

Tik nedaugelis citogenetiškai matomų chromosomų persitvarkymų tarp kurių yra ir keletas dažniausių pericentriųjų inversijų, yra interpretuojamos kaip heteromorfiniai variantai. Keletas dažniausių autosomų pericentriųjų inversijų laikomos „normaliais variantais“, jeigu nėra būdingos fenotipo ar vystymosi anomalijos toje genealogijoje ir yra stabiliai perduodamos. Šios inversijos skirstomos į dvi klases: I) inversijos, kurių trūkio taškai yra heterochromatine (1-os, 9-os, 16-os ir Y chromosomų inversijos); II) inversijos, kurių trūkio taškai yra euchromatine (2-os, 5-os, 10-os chromosomų inversijos) (Zuffardi ir kt., 2006).

Inversijos, kurių trūkio taškai yra heterochromatino regionuose (1qh, 9qh, 16qh, ir Yq) yra santykinai dažnos. Žmonių populiacijoje dažniausia pasikartojanti inversija yra pericentrinė 9-os chromosomos inversija; >2% populiacijos yra inv(9)(p11q12) nešiotojai (Park ir kt., 1998). Taip pat dažnos ir kitos heteromorfinės inversijos, kurių trūkio taškai yra euchromatine – inv(2)(p11.2q13), inv(5)(p13q13), inv(10)(p11q21.2) (Youings ir kt., 2004).

inv(2)(p11.2q13) yra dažniausia pericentrinė inversija, kurios trūkio taškai yra euchromatine, ir interpretuojama, kaip kliniškai nežalinga. Tačiau nustačius šį chromosomos struktūros pakitimą prenatalio tyrimo metu atliekami abiejų tėvų kariotipo tyrimai dėl galimų dauginių įgimtų anomalijų pavojaus bei protinio atsilikimo *de novo* insercijų atveju. Jeigu vaisiui ir vienam iš tėvų, kuris kliniškai yra normalus, nustatyta inversija su identiškais trūkio taškais, rizika gimti vaikui su anomalijomis yra minimali. Yra aprašyti du nesubalansuotų kariotipų ir su tuo susijusių fenotipo anomalijų atvejai inv(2)(p11.2q13) nešiotųjų palikuonims. Vienu atveju buvo nustatyta intersticinė 2p12 delecija (Lacbawan ir kt., 1999), kitam 2-osios chromosomos duplikacija dup(2)(p12->p21) (Magee ir kt., 1998). Abiem atvejais, mikroskopiškai nustatytas nesubalansuotumas buvo susijęs su ryškiomis įgimtomis anomalijomis. Jeigu manoma, kad inversija kilo *de novo*, teigiama, kad įgimtų anomalijų ir vystymosi sutrikimo rizika vaikui apytiksliai lygi 6.7% (Warburton, 1991) dėl geno pažeidimo ar padėties efekto (Bugge ir kt., 2000). Literatūroje teigiama, kad inv(2)(p11.2q13) retai vyksta *de novo*. *De novo* inv(2) dažnis mažesnis nei 5,97% (Hysert ir kt., 2006). Mechanizmas, lemiantis pasikartojančių inversijų formavimąsi yra susijęs su kartotinėmis sekomis susidarant labai panašioms trūkio taškams molekuliniam lygyje, todėl manoma, kad fenotipas susijęs su šiais persitvarkymais yra panašus ir dažniausiai normalus (Hysert ir kt., 2006). Šią hipotezę palaiko pasikartojanti t(11;22)(q23;q11) translokacija. Paveldimos ir *de novo* šios translokacijos formos yra fenotipo ir vystymosi atžvilgiu normalios (Kurahashi ir Emanuel, 2001). Taigi, pasikartojančių subalansuotų chromosomų persitvarkymų *de novo* formos nebūtinai lemia padidėjusią įgimtų anomalijų riziką, kaip atsitiktiniai subalansuoti persitvarkymai.

Kitos pasikartojančios inversijos, kurių trūkio taškai yra euchromatine, aprašomos kaip nežalingos, jeigu yra paveldėtos. Inversija inv(10)(p11.2q21.2) nėra susijusi su konkrečiais fenotipo ar vystymosi

sutrikimais, nėra užregistruotų šios inversijos rekombinantinių aneusomijų atvejų ir labai retai ši inversija vyksta *de novo* (Collinson ir kt., 1997). Todėl teigiama, kad prenatalinė chromosomų analizė inv(10) nešiotojams nėra pagrįsta.

Tyrinėjant inversijų nešiotojus gauti rezultatai parodė, kad invertuotame regione slopinamas krosingoveris (Jaarola ir kt., 1998). Vykstant rekombinacijai invertuotame regione tarp invertuotos ir normalios chromosomos susidaro 2 komplementarios rekombinantinės chromosomos. Kiekvienos jų vienas petys duplikuotas, o kitame – yra delecija. Paracentrinių inversijų atveju susidaro dicentrinė ir acentrinė rekombinantinės chromosomos. Teigiama, kad inversijos dydis yra pagrindinis veiksnys, įtakojantis sinapsės tipą tarp invertuotos ir normalios chromosomų. Paprastai manoma, kad kuo didesnis invertuotas segmentas, tuo mažesnis duplikuotos ar prarastos medžiagos kiekis yra nesubalansuotose gametose, kadangi tik inversijos kilpos, susiformuojančios mejozės metu, išorėje esančio euchromatino kiekis gali pakisti vykstant krosingoveriui kilpos viduje. Mažesnės inversijos lemia rekombinantų su didelių segmentų, esančių inversijos trūkio taškų galuose, nesubalansuotumą, kurie yra sunkiau suderinami su gyvybe. Tačiau šiuo atveju, dėl mažos inversijos kilpos, susidarančios mejozės metu, yra mažesnė krosingoverio tikimybė kilpos viduje ir to pasekoje nesubalansuotumas (Gilling ir kt., 2006).

Inversijos dydis ir jos santykis su chromosoma yra du parametrai glaudžiai susiję su rekombinacijos įvykiu. Anton E ir jo bendradarbių (Anton ir kt., 2005) atliktų tyrimų rezultatai parodė, kad žymiam nesubalansuotų gametų gamybos lygiui reikėtų mažiausiai 100 Mbp inversijos ir invertuotas fragmentas turėtų sudaryti bent 50% chromosomos.

Delecijos ir duplikacijos

Delecijos ir duplikacijos beveik visuomet lemia fenotipo pakitimus, įgimtas raidos anomalijas.

Delecija – chromosomos dalies iškrita. Kai delecija yra chromosomos vidinėje dalyje, kad chromosomų konjugacija atitiktų homologines sritis, toje homologinėje chromosomoje, kuri yra normalios sandaros, susidaro kilpa: segmentas, neturintis homologo „praleidžiamas“. Tuo tarpu chromosoma su delecija chromosomos gale yra tik trumpesnė už normalią chromosomą. Iškritus segmentui, kuriame yra dominuojantis genas, dėl hemizigotinės būsenos fenotipe pasireiškia recesyvieji genai. Netgi labai maža chromosomos dalis gali turėti daug skirtingų genų. Prarasti genai gali lemti vaisiaus raidos sutrikimus. Jos gali būti paveldimų žmogaus anomalijų priežastis. Stambios delecijos arba gyvybei svarbių genų delecijos yra letalios (Rančelis, 2000).

Yra aprašytos visų chromosomų distalinių dalių delecijos. Nors dauguma delecijų yra unikalios, kai kurios terminalinės delecijos vyksta daug dažniau ne kitos. Šis tam tikrų terminalinių delecijų

vyravimas gali atspindėti santykinę tam tikro regiono monosomijos gyvybingumą ir genomo struktūrą, kuri yra nestabili arba labiau linkusi persitvarkyti (Shaffer ir Lupski, 2000). Dažniausiai nustatomos 1p-, 4p-, 5p-, 11q-, 17p-, 18q- ir 22q- delecijos. Daugumos terminalinių delecijų trūkio taškai vyksta skirtinguose regionuose, todėl delecijos yra įvairaus dydžio. Molekulinis mechanizmas, lemiantis terminalines delecijas, nėra žinomas, tačiau manoma, kad tai susiję su DNR sekomis, esančiomis šalia žmogaus telomerų (žr. 2.1. skyrelį).

Duplikacija – chromosomų mutacija, kai segmentas yra padvigubėjęs. Dėl duplikacijų susidaro papildomas genetinės medžiagos kiekis, net jeigu bendras visų chromosomų skaičius yra normalus. Kadangi netgi ir labai maža chromosomos dalis turi daugybę skirtingų genų, papildomi duplikuoti genai gali lemti tų genų neteisingą funkciją. Kai pasikartojantys segmentai eina vienas paskui kitą, tokios duplikacijos vadinamos tandeminėmis. Dėl duplikacijų gali sumažėti gyvybingumas (Rančelis, 2000).

Remiantis literatūra, žmogaus chromosomų delecijos ir duplikacijos, kurios lemia nenormalų vystymąsi, vyksta įvairiuose genomo regionuose, tačiau tam tikros genomo vietos yra tinkamesnės persitvarkymams, nei kitos (Brewer ir kt., 1998; Brewer ir kt., 1999). Įdomu tai, kad kai kuriuose genomo regionuose niekada nebuvo nustatyta delecija ar duplikacija. Šie regionai gali turėti kritinius dozei jautrius genus, todėl jų delecija arba duplikacija būtų mirtina. Akivaizdus persitvarkymų nebuvimas kai kuriuose segmentuose gali identifikuoti genomo regionus, kurie mažiau tinkami vykti chromosomų struktūros pakitimams. Be to, kai kurie chromosomų struktūros persitvarkymai gali būti nepastebėti rutinine citogenetine technika arba kliniškai nepasireikšti.

Manoma, kad duplikacijos vyksta rečiau negu delecijos tame pačiame regione, kadangi mažiau pacientų su duplikacijom yra aprašyta literatūroje. Tačiau, analizuojant žmogaus citogenetinę duomenų bazę paaiškėja, kad tik 2,1% galimų autosomų ruožų neįtraukiami į duplikacijas, tuo tarpu 11% autosomų ruožų nevyksta delecijos (Brewer ir kt., 1998, 1999). Taip yra galbūt dėl mažesnės tolerancijos haplonepakankamumui nei trisomijai žmogaus genome.

Izochromosomos yra invertuotos palidrominės struktūros duplikacijos, kurių trūkio taškai įvyko labai arti centromeros arba centromeroje. Taigi izochromosomos yra metacentrinės ir turi du vienodus pečius, kurie yra arba genetiškai identiški (homozigota pagal visas genetines sritis) arba neidentiški (heterozigota pagal kai kurias genetines sritis). Dažniausia izochromosoma žmonių populiacijoje yra izochromosoma iš Xq (~1 iš 13000). Daugiau nei 15% individų su Turnerio sindromu turi i(Xq) (Shaffer ir Lupski, 2000). Izochromosomos iš Xq yra pakankamai dažnos, kadangi i(Xq) inaktyvacija apsaugo nuo nenormalaus dozės efekto (Miller ir Therman, 2001).

Žiedinės chromosomos

Žiedinė chromosoma yra chromosoma, kurios trumpasis ir ilgasis pečiai susijungia suformuodami žiedo pavidalo struktūrą.

Kliniškai nustatomų žiedinių chromosomų dažnis yra 1/25000 (Jackobs, 1981). Nors žiedinės chromosomos yra labai retos, tačiau tokias struktūras gali suformuoti visos žmogaus chromosomos (Schinzel, 2001). Dauguma žiedinių chromosomų susiformuoja įvykus trūkiams terminaliniame trumpojo ir ilgojo peties gale, kuriems susijungus prarandamas tam tikras genetinės medžiagos kiekis (Miller ir Therman, 2001). Tačiau yra aprašyti ir kiti žiedo formavimosi mechanizmai: susijungus atitrūkusiam chromosomos galui su priešingu telomeros regionu (Henegariu ir kt., 1997); susijungus subtelomerinei sekai (Vermeesch ir kt., 2002) arba susijungus telomera – telomera be genetinės medžiagos praradimo (Henegariu ir kt., 1997; Sigurdardottir ir kt., 1999).

Paprastai asmenys, kuriems atlikus citogenetinį tyrimą nustatoma žiedinė chromosoma, turi ir antrą ląstelių liniją, kuriai nėra būdinga žiedinė chromosoma, dėl žiedinės chromosomos nestabilumo mejozės metu, kuri lemia seserinių chromatidžių apsikeitimas. Šie seserinių chromatidžių pokyčiai gali lemti dicentrinio žiedo formavimąsi, kuris išlieka tilto-trūkio-susijungimo-tilto ciklą ir galiausiai prarandamas. Tokiu būdu susidaro monosominių ląstelių linija, monosominės ląstelės gali būti gyvybingos arba negyvybingos (Miller ir Therman, 2001). Žiedinės chromosomos formavimasis paprastai yra sporadinis įvykis, kuris gali vykti mejozės metu arba post-zigotiniu periodu, nors yra keletas ir šeimų atvejų. Dauguma žiedinių chromosomų susidaro *de novo*, tik <1% visų žiedinių chromosomų yra paveldimos (Kosztolanyi ir kt., 1991). Dažniausiai paveldimos žiedinės chromosomos yra 20-a, 21-a, 22-a chromosomos.

Žiedinės chromosomos gali sukelti problemų vykstant ląstelės dalijimuisi arba lemti vystymosi anomalijas, pvz., žiedinės 20-os chromosomos sindromas yra susijęs su epilepsija, žiedinės 14-os ir 13-os chromosomų sindromai susijęs su protiniu atsilikimu ir dismorfiniais veido bruožais, žiedinės 15-os chromosomos sindromas susijęs su protiniu atsilikimu, žemaūgyste ir mikrocefalija, žiedinė X chromosoma lemia Turnerio sindromą. Tačiau žiedinė chromosoma gali neturėti įtakos fenotipui – nesukelti raidos sutrikimų. Kaip ir visų chromosomų struktūros persitvarkymų atveju, žiedinių chromosomų įtaka fenotipui priklauso nuo trūkio taškų vietos, žiedo dydžio, kiek prarasta genetinės medžiagos, kurioje chromosomoje įvyko mutacija ir kt. (Human Genome Project Information, 2005).

Markerinės chromosomos

Markerinės chromosomos apibūdinamos kaip mažos struktūriškai nenormalios chromosomos, kurių kilmė nėra žinoma. Markerinių chromosomų kilmė gali būti nustatyta pasinaudojant molekuliniais metodais, tokiais kaip FISH.

Markerinės chromosomos paprastai randamos kaip papildomos chromosomos atliekant rutininę citogenetinę analizę (~1 iš 2000 individų įprastoje populiacijoje). Žmonių populiacijoje dažniausios markerinės chromosomos kilusios iš X chromosomos, 15-os chromosomos ir 22-os chromosomos. Markerinės chromosomos, kilusios iš 15-os chromosomos, yra dažniausi autosomų markeriai žmonių populiacijoje (sudaro ~40% visų markerinių chromosomų) ir gali būti randamos fenotipiškai normaliuose individuose bei protiškai atsilikusių žmonių populiacijoje (Shuffer ir Lupski, 2000).

2.3.3. Chromosomų struktūros persitvarkymų nustatymo metodai

Chromosomų struktūros persitvarkymai nustatomi įvairiais vis tobulėjančiais metodais. 1956–1960 m. žmogaus kariotipas buvo tiriamas naudojant Giemza dažus. Tai leido tiksliai nustatyti chromosomų skaičių bei stambesnius chromosomų struktūros pokyčius (Janet ir Rowley, 2001). Naudojant šį dažymą chromosomos pirmiausia paveikiamos tripsinu arba karščiu, kad būtų pašalinti iš chromatino baltymai.

Nuo 1970m. pradėti taikyti chromosomas ruožuojantys metodai (R, Q, NOR ir C dažymas). Naudojant šiuos metodus yra išryškinamos skirtingos chromosomų sritys. Dažant Q metodu, nereikia ląstelių veikti jokiais kitais reagentais, išskyrus kvinakriną. Kvinakriną pirmiausia ruožuoja G-C turtingas DNR sritis (Janet ir Rowley, 2001). Nudažius chromosomas galima nustatyti, ar pakitusi jos struktūra – ar nėra segmentų trūkumo ar pertekliaus. Chromosomas ruožuojančių metodų trūkumas yra tai, kad negalima nustatyti smulkių ir sudėtingų translokacijų (Mathew ir Rao, 2001).

Nuo 1980m. pradėtas naudoti FISH metodas. Molekulinis citogenetinis metodas, vadinama FISH, iš esmės pakeitė chromosomų analizę (Levsky ir Singer, 2003). FISH metodu galima aptikti paslėptus sudėtingus chromosomų persitvarkymus (Patsalis ir kt., 2001). FISH metodu galima nustatyti, kokios chromosomos dalyvauja translokacijoje, ir kokie fragmentai buvo translokuoti, taip pat mikrodelecijas, prarastą genetinę medžiagą, mikroduplikacijas, nustatyti markerinių chromosomų kilmę.

Chromosomų tapymas (angl. *FISH painting*) pagrįstas chromosomų dažymu, skirtingos chromosomų poros nudažomos skirtingomis spalvomis. Pagal spalvų pasiskirstymą galima tiksliai pasakyti, tarp kokių chromosomų vyko translokacija, tačiau ne visada aišku, kuri segmentą

chromosoma gavo ar prarado, todėl naudojami DNR žymenys – žymėti fluorochromu, specifiniai tam tikrai chromosomos DNR sričiai. Juos pasirenkant svarbu žinoti ar bent numanyti, koks chromosomos segmentas persikėlė. Priklausomai nuo naudojamo DNR žymens, gali būti selektyviai pažymėta chromosoma, chromosomos dalis, regionas ar netgi vienas genas (Michilsen, 1999).

FISH tapo svarbiu molekulinio-citogenetiniu metodu tam tikrų genomo vietų tyrimams. FISH leidžia gauti informaciją apie žmogaus genomo regioną, kuris yra per mažas, kad būtų galima pastebėti rutinine citogenetine technika. FISH yra standartinis metodas žinomų mikrodelecijų ir mikroduplikacijų nustatymui.

3. TYRIMŲ METODIKA IR MEDŽIAGOS

3.1. Medžiagos

3.1.1. Tiriamoji medžiaga

Tiriamoji medžiaga – limfocitai, gaunami iš veninio paciento kraujo. Kraujas renkamas į 2ml arba 5ml vakuuminius mėgintuvėlius. Šių mėgintuvėlių vidus padengtas ličio heparino antikoaguliantu. Kad būtų išlaikytas tinkamas kraujo ir antikoagulianto santykis, mėgintuvėliai pilnai užpildomi krauju.

3.1.2. Reagentai, naudojami limfocitų kultūros užsėjimui

- Terpė RPMI 1640 su L-glutaminu;
- Antibiotikas – kanamicinas;
- Fetalinis veršiuko serumas;
- Fitohemagliutininas (FHA);
- Timidinas;

3.1.3. Tirpalai, naudojami limfocitų kultūros fiksavimui

Kolchicinas – mitozinį dalijimąsi sustabdantis reagentas;

Hipotoninis 0,55% NaCl tirpalas (0,55g NaCl ir 100ml H₂O);

Fiksacijos tirpalas, ruošiamas prieš pat procedūrą, santykiu 3:1 (3 dalys metanolio ir 1 dalis ledinės acto rūgšties).

3.1.4. Tirpalai, naudojami chromosominio preparato dažymui G metodu

- KH₂PO₄ tirpalas (9,1g KH₂PO₄ ir 1000ml H₂O);
- K₂HPO₄ tirpalas (19,5g K₂HPO₄ ir 1000ml H₂O);
- Fosfatinis buferis (pH 7,0) (KH₂PO₄ tirpalas ir K₂HPO₄ tirpalas santykiu 1:1,5);
- 0,25% tripsino tirpalas (0,25g tripsino ir 100ml buferio);

- “Giemza“ dažas (0,4% Giemza tirpalas);

Analizuojant chromosominį preparatą mikroskopu, mikroskopavimui naudojamas imersinis aliejus (N₂₀D - 1,5).

3.1.5. Tirpalai, naudojami FISH metodui

- **0,01 N HCl tirpalas** (1 ml 1 N HCl + 99 ml distiliuoto H₂O)

Tirpalas laikomas 4° C temperatūroje. Tirpalo galiojimo laikas iki 4 mėn.

- **10 % pepsino tirpalas** (0,1 g liofilizuoto pepsino + 1 ml distiliuoto H₂O)

Tirpalas išpilstomas po 20 µl ir laikomas – 20° C temperatūroje.

- **Darbinis 0,005 % pepsino tirpalas** (20 µl 10 % pepsino tirpalas + 40 ml 0,01HCl)

Tirpalas ruošiamas prieš pat naudojimą.

- **20X SSC tirpalas** (132 g 20X SSC + 400 ml distiliuoto H₂O)

Dar įpilama distiliuoto H₂O iki galutinio 500 ml tūrio. Pakoreguojamas pH iki 5,3 su HCl. Perfiltruojama per 0,45 µm filtrą. Laikoma kambario temperatūroje. Tirpalo galiojimo laikas iki 6 mėn.

- **2X SSC tirpalas** (100 ml 20X SSC + 850 ml distiliuoto H₂O)

Pakoreguojama pH iki 7 – 8. Dar įpilama distiliuoto H₂O iki galutinio 1000 ml tūrio. Tirpalo galiojimo laikas iki 6 mėn.

- **Pofiksacinis formaldehido tirpalas** (37 ml PBS (fosfatinės druskos buferio) + 12,5 ml 37 % formaldehido tirpalo + 1 ml MgCl₂)

Tirpalas galioja savaitę.

- **Denatūracijos tirpalas** (36 ml 70 % formamido tirpalo + 5 ml 20X SSC (pH 5,3) + 10 ml distiliuoto H₂O)

Pakoreguojama tirpalo pH iki 7 – 8. Tirpalas laikomas ne ilgiau kaip 7 dienas 2 – 8°C temperatūroje.

- **Etanolio atplovimo tirpalai:**

70 % etanolio atplovimo tirpalas (36 ml 96 % etanolio + 14 ml dist. H₂O)

85 % etanolio atplovimo tirpalas (44 ml 96 % + 5 ml dist.H₂O)

96% etanolio atplovimo tirpalas

Etanolio atplovimo tirpalai kambario temperatūroje gali būti laikomi savaite.

- **0,3 % NP – 40 0,4X SSC buferyje** (3 ml NP – 40 + 20 ml 20X SSC (pH 5,3) + 977 ml distiliuoto H₂O)

Pakoreguojama pH iki 7 – 7,5. Tirpalai perfiltruojami. Laikomi kambario temperatūroje neilgiau kaip 6 mėn.

- **0,1 % NP – 40 2X SSC buferyje** (1 ml NP – 40 + 100 ml 20X SSC + 899 distiliuoto H₂O)

Pakoreguojama pH iki 7 – 7,5. Tirpalai perfiltruojami. Laikomi kambario temperatūroje neilgiau kaip 6 mėn.

3.1.6. Žymenys, naudojami FISH metodui

7 lentelė. Informacija apie žymenis naudojamus FISH metodui.

VYSIS žymenys	Kiekis	Sudėtis	Laikymo sąlygos
LSI DNR zondai	20 µl	VYSIS™ fluoroforais pažymėti zondai, blokuojantys DNR	- 20° C
LSI/WCP hibridizacijos buferis	150 µl	Dekstrano sulfatas, formamidas, SSC	- 20° C

3.2. Tyrimų metodai

3.2.1. Rutininis kariotipo tyrimas G metodu

Kraujo kultūros užsėjimas

Bandinys į laboratoriją pristatomas specialiuose mėgintuvėliuose su ličio heparino antikoaguliantu. Sėjama iš karto. Jei nėra tokios galimybės ėminys 72 valandas gali būti laikomas +4°-+6°C temperatūroje.

Užsėjimo procedūra atliekama laminariniame bokse, steriliomis sąlygomis, virš spiritinės lemputės liepsnos. Kiekvieno paciento kraujo bandinys užsėjamas į du 15ml sterilius centrifuginius Falcon tipo mėgintuvėlius. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama po 6ml RPMI terpės (su kanamicino antibiotiku), 1ml veršiuko serumo su fitohemagliutinino tirpalu (galutinė FHA koncentracija tirpale 10µg/ml). Į paruoštą terpę įlašinama 0,5ml (8 lašai) paciento kraujo. Mišinys švelniai sumaišomas, kad kraujas tolygiai pasiskirstytų po terpę. Mėgintuvėliai patalpinami į 37°C sauso oro termostatą. Praėjus 48 valandoms po limfocitų kultūros išsėjimo, į vieną mėgintuvėlį įpilama 100µl timidino ir paliekama termostate 16-18 valandų. Po to timidinas atplaunamas terpe ir dar inkubuojama 4 valandas.

Kraujo kultūros fiksavimas

Likus vienai valandai iki limfocitų kultūros augimo pabaigos, įdedama 0,5ml kolchicino tirpalo, kuris sustabdo mitozinį dalijimąsi. Mišinys švelniai sumaišomas ir paliekamas termostate 30 min.

Praėjus nustatytam laikui, kraujo kultūra išimama iš termostato ir kambario temperatūroje centrifuguojama 5min, 1500aps./min. Susidaręs supernatantas nusiurbiamas, į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama po 6ml hipotoninio 0,55% KCl tirpalo, nuosėdos švelniai suspenduojamos. Ląstelių suspensija su hipotoniniu tirpalu 20min inkubuojama termostate 37° C temperatūroje. Po inkubacijos vėl centrifuguojama 5min 1500aps./min. kambario temperatūroje, supernatantas nusiurbiamas, o ląstelės suspenduojamos su 5ml fiksatoriaus (fiksatorius paruošiamas prieš pat naudojimą, sumaišant ledinę acto rūgštį su metanoliu santykiu 3:1). Atplovimo fiksatoriumi procedūra kartojama 3 kartus.

Preparato paruošimas

Paimame nuriebalintą šlapią objekcinį stiklėlį ir 20-30cm atstumu lašinami 2- 3 lašai suspensijos. Preparatai 2 paras džiovinami termostate, esant +37°C temperatūrai arba 16 – 18 valandų , esant +62°C temperatūrai.

Chromosominio preparato dažymas G metodu

Paruoštas dažymui objektinis stiklelis 15-30 sekundžių inkubuojamas 0,25% tripsino tirpalu. Iš kart po to preparatas nuplaunamas tekančio vandens srove. Tada 2–3 minutes dažoma 0,4% Giemza dažų tirpalu. Dažai nuplaunami tekančio vandens srove. Išdžiovinti preparatai naudojami kariotipo analizei.

Metafazinių chromosomų preparato analizė

Nudažytas preparatas analizuojamas optiniu mikroskopu ir kompiuterine vaizdų analizės sistema.

Metafaziniai chromosomų preparatai buvo analizuoti šviesiniu mikroskopu per 10x okuliarą ir mažąjį mikroskopo x10 objektyvą (matomas 100 kartų padidintas vaizdas). Kiekviename preparate ieškoma metafazinių plokštelių, peržiūrint objektinį stiklėlį nuosekliai, nuo pat apatinio dešiniojo kampo link viršutinio kairiojo kampo šachmatų žirgo žingsniu. Išrenkamos tinkamos chromosomų analizei metafazės. Jos analizuojamos naudojant didįjį mikroskopo objektyvą – imersinę sistemą (bendras padidinimas 1000x).

Darbas su automatine kariotipo analizės sistema

Ši programa skirta kariotipo tyrimui. Ji leidžia ne tik atlikti kariotipo tyrimą, bet ir nufotografuoti chromosomas, nuotraukas lyginti su ideogramomis.

Visa sistema susideda iš optinio mikroskopo (Olympus) ir kompiuterio.

Darbo su automatine kariotipo analizės sistema – CytoVision eiga:

1. Metafazinės plokštelės, tinkamos kariotipo analizei, suradimo.
2. Metafazės fotografavimas.
3. Vaizdų suliejimas.
4. Nuotraukų redagavimas.
5. Chromosomų atskyrimas.
6. Kariotipavimas.
7. Rezultatų interpretavimas.

Kariotipo analizės vertinimas

Išanalizuojama 20 metafazinių plokštelių, bent penkios iš jų yra nufotografuojamos bei kariotipuojamos, naudojant kompiuterinę analizės sistemą (išsaugomos metafazinių plokštelių

nuotraukos ir ideogramos). Kitose ideogramose suskaičiuojamas chromosomų skaičius, surandamos lytinės chromosomos (XX arba XY), analizuojama ar jų skaičius ir struktūra atitinka normalų X ir Y chromosomų skaičių ir struktūrą. Analizės protokole pažymimos visų analizuotų metafazių koordinatės.

Kiekvieno tyrimo rezultatai užrašomi citogenetinio tyrimo protokole ir "Analičių registravimo žurnale" pagal ISCN nomenklatūrą. Gydytojui paskyrusiam tyrimą, atsakymas pateikiamas specialiaame lapelyje (pagal formą patvirtintą LR SAM įsakymu Nr 391. 2000 09 21). Atsakymo formoje nurodoma chromosominė liga. Tyrimų rezultatai užrašomi vadovaujantis tarptautinės citogenetinės nomenklatūros reikalavimais.

3.2.2. Fluorescensinės *in situ* hibridizacijos metodas

Kraujo kultūros užsėjimas (žr. 3.2.1. sk.)

Kraujo kultūros fiksavimas (žr. 3.2.1. sk.)

Preparato paruošimas

Paimame nuriebalintą šlapią objektinį stiklėlį ir 20-30cm atstumu lašinami 2- 3 lašai suspensijos. Preparatai 1 val. džiovinami termostate, esant 100°C temperatūrai.

Analizavimo vietos suradimas ir pažymėjimas

Metafaziniai chromosomų preparatai analizuojami šviesiniu mikroskopu per 10X okuliarą ir mažąjį mikroskopo objektyvą (matomas 100 kartų padidintas vaizdas). Kiekviename preparate surandamas 1 cm² plotas, kuriame yra bent 20 metafazių. Vieta, kurioje yra pakankamai metafazių, pažymima, iš apatinės objektinio stiklelio pusės apibrėžiant specialiu stiklo rėžtuku. Tam, kad paprasčiau būtų susirasti metafazes, analizuojant preparatus po hibridizacijos, dar prieš atliekant FISH fazinio kontrasto šviesos pagalba surandamos tinkamos metafazės ir užrašomos jų koordinatės.

Paruošto preparato denatūracija

➤ Stiklų su metafazinėmis chromosomomis paruošimas:

1. Vandens vonelėje pakeliama temperatūra iki 73±1° C. Į vonelę įdedamas Coplin indas su paruoštu 2X SSC tirpalu.
2. Paruošti objektiniai stikleliai įmerkiama į Coplin indą su 2X SSC tirpalu. Laikomi 2 min.

➤ Stiklų nuplovimas proteaze:

1. Kitoje vandens vonelėje pakeliama temperatūra iki 37° C temperatūros. Į vonelę įdedamas Coplin indas su 0,005% pepsino tirpalu.
2. Į šį tirpalą įdedami objektiniai stikleliai. Laikoma 10 min. (tuo metu ruošiamas hibridizacijos mišinys)
3. Išimami objektiniai stikleliai iš pepsino tirpalo ir įmerkami į PBS (fosfatinės druskos buferį) tirpalą. Laikoma 5 min. kambario temperatūroje.

➤ Stiklų fiksavimas:

1. Objektiniai stikleliai perdedami į posfiksacinį formaldehido tirpalą. Laikoma 5 min.
2. Objektiniai stikleliai vėl dedami į PBS tirpalą. Laikoma 5 min.
3. Objektiniai stikleliai dehidratuojami atitinkamai po 1 min. 70 %, 85 % bei 96 % etanolio tirpaluose.

➤ Tiriamos DNR denatūracija:

1. Į 73±1° C vandens vonelę įdedamas Coplin indas su denatūracijos tirpalu.
2. Objektiniai stikleliai įdedami į Coplin indą su denatūracijos tirpalu. Laikoma 5 min.
PASTABA: į vieną Coplin indą dėti ne daugiau negu 4 stiklelius.
3. Objektiniai stikleliai dehidratuojami po 1 min. atitinkamai 70 %, 85 % bei 96 % etanolio tirpaluose.

Hibridizacijos mišinio ruošimas

Procedūra vykdoma patalpoje, kur nėra tiesioginių šviesos spindulių.

Hibridizacijos mišinys ruošiamas preparatų denatūracijos metu. Į ependorfinį mėgintuvėlį įdedama 7 µl LSI/WCP hibridizacijos buferio, 2 µl žymenų, 1 µl distiliuoto vandens.

PASTABA: hibridizacijos mišinio ruošimas priklauso nuo tyrimų skaičiaus (objektinių stiklių skaičiaus) - dirbant su daugiau nei vienu stikleliu, atitinkamai tiek kartų reikia padidinti kiekvieno komponento kiekį.

Mišinys atsargiai sumaišomas su purtykle.

Hibridizacijos mišinio denatūracija

Vandens vonelėje pakeliama temperatūra iki 73±1° C. Tada į vonelę įdedamas ependorfinis mėgintuvėlis su hibridizacijos mišiniu. Laikoma 5 min.

PASTABA: mėgintuvėlio dalis, kurioje yra susitelkęs hibridizacijos mišinys turi būti pilnai panirus į vandenį.

Hibridizacija

1. Ant pažymėtos objekcinio stiklelio vietos užlašinama 10 µl hibridizacijos mišinio. Tuo metu preparato stiklelis laikomas ant 50° C kaitinimo plokštelės.
2. Uždengiama dengiamuoju stikleliu taip, kad nebeliktų oro burbuliukų.
3. Dengiamojo stiklelio kraštai apliejami gumos kliju.
4. Stiklai patalpinami į drėgną, šiltą kamerą.
5. Stiklai inkubuojami – vyksta hibridizacija, apie 16 val.

Pohibridizacinis atplovimas

1. Vandens vonelėje pakeliame temperatūrą iki 73±1° C. Į vonelę įdedame Coplin indą su 0,4X SSC/0,3 %/NP - 40 tirpalu (tirpalas Nr. 9).
2. Nuo objekcinio stiklelio nuimami dengiamasis stiklelis ir gumos kliju.
3. Stiklai patalpinami į koplina su 73° C 0,4 × SSC/ 0,3% NP - 40 ir laikomi 2 min.
4. Perkeliame stiklai į 2X SSC/0,1% NP – 40 ir laikomi 1 min.
5. Stiklai trumpai praskalaujami distiliuotu H₂O.
6. Išdžiovinama kambario temperatūroje, tamsoje, vertikaloje padėtyje.

Preparatų dažymas

1. Ant objekcinio stiklelių, apibrėžtoje vietoje, užlašinama 10 µl DAPI .
2. Uždengiama dengiamuoju stikleliu.
3. 15 min. palaikomi – 4° C temperatūroje.

Preparatų analizavimas

Nudažytas preparatas analizuojamas optiniu mikroskopu ir kompiuterine vaizdų analizės sistema. Analizavimui yra naudojama citogenetinė kompiuterinė programa Lucia 4.81. Preparatai analizuojami epifluorescenciniu mikroskopu Nikon Eclipse 80i. Per 10X okuliarą ir mažąjį mikroskopo x10 objektyvą (matomas 100 kartų padidintas vaizdas) ieškoma metafazinių plokštelių. Per didįjį mikroskopo objektyvą – imersinę sistemą (padidinimas 1000X) analizuojamos metafazės bei interfaziniai branduoliai.

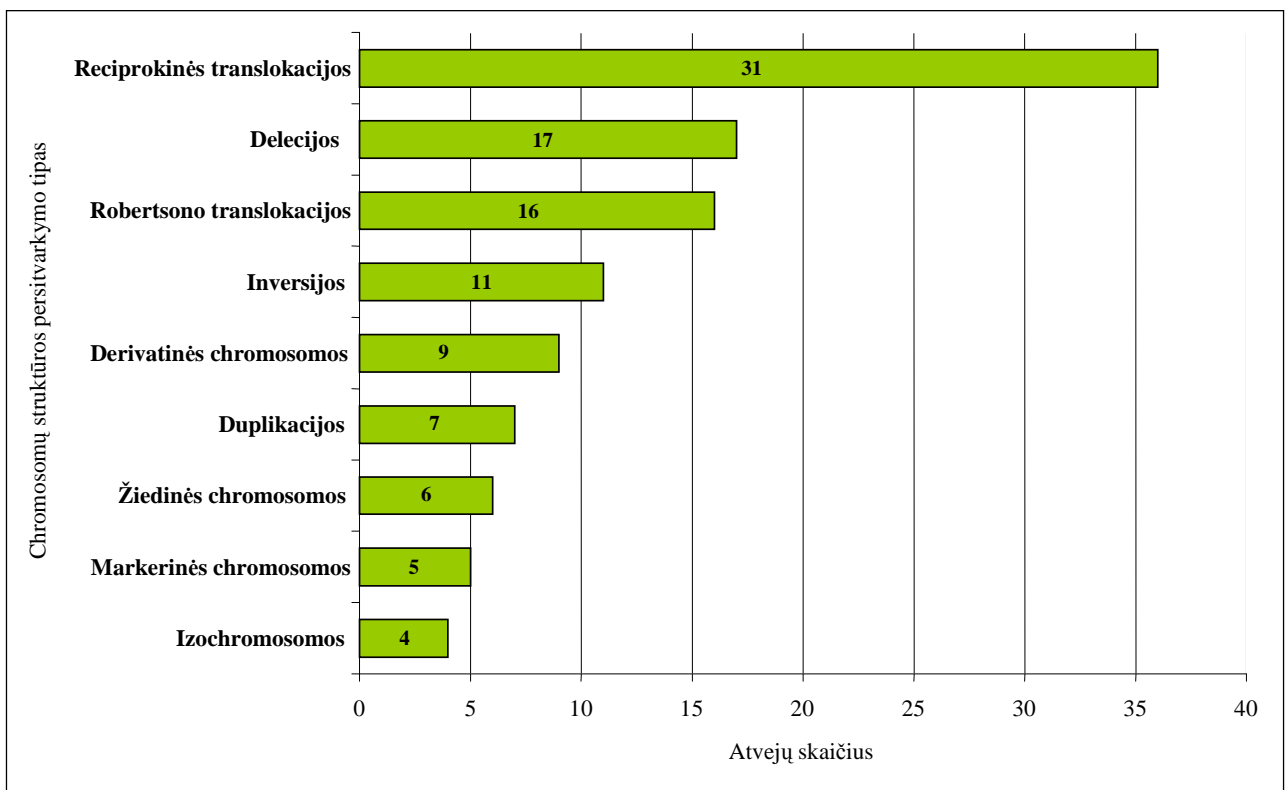
Analizavimo etapai:

- 1) Imersiniu objektyvu susirandama tinkama analizei metafazė arba interfaziniai branduoliai.
- 2) Keičiant filtrus patikrinama, ar gerai matosi visi signalai.
- 3) Nustatomas fotografavimo režimas.
- 4) Fotografuojama.
- 5) Reguliuojamas chromosomų bei signalų ryškumas;
- 6) Apibrėžiama metafazė, šalia esantys branduoliai bei signalai, taip jie dar atskiriami nuo pašalinių objektų ir dar labiau išryškinami.
- 7) Išsaugomas išryškintas vaizdas.
- 8) Įvedami paveikslėlio nr. ir koordinatės.
- 9) Parašomas atsakymas.

4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

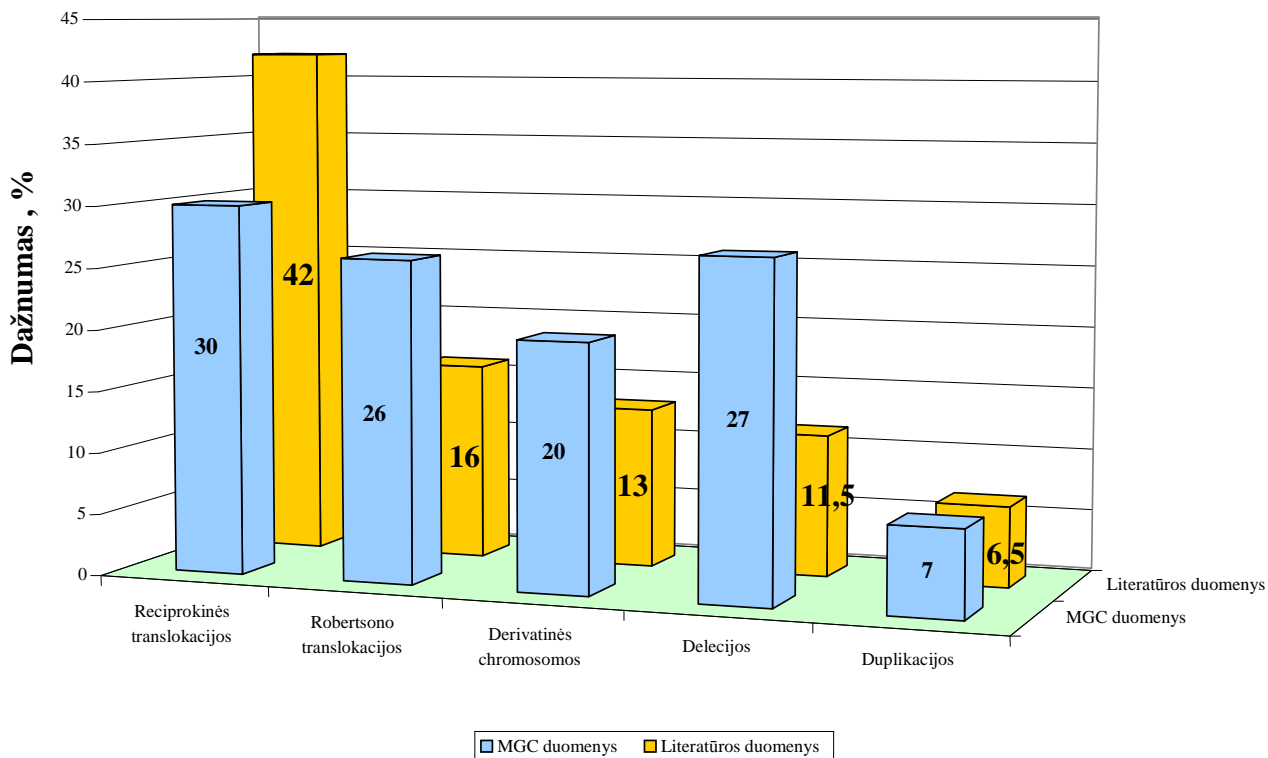
Magistrinio darbo metu naudojant G dažymo metodą, FISH metodą ir kariotipo analizės sistemas – CytoVision bei Lucia 4.81 buvo atlikti 78 citogenetiniai kariotipo tyrimai bei 20 FISH tyrimų. Tam, kad būtų įvertinta chromosomų struktūros persitvarkymų įvairovė, buvo analizuojami 2002-2008 metais atlikti kariotipo tyrimai.

Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų Medicininės genetikos centro (VšĮ VUL SK MGC) citogenetikos laboratorijoje 2002–2008 metais identifikuoti 106 chromosomų struktūros persitvarkymai (8 pav.), tarp kurių buvo markerinės ir derivatinės chromosomos, mozaikiniai ir šeiminiai chromosomų struktūros persitvarkymų variantai. Dažniausiai tarp chromosomų struktūros persitvarkymų buvo minima 14-ta chromosoma, tuo tarpu struktūros persitvarkymų, susijusių su 19-ta ir Y chromosomomis, nebuvo nustatyta. Chromosomų struktūros persitvarkymai rob(13;14), t(11;22), del(18), inv(2), inv(9), literatūroje aprašomi kaip vieni dažniausių, buvo nustatyti ir Lietuvoje.



8 pav. Chromosomų struktūros persitvarkymų, nustatytų MGC 2002-2008 m., įvairovė.

Lyginant 2002-2008 metais MGC atliktų kariotipo tyrimų rezultatus su literatūroje pateikiamu skirtingų tipų chromosomų struktūros pakitimų dažnumu (9 pav.), pastebime, kad duomenys yra panašūs. Dažniausias chromosomų struktūros persitvarkymas yra translokacija, rečiausias – duplikacija.

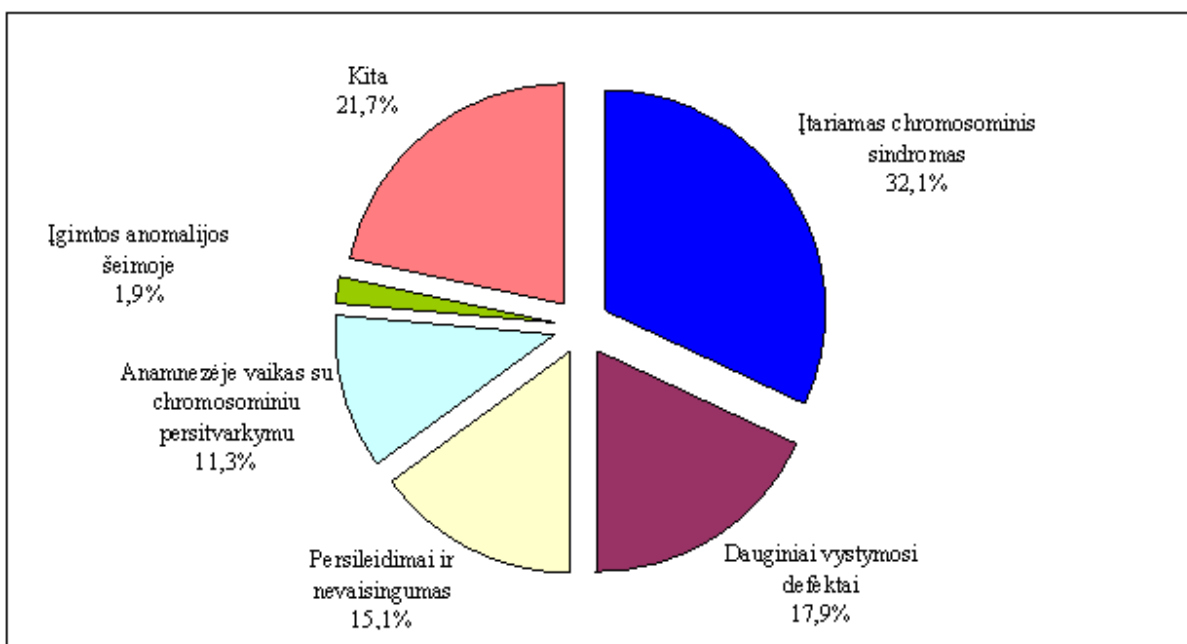


9 pav. 2002-2008 metais MGC atliktų kariotipo tyrimų rezultatų palyginimas su literatūroje pateikiamais duomenimis (Shaffer ir Lupski, 2000).

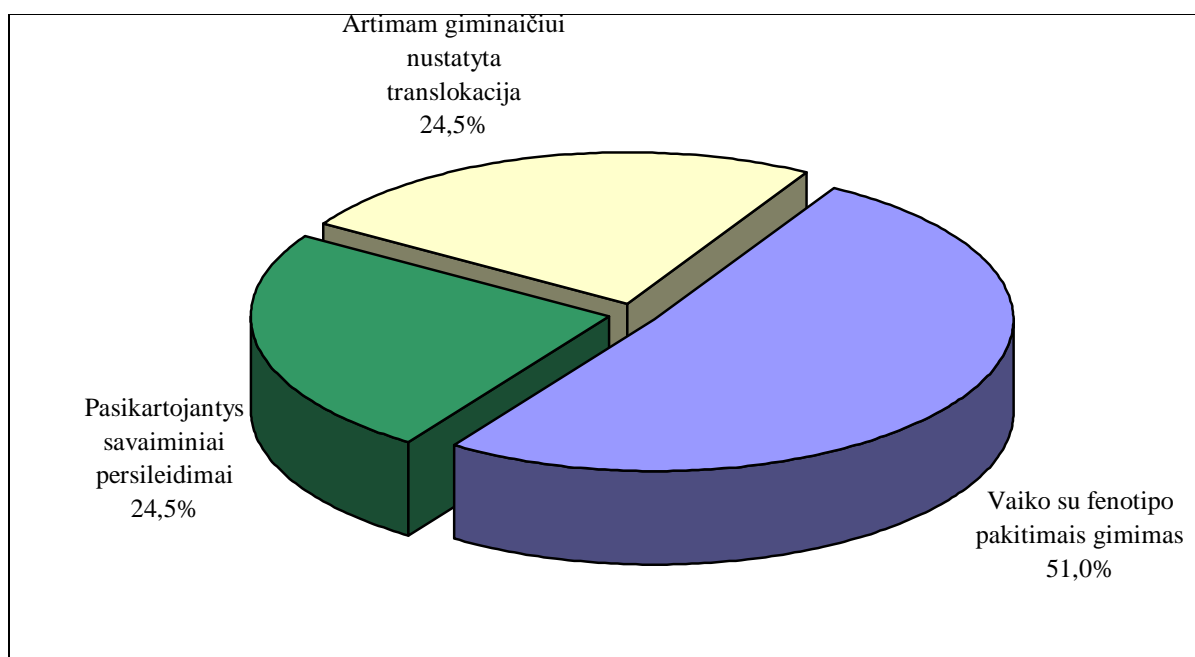
Indikacijų, dėl kurių 2002–2008 m. MGC atlikus kariotipo analizę buvo nustatyti chromosomų struktūros pakitimai, pasiskirstymas pateiktas 10 paveiksle.

4.1. Subalansuoti chromosomų struktūros persitvarkymai

24 tiriamieji asmenys (49%), kuriems buvo nustatytas subalansuotas chromosomų struktūros persitvarkymas – translokacija arba inversija, neturi fenotipo pakitimų. Taigi, manoma, kad nebuvo pažeisti trūkio vietoje esantys svarbūs genai. Šių asmenų kariotipai buvo tirti dėl nevaisingumo, pasikartojančių savaiminių persileidimų, vaiko su įgimtomis anomalijomis gimimo arba po to kai artimam giminaičiui buvo nustatyta chromosomos struktūros patologija (11 pav.).



10 pav. Indikacijos, kuriomis remiantis 2002–2008 m. MGC atlikus kariotipo analizę buvo nustatyti chromosomų struktūros pakitimai, pasiskirstymas.



11 pav. Indikacijos, kuriomis remiantis fenotipiškai sveikiems asmenims buvo nustatyti subalansuoti chromosomų struktūros persitvarkymai.

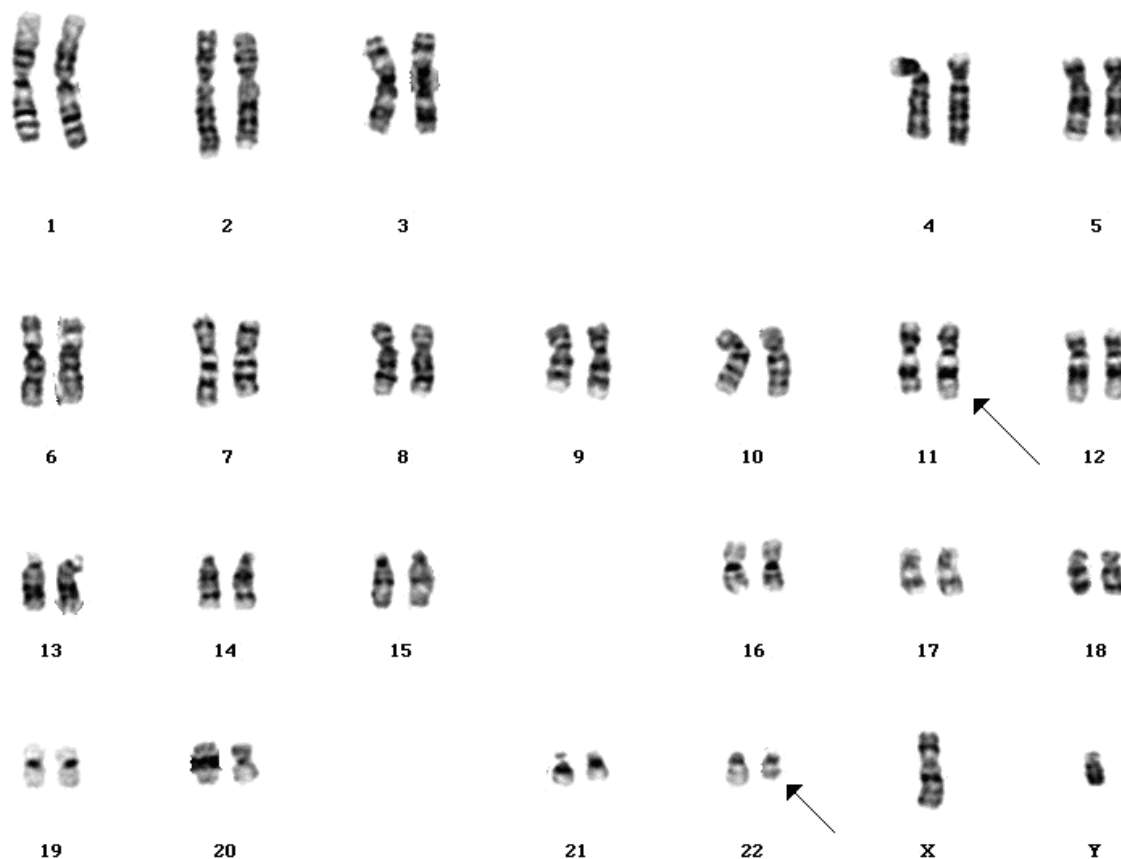
25 pacientų, t.y. 51,5% subalansuotų chromosomų struktūros pakitimų nešiotų, pasireiškė tam tikri fenotipo pakitimai. Todėl manoma, kad vykstant persitvarkymui įvyko mikroleccija iki 5 kb,

kuri įprastu G dažymo metodu nepastebima, arba susijungus trūkio taškams susidarė naujas genas, koduojantis hibridinį geną, sutriko geno funkcija dėl pasikeitusios jo padėties.

Translokacijos

Dažniausias chromosomų struktūros persitvarkymas yra translokacija, kuri sudaro 44.3% visų chromosomų struktūros persitvarkymų, nustatytų VUL SK MGC citogenetikos laboratorijoje 2002–2008 m. Nustatytos 24 skirtingos reciprokinės translokacijos ir 3 skirtingos Robertsono translokacijos. Dauguma reciprokinių translokacijų yra unikalios kiekvienu atskiru atveju. Mažai tikėtina, kad chromosomų trūkiai įvyktų tame pačiame regione dviem atskirais nesusijusiais atvejais, išskyrus tuos atvejus, kai chromosomų trūkio taškai lokalizuoti centromeroje. Labiau tikėtina, kad individai turintys identišką chromosomų struktūros persitvarkymą yra giminaičiai. Tačiau yra atvejų, kai translokaciją su identiškais trūkio taškais turi asmenys, kurių nesieja jokie giminystės ryšiai. VUL SK MGC nustatyta reciprokinė translokacija – $t(13;20)(p11.1;p11.1)$ dviejose akivaizdžiai nesusijusiose genealogijose. Tokia pati translokacija su identiškais trūkio taškais aprašoma ir literatūroje (Oliver-Bonet, 2001). Taip pat nustatyta translokacija $t(11;22)(q23.3;q11.2)$, kuri literatūroje aprašoma, kaip labai dažnai *de novo* vykstanti translokacija (Kato ir kt., 2006), nustatyta daugiau kaip 100 nesusijusių skirtingų etninių grupių ir rasių asmenų (Fraccaro ir kt., 1980; Zackai ir Emanuel, 1980; Iselius ir kt., 1983). Procesas, kurio metu susidaro translokacija, yra susijęs su dvigrandžiais DNR trūkiais palindrominiuose AT turtinguose regionuose (PATTR) ir pažaidų taisymu reparacinės rekombinacijos metu (Kurahashi ir kt., 2001). PATTR suformuoja segtuko/ kryžiaus pavidalo struktūras, kuriose fiziologinėmis sąlygomis gali vykti dvigrandžiai DNR trūkiai (DDT). Pakanka 2 DDT, kad formuotųsi translokacija (Richardson ir Jasin, 1998). Dauguma šios translokacijos nešiotojų aptinkami susilaukus vaiko su fenotipiniu sutrikimu, kuriam atlikus kariotipo analizę nustatomas nesubalansuotas kariotipas – 47, XX /47, XY, +der(22)t(11;22)(q23;q11.2).

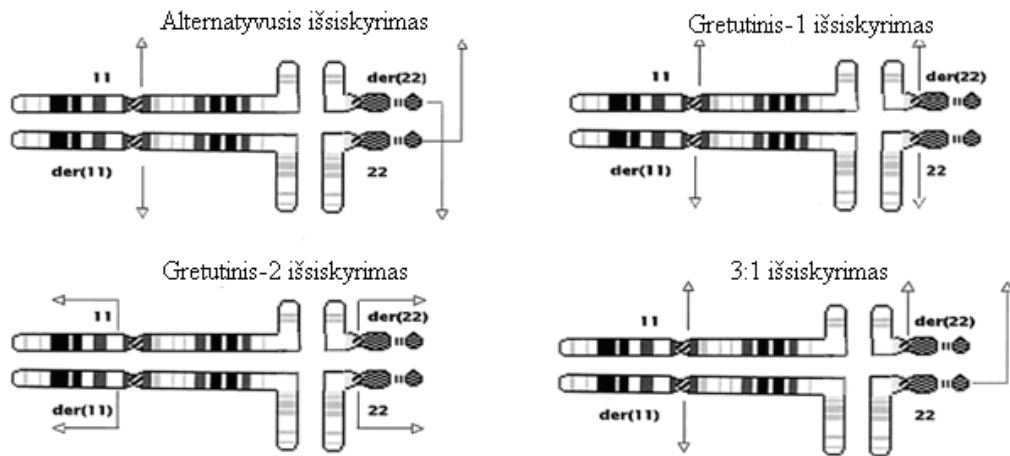
Asmuo, kuriam buvo nustatytas 46, XY, $t(11;22)(q23.3;q11.2)$ kariotipas (12 pav.), neturėjo fenotipo pakitimų, tačiau jo žmona patyrė savaiminį persileidimą. Tai galėjo įtakoti sutrikęs translokuotų chromosomų išsiskyrimas mejozės metu, t.y. chromosomiškai nesubalansuotų spermatozoidų produkcija. 13 paveiksle pavaizduoti galimi translokuotų chromosomų išsiskyrimo būdai. Vykstant gretutiniam išsiskyrimui susidaro genetiškai nesubalansuotos gametos, kurioms būdinga dalinė 11 arba 22 chromosomų disomija/nulisomija. Po apvaisinimo normalia gameta susidaro chromosomiškai nesubalansuota zigota. Yra didelė tikimybė, kad iš tokių zigotų besivystantys embrionai neišgyvens pilno nėštumo laikotarpio, ypatingai dėl dalinės 11 arba 22 chromosomų monosomijos.



12 pav. Kariotipas – 46, XY, t(11;22)(q23.3;q11.2). Rodykle pažymėtos pakitusios chromosomos.

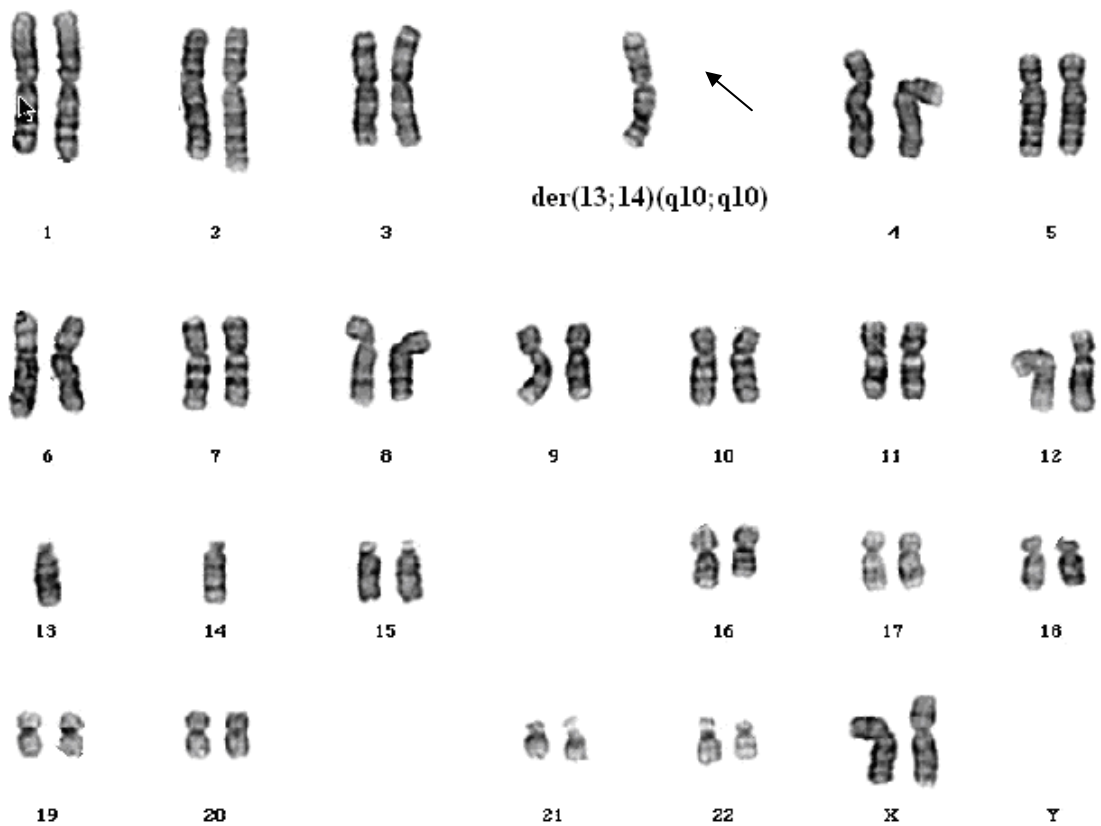
Savaiminis persileidimas galėjo įvykti ir dėl chromosomų išsiskyrimo 3:1 būdu, kadangi jo metu susidaro gametos turinčios dalinę 11 ir 22 chromosomų disomiją arba nulisomiją. Tačiau literatūroje teigiama, kad subalansuotos translokacijos t(11;22)(q23.3;q11.2) nešiotojams yra didelė tikimybė susilaukti palikuonio su papildoma derivatine chromosoma dėl 3:1 chromosomų išsiskyrimo (Estop ir kt., 1999). Vykstant 3:1 išsiskyrimui susidaro gameta, kuriai būdinga dalinė 11 ir 22 chromosomų disomija. Tokiai gametai susiliejus su normalia gameta susidaro zigota, iš kurios besivystantis embrionas gali išgyventi pilną nėštumo laikotarpį ir gimti naujagimis su fenotipo pakitimais – protiniu atsilikimu, nežymiomis kaukolės anomalijomis, įgimtais širdies defektais ir kt. Dauguma šios subalansuotos translokacijos nešiotųjų palikuonių turi nesubalansuotą kariotipą – 47 chromosomas su papildoma derivatine chromosoma. Tretinės trisomijos su derivatine 22 chromosoma tikimybė yra 3,7% ir 0,7 %, atitinkamai moterims ir vyrams t(11;22)(q23.3;q11.2) translokacijos nešiotojams (Gardner ir Sutherland, 2004). Tokį dažną 3:1 chromosomų išsiskyrimo būdą būtų galima paaiškinti tuo, kad pachitenos stadijoje mejozinis kvadrivalentas yra asimetriškas, o tai sutrikdo kvadrivalento orientaciją ekvatorinėje besidalinančios ląstelės plokštumoje. 13 paveiksle pateikti visi

galimi translokuotų chromosomų išsiskyrimo būdai. Taigi, jeigu moteris pastotų nuo vyro, t(11;22)(q23.3;q11.2) translokacijos nešiojo, jai turėtų būti atlikta prenatalinė kariotipo diagnostika.



13 pav. Translokuotų chromosomų išsiskyrimo būdai (pagal Estop AM, 1999).

Dažniausiai nustatoma translokacija buvo der(13;14)(q10;q10) (6 atvejai) (14 pav.). Ši Robertsono translokacija yra dažniausia žmonių populiacijoje (Youngs ir kt., 2004).



14 pav. Kariotipas – 45, XX, der(13;14)(q10;q10). Rodykle pažymėta pakitusi chromosoma – der(13;14)(q10;q10).

Dažnai Robertsono translokacijose dalyvauja ir 21-a chromosoma, trims pacientams nustatyta translokacija der(14;21)(q10;q10) ir keturiems der(21;21)(q10;q10) translokacija. Visi šie atvejai susiję su Dauno sindromu. Pacientams dėl papildomos 21 chromosomos pasireiškė Dauno sindromui būdingi požymiai. Chromosomiškai nesubalansuotas kariotipas susidarė vykstant gretutiniam translokuotų chromosomų išsiskyrimui.

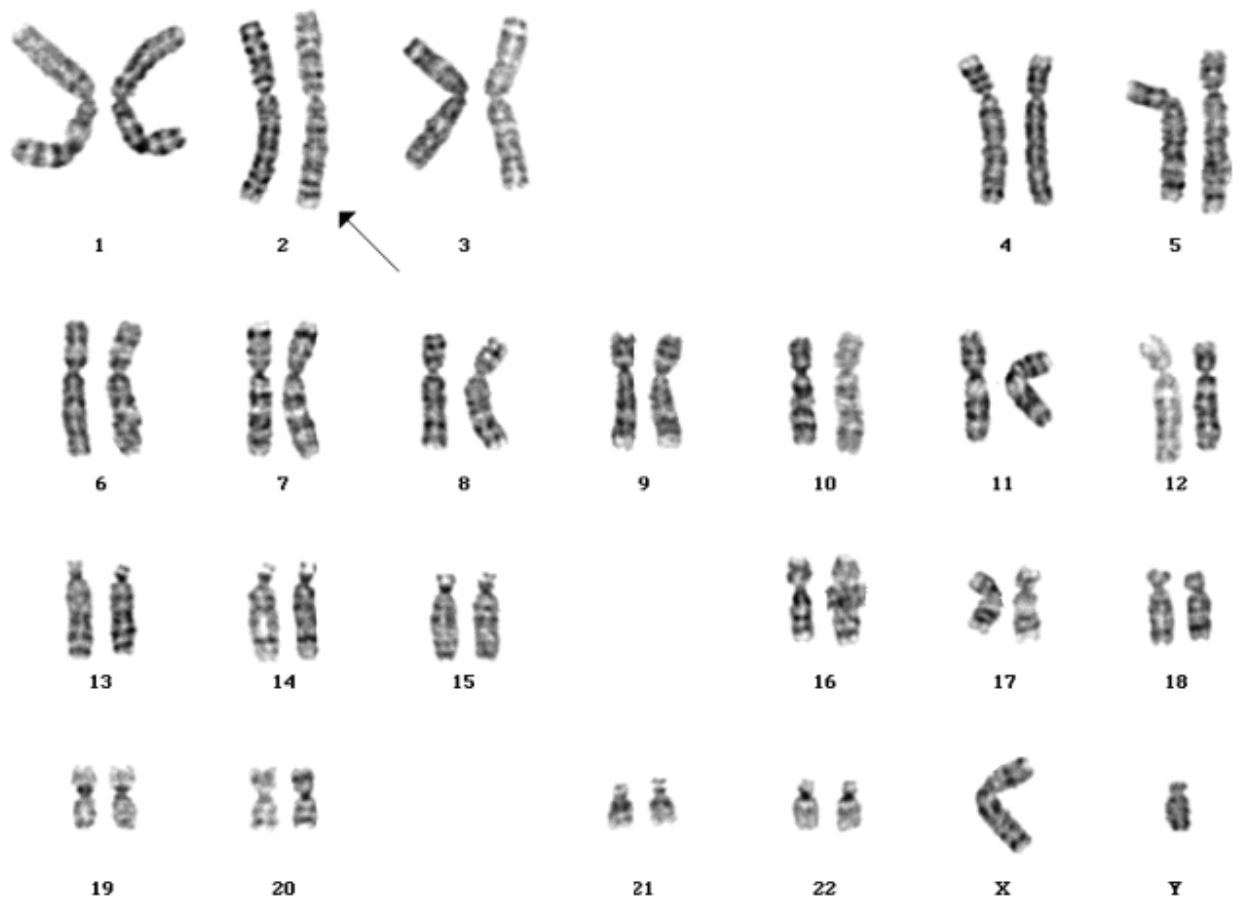
Literatūroje teigiama, kad 3–4% Dauno sindromo priežasčių yra translokacija, paprastai Robertsono translokacija (Benke ir Donahue, 1995). Taigi, beveik visiems asmenims, kuriems pasireiškia Dauno sindromui būdingi požymiai, yra atliekamas citogenetinis kariotipo tyrimas. Peržvelgus citogenetinių tyrimų, atliktų MGC 2002–2008 m., rezultatus, galima teigti, kad 3,87% pacientų su Dauno sindromo požymiais turi nesubalansuotą kariotipą su papildoma 21-a chromosoma dėl translokacijos, dažniausiai Robertsono. Per šį laikotarpį buvo nustatyti 181 kariotipai su papildoma 21 chromosoma, 7-iems iš jų 21-osios chromosomos trisomiją lėmė translokacija. Nors 21-osios chromosomos trisomija gali būti nustatoma skirtingais metodais (QF-PCR, ineterfaziniu FISH), tik paprastas kariotipavimas gali parodyti trisomijos tipą, todėl chromosomų dažymas G būdu ir analizė yra vertingesnis genetiniam konsultavimui (Šliužas ir kt., 2008).

Inversijos

Inversija taip pat dažnas, dažniausiai subalansuotas chromosomų struktūros persitvarkymas, tačiau dauguma jų vertinamos kaip heteromorfizmas – normos variantas. Per pastaruosius penkerius metus nustatyta 40 inversijų atvejų, iš jų net 29 pericentrinės inversijos inv(9)(p11q12-13), kurios interpretuojamos kaip normos variantas, paprastai nesusijęs su patologija. Literatūroje teigiama, kad pericentrinė inversija inv(9)(p11q13) yra vienas dažniausių chromosomų heteromorfizmų, kurios dažnis >2% įprastoje populiacijoje (Park ir kt., 1998).

Nors tik 9-os chromosomos inversija interpretuojama kaip heteromorfizmas, tačiau 2-os ir 10-os chromosomų inversijos taip pat yra dažnos (Hysert ir kt., 2006). VUL SK MGC 2002 – 2008 m. nustatyti trys paracentrinės inversijos inv(2)(p11.2q12) atvejai (15 pav.), dažnai aprašomi literatūroje, ir vienas inv(10)(p15q26.1) atvejis, kurio trūkio taškai nesutampa su literatūroje aprašoma inv(10). Sunku įvertinti šių chromosomų poveikį žmogaus genomui, kadangi genų padėties efektas gali veikti skirtingai kiekvienu atskiru atveju.

Manoma, kad kiti septyni MGC citogenetikos laboratorijoje nustatyti inversijų atvejai yra susiję su patologija. Du iš jų yra susiję inv(X) atvejai, kurie galėjo lemti Sotos sindromui būdingų požymių pasireiškimą.

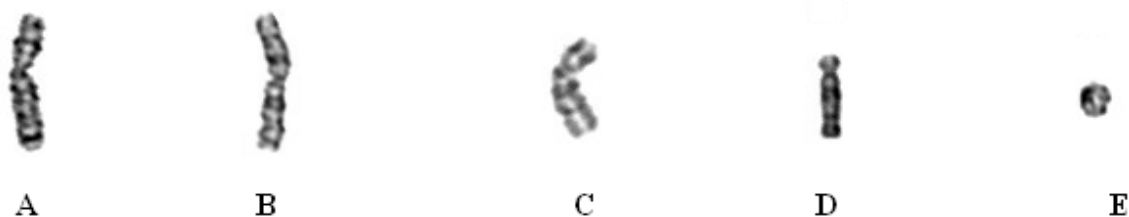


15 pav. Kariotipas – 46,XY, inv(2)(p11.2q12). Rodykle pažymėta invertuota chromosoma.

4.2. Nesubalansuoti chromosomų struktūros persitvarkymai

Nesubalansuoti chromosomų struktūros persitvarkymai – delecijos, duplikacijos, derivatinės chromosomos, izochromosomos, markerinės bei žiedinės chromosomos – žymiai retesni, kadangi kai kurie genomo regionai gali turėti kritinius dozei jautrius genus, todėl jų delecija arba duplikacija yra nesuderinama su gyvybe. 45% visų nesubalansuotų chromosomos struktūros persitvarkymų sudaro X chromosomos pakitimai. X chromosomoje nustatyta didžiausia struktūrinių persitvarkymų įvairovė – delecijos, izochromosomos, inversijos, žiedinės chromosomos, markerinės chromosomos (16 paveikslas). Tai rodo, kad X chromosomos anomalijos paprastai yra suderinamos su gyvybe, kai tuo tarpu nesubalansuoti struktūriniai persitvarkymai vykstantys autosomose dažniausiai yra mirtini. Vykstant mejozei vyriškame organizme bivalentas yra sudarytas iš X ir Y chromosomų, kurių didžioji

ilgio dalis yra nesuporuota. Taigi, joms yra galimybė neteisingai susiporuoti tarpusavyje arba su autosomomis susidarant delecijoms, duplikacijoms ar translokacijoms.



16 pav. X chromosomos struktūriniai pakitimai: A – normali X chromosoma; B – izochromosoma X ($i(X)(q10)$); C – X chromosomos inversija ($inv(X)(p22q28)$); D – X chromosomos delecija ($del(X)(p11.4)$); E – žiedinė X chromosoma;

Dauguma X chromosomos struktūros persitvarkymų lemia Turnerio sindromą. Turnerio sindromas pasižymi didele kariotipų įvairove. Per paskutinius penkerius metus MGc išanalizuotas 31 Turnerio sindromu sergančių moterų kariotipas. Pagal chromosomų pokyčių mechanizmą šiuos variantus galima suskirstyti į keturias grupes:

- 1) Klasikinis kariotipas ($45,X$)(51,61%)
- 2) Mozaikiniai kariotipai (6,45%)
- 3) Kariotipas su struktūriniais X chromosomos pokyčiais (6,45%)
- 4) Mozaikinis kariotipas su struktūriniais X chromosomos pokyčiais (35,49%)

Literatūroje teigiama, kad 63,3% Turnerio sindromo atvejų tik viena X chromosoma yra paveldima neteisingo išsiskyrimo gametogenezės metu, todėl susidaro vaisiaus kariotipas – $45,X$ (Catovic, 2003). 5-10% moterų, sergančių TS, kurios nėra monosominės, turi izochromosomą – $iso(X)$, kuriai būdinga ilgojo peties duplikacija ir trumpojo peties delecija ($46,X, i(Xq)$) (Frias ir kt., 2003).

Skirtingi X chromosomų pokyčiai lemia to paties sindromo klinikinį pasireiškimą, tačiau požymių dominavimas ir pasireiškimą intensyvumas gali labai skirtis priklausomai nuo kariotipo. Esant X izochromosomai pagal ilguosius pečius, fenotipas panašus į $45,X$ kariotipą turinčių pacienčių. Esant X chromosomos ilgųjų pečių iškritai, dažnai pasireiškia tik gonadų disfunkcija. Moterims su žiedine X chromosoma būdingi ne tokie ryškūs Turnerio sindromo požymiai, tačiau labiau pasireiškia pažintinis sutrikimas ir ankstyva menopauzė. Mozaikų klinikinis pasireiškimas varijuoja nuo Turnerio sindromo iki normalaus fenotipo. Tai priklauso nuo skirtingų ląstelių klonų proporcijos organizme ir jų pasiskirstymo audiniuose (Jakiūnienė ir kt., 2002).

Daugumai moterų, sergančių Turnerio sindromu, būdingos įvairios mozaicizmo formos: monosominių ir normalių ląstelių linijos ($45,X/46,XX$) arba monosominių ir kitų nenormalių, dažnai turinčių izochromosomą ląstelių linijos ($45,X/46,X, i(Xq)$), tačiau yra ir kitų variantų (Frias ir kt.,

2003). Manoma, kad daugeliu atveju mozaikos susidaro dėl postzigotinio neišsiskyrimo (Sybert, 2005). Tokios moterys turi heterogeninį fenotipą ir paprastai diagnozuojamos paauglystėje dėl pirminės arba antrinės amenorėjos.

Nesubalansuoti chromosomos struktūros pakitimai dažni ir 18-toje chromosomoje. Chromosomų anomalijos, susijusios su 18 chromosoma – papildoma visa 18 chromosoma (trisomija); terminalinės ir intersticinės delecijos, žiedinė chromosoma su terminaline abiejų pečių delecija; translokacijos, kuriose dalyvauja ir kitos autosomos; duplikacijos, papildoma izochromosoma iš trumpųjų pečių, lemianti 18p tetrasomiją, vyksta santykinai dažnai. (Shinzel, 2001). Terminalinės trumpojo ir ilgojo peties delecijos yra dažniausi 18 chromosomos struktūros persitvarkymai. Intersticinės 18 chromosomos delecijos yra retesnės (Schinzel, 2001). MGC identifikuota viena žiedinė 18 chromosoma, dvi terminalinės 18p- ir dvi 18q- delecijos bei dvi translokacijos, kuriose dalyvauja 18-ta chromosoma.

Delecijos

18 chromosomos delecijos yra dažniausios tarp visų 2002 – 2008 metais VUL SK MGC nustatytų delecijų ir sudaro 23,5% visų delecijų. 17 paveiksle pateiktas kariotipas su 18-os chromosomos delecija.

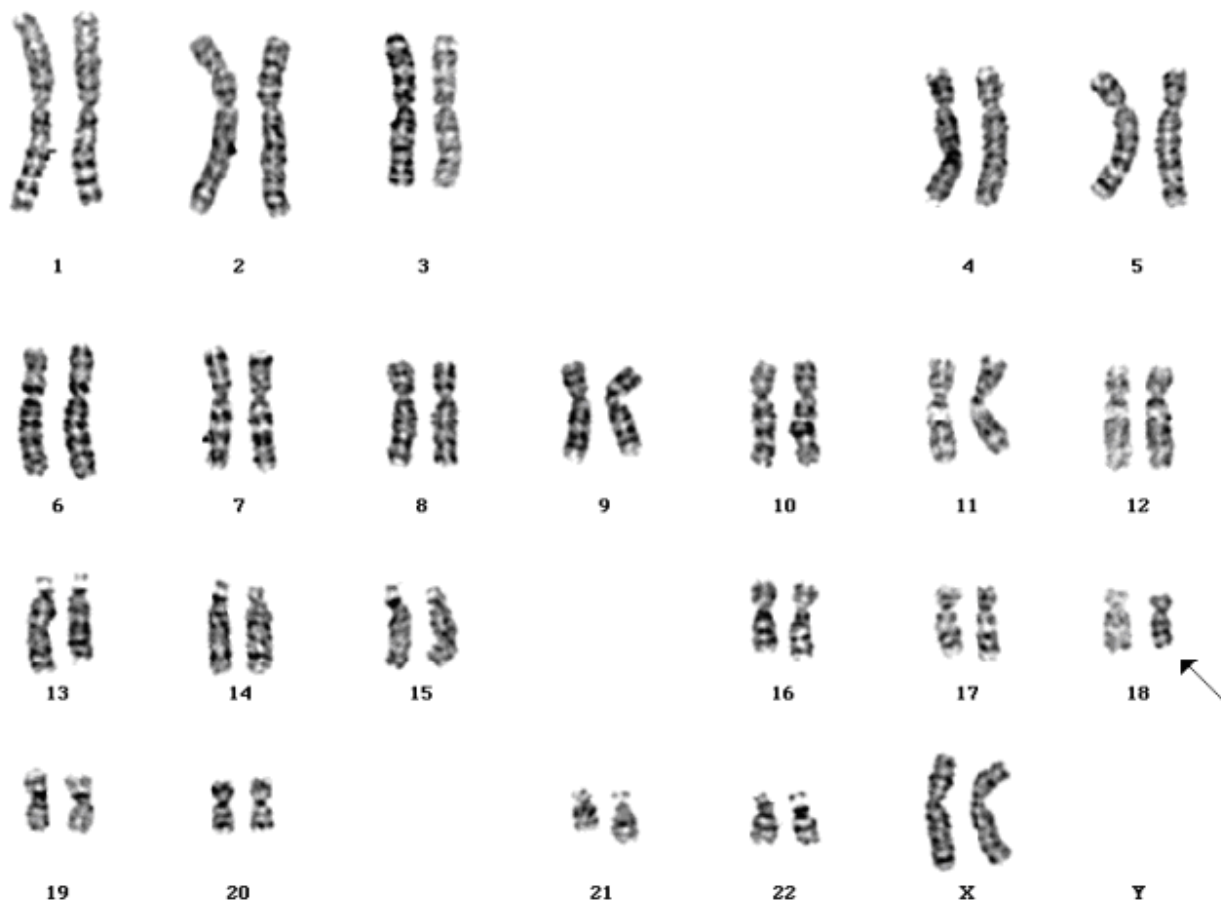
Literatūroje taip pat teigiama, kad 18 chromosomos ilgojo peties delecijos yra vienos dažniausių delecijų žmonių populiacijoje (Cody JD ir kt., 1999). Didelis 18 chromosomos delecijų dažnis gali būti paaiškinamas nedideliu genų dažniu, vyraujančių kartotinių sekų bei judriųjų genomo elementų, kurie sudaro 43,5% chromosomos (Nusbaum ir kt., 2005).

Vienos dažnesnių delecijų yra ir 9-os chromosomos bei X chromosomos trumpųjų pečių delecijos, kurios sudaro po 17,65% visų MGC citogenetikos laboratorijoje nustatytų delecijų. Šių chromosomų delecijos paprastai yra suderinamos su gyvybe. X chromosomos delecijos yra susijusios su Turnerio sindromu ir dažnai yra nustatomos, tuo tarpu 9-os chromosomos delecijos yra retesnės, bet taip pat aprašomos literatūroje (Christ ir kt., 1999).

Derivatinės chromosomos

Kai kuriais atvejais yra sunku nustatyti chromosomų persitvarkymo kilmę netaikant molekulinį citogenetinių metodų. Neaiškios kilmės pakitusios chromosomos vadinamos derivatinėmis. Tokios chromosomos dažniausiai turi deleciją su su daline duplikacija, kuri susiformuoja gametogenezės metu subalansuotų chromosomų struktūros persitvarkymų nešiotojams.

Per paskutinius penkerius metus VUL SK MGC citogenetikos laboratorijoje penkios derivatinės chromosomos, kurių kilmė nėra aiški, ir trys translokacinės kilmės derivatinės chromosomos.

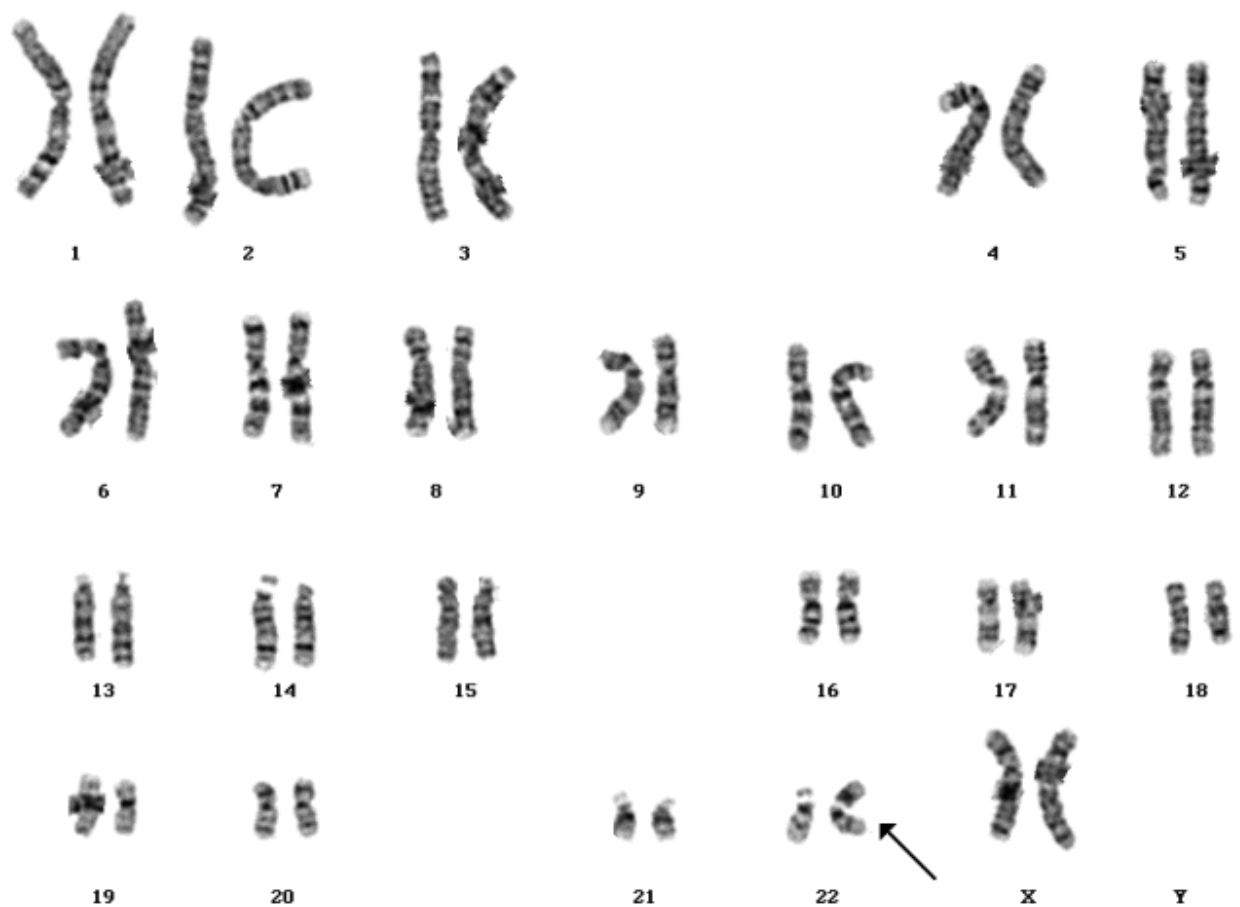


17 pav. Kariotipas – 46, XX, del(18)(q21.31). Rodykle pažymėta 18-ta chromosoma, kurioje įvykusi delecija.

Duplikacijos/neaiškios kilmės papildoma genetinė medžiaga

Dažnai yra sunku nustatyti chromosomos terminalinės dalies papildomos medžiagos kilmę taikant rutininį chromosomų G dažymą. Kai kuriais atvejais nustatyti papildomos genetinės medžiagos kilmę padeda tėvų kariotipo analizė, jeigu vienas iš tėvų būna subalansuoto chromosomų struktūros persitvarkymo nešiotojas (Šliužas ir kt., 2008). Pavyzdžiui, subalansuoto chromosomų struktūros persitvarkymo – inv(14)(p11.2;q32.1) nešiotjo nustatymas patikslino probando kariotipui būdingą, papildomos genetinės medžiagos kilmę (add(14)(p11.2)).

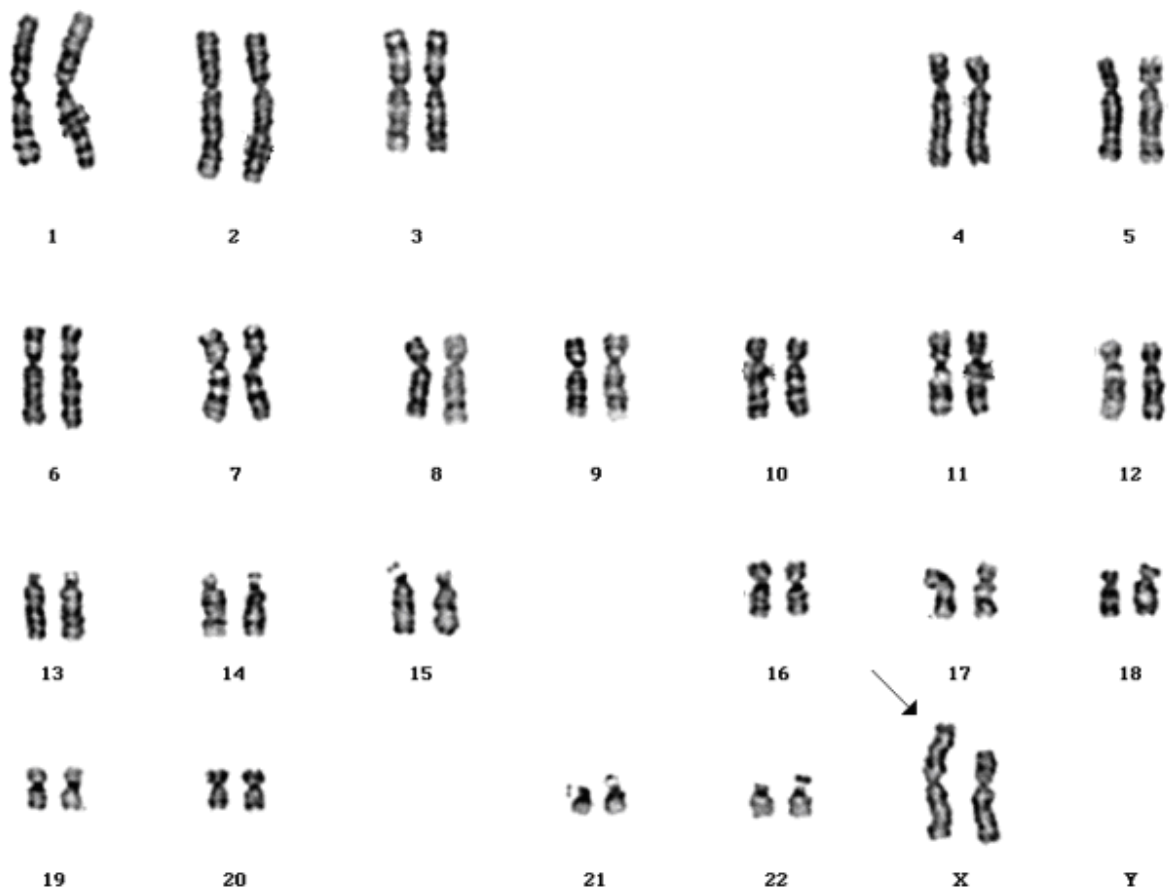
Visais atvejais duplikacijos lemia įgimtas raidos anomalijas. 18 paveiksle pateiktas probando, kuriam įtariamas sindromas, kariotipas.



18 pav. Kariotipas – 46, XX, add(22)(p11.2). Rodykle pažymėta pakitusi 22-a chromosoma.

Izochromosomos

Pakankamai dažnos yra izochromosomos iš Xq, kadangi i(Xq) inaktyvacija apsaugo nuo nenormalaus dozės efekto (Miller ir Therman, 2001). VUL SK MGC citogenetikos laboratorijoje identifikuoti keturi kariotipai, kuriems būdinga izochromosoma, sudaryta iš X chromosomos ilgojo peties. Visais šiais atvejais X izochromosoma susiję su Turnerio sindromu. 19 paveiksle pateiktas kariotipo su X izochromosoma pavyzdys. Autosomų izochromosomos yra retos, kadangi vieno autosomos peties praradimas, o kito – duplikacija, retai suderinami su gyvybinėmis funkcijomis.



19 pav. Kariotipas – 46, X, i(X)(q10). Rodykle pažymėta X izochromosoma.

Markerinės chromosomos

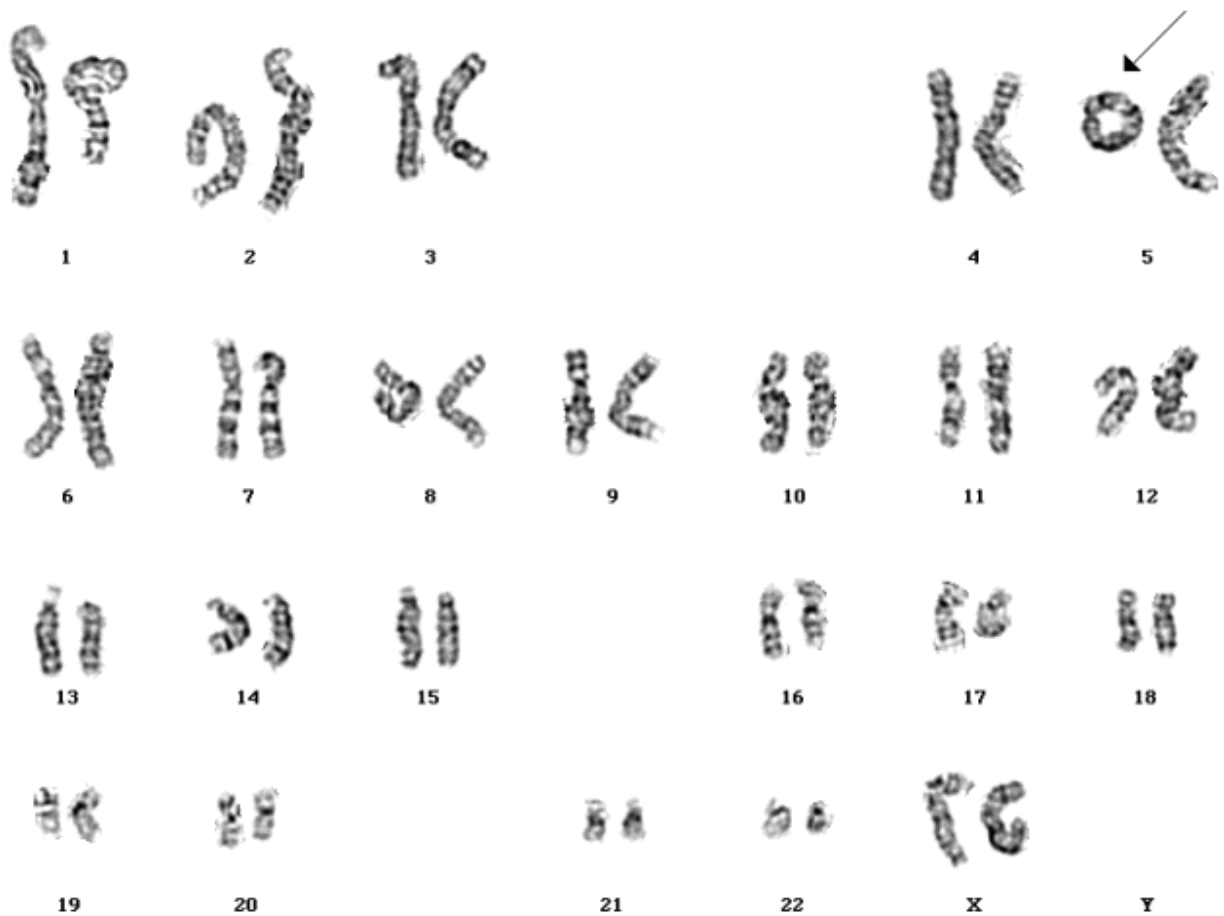
2002 – 2008 m. nustatyti penki kariotipai su markerine chromosoma. Keturiems asmenims, kuriems atlikus kariotipo analizę nustatytos markerinės chromosomos, būdingas Turnerio sindromo fenotipas, todėl manoma, kad markerinė chromosoma yra X chromosomos kilmės. 20 paveiksle pateiktas pacientės, kuriai būdingas Turnerio sindromo fenotipas, kariotipas su markerine chromosoma. Visais šiais atvejais tiksli markerinės chromosomos kilmė nežinoma. Labiausiai tikėtina, kad tokių chromosomų susiformavimą lėmė mejozės metu kvadrivalentą sudariusių translokuotų chromosomų išsiskyrimas 3:1 būdu. Toks chromosomų išsiskyrimo būdas dažniausiai lemia labai mažų chromosomų susiformavimą (Gardner ir Sutherland, 2004). Markerinės chromosomos dažnai yra nustatomos pacientams su Turnerio sindromu (Le Caignec ir kt., 2003).



20 pav. Kariotipas – 46, X,+mar. Rodykle pažymėta markerinė chromosoma.

Žiedinės chromosomos

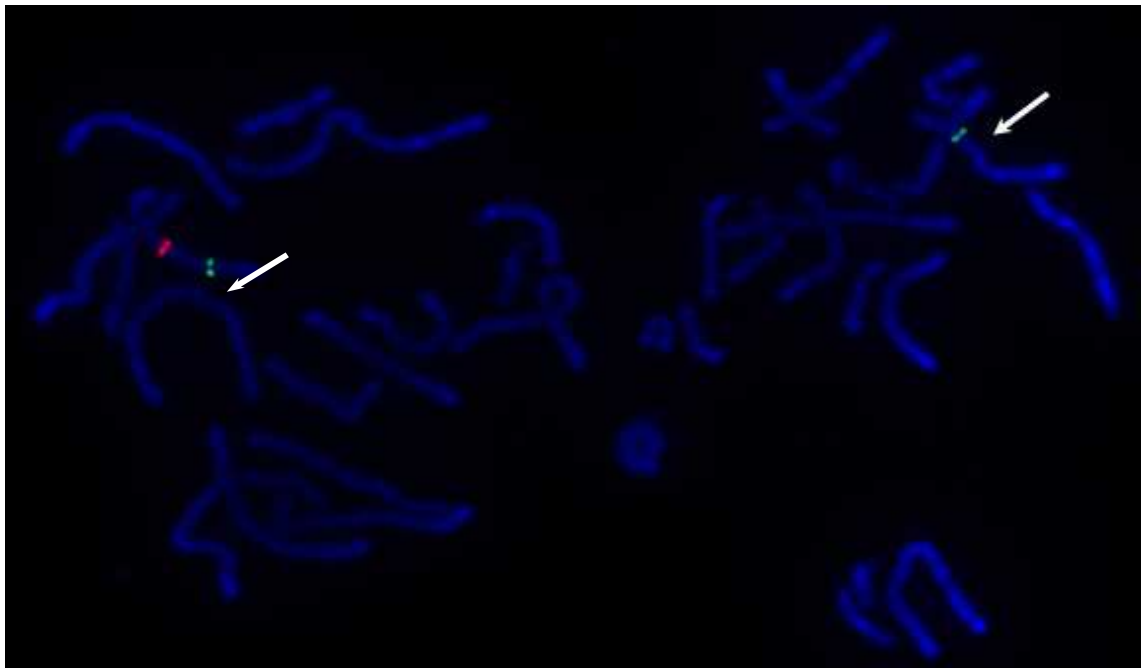
Per pastaruosius penkerius metus MGC citogenetikos laboratorijoje nustatyti šeši žiedinių chromosomų atvejai – 5-tos, 13-tos, 18-tos, 21-os chromosomų žiedinės chromosomos ir du žiedinių X chromosomų atvejai. 21 paveiksle pateiktas kariotipo su žiedine chromosoma (r(5)) pavyzdys.



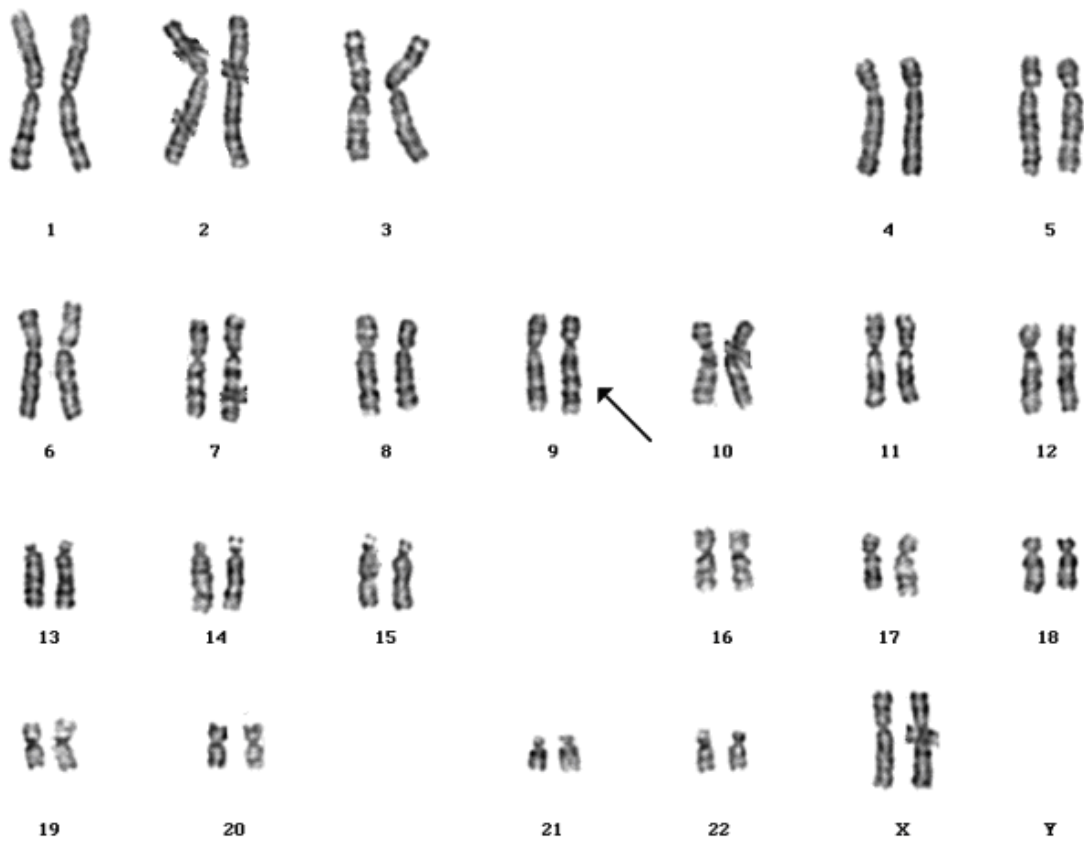
21 pav. Kariotipas – 46, XX, r(5)(pterq35). Rodykle pažymėta žiedinė chromosoma.

4.3. Rutininio citogenetinio tyrimo ir FISH metodo svarba

Nors rutininės citogenetinės analizės pagalba galima tiksliai diagnozuoti chromosomų skaičiaus bei struktūros pokyčius, tačiau jos metu nepastebimos mikrodelecijos (<5 Mb)(22 paveikslas). Atlikus paprastą kariotipo analizę, pacientams, kuriems įtariamas mikrodelecinis sindromas, nei viename kariotipe nebuvo matoma delecija regione, susijusiame su įtariamu sindromu, tačiau dviems pacientams nustatyti kitų, su mikrodeleciniu sindromu nesusijusių genetinių sričių pakitimai, kurie galėjo lemti tam sindromui būdingų požymių pasireiškimą. Pacientei, kuriai buvo įtariamas Williams sindromas, nustatyta pakitusi 9-oji chromosoma (kariotipas 46, XX, der(9)add(9)(q22))(23 pav.). Atlikus FISH tyrimą, buvo paneigta Williams sindromo diagnozė, kadangi visose metafazinėse plokštumose ir branduoliuose buvo matomi abu 7q sričiai specifiniai žymenys.

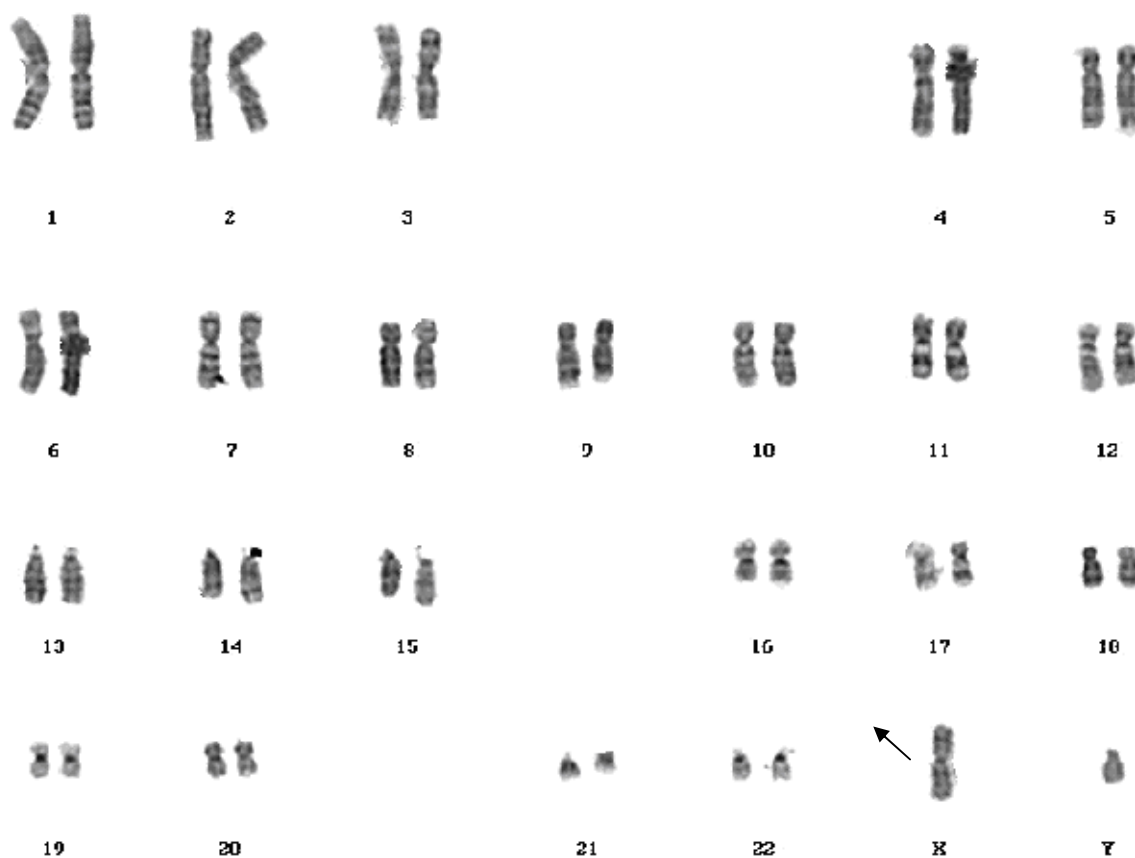


22 pav. Paciento su Williams sindromu kraujo limfocitų kultūros citogenetinė FISH analizė. Rodyklėmis pažymėtos 7-osios chromosomos.



23 pav. Kariotipas 46, XX, der(9)add(9)(q22). Rodykle pažymėta pakitusi 9-ta chromosoma su nežinomos kilmės genetinė medžiaga.

Kitam pacientui, kuriam buvo įtariamas Prader - Willi sindromas, FISH tyrimas taip pat paneigė diagnozę. Prader-Willi sindromui būdingą fenotipą galėjo lemti pakitusi X chromosoma, kuri buvo nustatyta atlikus citogenetinę kariotipo analizę (kariotipas- 46, Y der(X)) (24pav.). Tai įrodo, kad svarbu atlikti citogenetinę kariotipo analizę pacientams, kuriems įtariamas mikrodelecinis sindromas, nepaisant to, kad jų kariotipas tiriamas ir FISH metodu (Brunet ir kt., 2006), kad būtų išvengta klaidingos diagnozės. Tam tikri chromosomų struktūros pokyčiai gali lemti požymių, būdingų tam tikram sindromui, pasireiškimą. Atliekant FISH tyrimą tam, kad būtų patvirtintas arba paneigtas tam tikras mikrodelecinis sindromas, naudojami specifiniai mus dominančiai sričiai zondai, todėl kiti chromosominiai pakitimai nepastebimi.

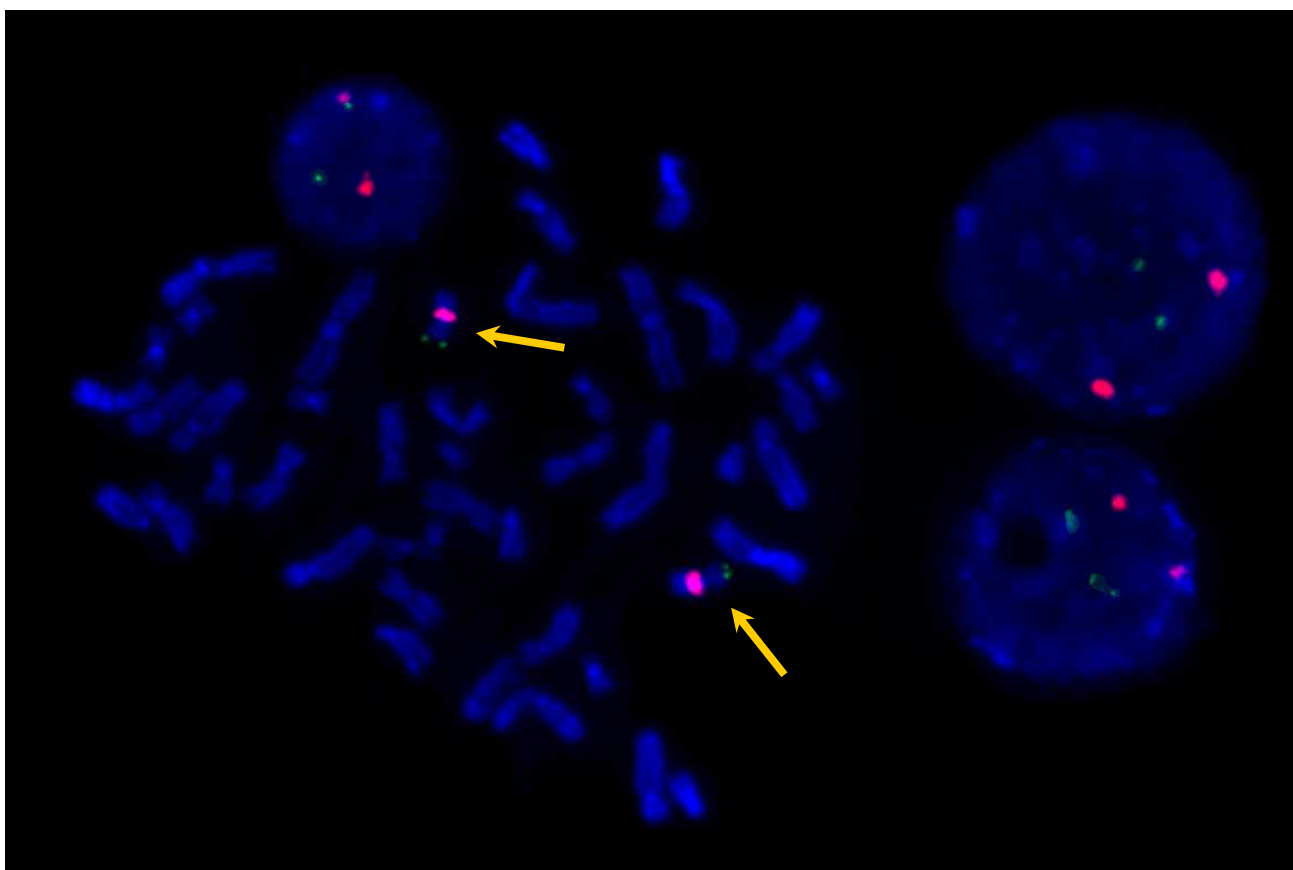


24 pav. Kariotipas 46, Y der(X). Rodykle pažymėta pakitusi X chromosoma.

Kariotipo tyrimas gali atskleisti kitas chromosomines aberacijas, susijusias su mikrodelecinio sindromo klinikiniais požymiais, taip pat aberacijas, kurios nesusijusios su įtariamu sindromu. Tiek vienu, tiek kitu atveju, chromosominių aberacijų nustatymas turi svarbią reikšmę šeimos genetinės rizikos įvertinimui.

Į MGC nukreipiama daug asmenų su lūpos ir/arba gomurio nesuaugimu tam, kad būtų išaiškinta genetinė defekto priežastis bei įvertinta genetinė rizika. Daugumai asmenų atlikus rutininį citogenetinį tyrimą nenustatyti chromosomų struktūros persitvarkymų. Magistrinio darbo metu 20- čiai asmenų su lūpos ir/ar gomurio nesuaugimu, buvo atliktas FISH tyrimas naudojant 16p13.3 regionui, kuriame atlikus rutininį citogenetinį tyrimą gali būti nepastebėta mikrolelecija. Šioje genetinėje srityje esantis genas *MMP25* (angl. *Matrix metalloproteinase 25*) koduoja baltymą, svarbų veido kaukolės vystymuisi (Blanton ir kt., 2004).

25 paveiksle pateiktas asmens, kuriam būdingas lūpos ir gomurio nesuaugimo defektas, kraujo limfocitų kultūros citogenetinės FISH analizės rezultatas (metafazinė plokštelė ir 3 interfaziniai branduoliai). Rodykle pažymėtos 16-os chromosomos, kuriose matomi po vieną raudoną (kontrolinis) ir žalią, specifinį 16p13.3 sričiai, signalai. Interfaziniuose branduoliuose matomi du raudoni ir du žali signalai. Taigi tirtoje genetinėje srityje nėra nei mikrolelecijos, nei mikroduplicacijos.



25 pav. Asmens su įgimtu lūpos ir gomurio defektu kraujo limfocitų kultūros citogenetinė FISH analizė. Rodyklėmis pažymėtos 16-tos chromosomos.

Nors 16p13.3 regione nebuvo nustatyta struktūros pakitimų, tačiau kategoriškai negalima teigti, kad šis regionas nėra susijęs su lūpos ir/ar gomurio nesuaugimu dėl nedidelės tiriamųjų imties bei genetinių sričių, turinčių ryšį su šiuo įgimtu defektu, įvairovės.

5. IŠVADOS

1. Chromosomų struktūros persitvarkymų, nustatytų VUL SK MGC citogenetikos laboratorijoje pasiskirstymas pagal tipus beveik sutampa su literatūroje pateikiamais duomenimis.
2. Dažniausias chromosomų struktūros pakitimas yra reciprokinė translokacija, kuri dažniausiai lemia nevaisingumą bei savaiminius persileidimus.
3. Didžiausia chromosomų struktūros pakitimų įvairovė nustatyta X chromosomoje.
4. 16p13.3 regione nenustatyta struktūros pakitimų, tačiau kategoriškai negalima teigti, kad šis regionas nėra susijęs su lūpos ir/arba gomurio nesuaugimu dėl nedidelės tiriamųjų imties bei genetinių sričių, turinčių ryšį su šiuo įgimtu defektu, įvairovės.
5. Rutininė citogenetinė kariotipo analizė yra svarbi ir tais atvejais, kai atliekamas FISH tyrimas naudojant tam tikrai genetinei sričiai specifinį žymenį, kadangi skirtingi chromosomų struktūros persitvarkymai gali lemti panašų fenotipą.

VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF MEDICINE
DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY, BIOCHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE

Živilė Čiuladaitė

Diversity of chromosome structure rearrangements in Lithuania and their genetic sequences

Master thesis

SUMMARY

Chromosome structural rearrangements could cause various human health problems. Even Down's or Turner's syndromes, which are usually determined by chromosome number change, in some cases could be caused by chromosome structure abnormalities. Structure rearrangements of autosomes, depending on whether it is balanced origin or not, are responsible for various dysmorphic abnormalities or fertility problems. Chromosome breakpoints can occur in any part of chromosome and form any type of rearrangement, but only part of them could be compatible with vital functions and detected postnatally. Chromosome structural rearrangements in many cases are unique and only particular ones are more common.

The objective of this work was to assess the diversity of chromosome structural rearrangements and their implication to the human genetic. Cytogenetic analysis of karyotype was performed using G-banding and FISH techniques. Cytogenetic analyses of 76 patients using routine cytogenetic analysis and 20 patients using FISH method have been performed. In order to assess the variety of chromosome structural rearrangements, the results of karyotype analyses performed in Department of Human and Medical Genetics, Faculty of Medicine, Vilnius University during the period of 2002–2008 were reviewed.

On the basis of obtained results a conclusion can be drawn that translocation is the most frequent chromosome structure rearrangement type, comprising 44,3% of all our cases. X chromosome

is the most „vulnerable“ chromosome because different chromosome structural rearrangements including deletion, inversion, isochromosomes, ring and marker of chromosomes X were detected. Balanced chromosome aberrations usually have mild effect, mostly related to the impaired fertility, while unbalanced structural rearrangements of autosomes cause severe and lethal phenotype. Both, routine cytogenetic analysis and FISH method are important in identification of chromosome structural rearrangements.

PADĖKA

Už suteiktą galimybę rašyti šį darbą nuoširdžiai dėkoju Medicininės Genetikos Centro ir magistrinio darbo vadovui habil. dr., prof. Vaidučiui Kučinskui, taip pat medicinos genetikams Vytautui Šliužui, Beatai Aleksionienei, gydytojai E. Dageytei bei visam VUL SK MGC kolektyvui už pastabas bei pasiūlymus ruošiant šį darbą.

LITERATŪRA

1. Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenet Genome Res.* 2005;111(3-4):297-304.
2. Bandyopadhyay R, McQuillan C, Page SL, Choo KHA, Shaffer LG. Identification and characterization of satellite III subfamilies to the acrocentric chromosomes. *Chromosome Res.* 2001; 9:223–33.
3. Benet J, Oliver-Bonet M, Cifuentes P, Templado C, Navarro J. Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers. *Cytogenet Genome Res.* 2005;111(3-4):281-90.
4. Benke PJ, Donahue R. Risk and Recurrence Risk of Down Syndrome. 1995 10 [cituota 2007 11 15]. Adresas: <http://www.nas.com/downsyn/benke.html>
5. Bielanska M, Tan SL, Ao A. Chromosomal mosaicism throughout human Preimplantation development in-vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum Reprod.* 2002; 17:413–9.
6. Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Interchromosomal effects for chromosome 21 in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. *Hum Genet.* 2000;106:500-5.
7. Blanton SH, Bertin T, Serna ME, Stal S, Mulliken JB, Hecht JT. Association of chromosomal regions 3p21.2, 10p13, and 16p13.3 with nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet A.* 2004; 125(1):23-7.
8. Brewer C, Holloway S, Zawalnyski P, Schinzel A, FitzPatrick D. 1998. A chromosomal deletion map of human malformations. *Am. J. Hum. Genet.* 63: 1153– 59
9. Brewer C, Holloway S, Zawalnyski P, Schinzel A, FitzPatrick D. 1999. A chromosomal duplication map of malformations: regions of suspected haplo- and triplolethality-and tolerance of segmental aneuploidy-in humans. *Am. J. Hum. Genet.* 64:1702– 8
10. Brown WRA, MacKinnon PJ, Villasante A, Spurr N, Buckle VJ, Dobson MJ. Structure and polymorphism of human telomere – associated DNA. *Cell.* 1990; 63:119– 32.
11. Bugge M, Bruun-Petersen G, Brøndum-Nielsen K, Friedrich U, Hansen J, Jensen G, Jensen PK, Kristoffersson U, Lundsteen C, Niebuhr E, Rasmussen KR, Rasmussen K, Tommerup N. Disease associated balanced chromosome rearrangements: a resource for large scale genotype-phenotype delineation in man. *J Med Genet.* 2000; 37(11):858-65.

12. Catovic. Cytogenetics findings at Turner Syndrome and their correlation with clinical findings. *Bosn J Basic Med Sci.* 2005; 5(3):54-8.
13. Chaabouni H, Chaabouni M, Maazoul F, M'Rad R, Jemaa LB, Smaoui N, Terras K, Kammoun H, Belghith N, Ridene H, Oueslati B, Zouari F. Prenatal diagnosis of chromosome disorders in Tunisian population. *Ann Genet.*2001; 44:99–104.
14. Christ LA, Crowe CA, Micale MA, Conroy JM, Schwartz S. Chromosome breakage hotspots and delineation of the critical region for the 9p-deletion syndrome. *Am J Hum Genet.* 1999;65(5):1387-95.
15. Cody JD, Ghidoni PD, DuPont BR, Hale DE, Hilsenbeck SG, Stratton RF, Hoffman DS, Muller S, Schaub RL, Leach RJ, Kaye CI. Congenital Anomalies and Anthropometry of 42 Individuals With Deletions of Chromosome 18q. *Am J Med Genet.* 1999; 85(5):455-6.
16. Collinson MN, Fisher AM, Walker J, Currie J, Williams L, Roberts P. Inv(10)(p11.2q21.2), a variant chromosome. *Hum Genet.* 1997; 101(2):175-80.
17. Crandall BF, Leberz TB, Rubinstein L, Robertson RD, Sample WF, Sarti D, Howard J. Chromosome findings in 2,500 second trimester amniocenteses. *Am J Med Genet.* 1980; 5:345–56.
18. Christ LA, Crowe CA, Micale MA, Conroy JM, Schwartz S. Chromosome breakage hotspots and delineation of the critical region for the 9p-deletion syndrome. *Am J Hum Genet.* 1999;65(5):1387-95.
19. Egozcue J, Templado C, Vidal F, Navarro J, Marina S . Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Hum Genet.*1983; 65:185–8.
20. Elsheikh M, Dunger DB, Conway GS, Wass JH. Turner's syndrome in adulthood. *Endocr Rev.* 2002;23:120-140.
21. Estop AM, Cieply K, Munne S, Feingold E. Multicolor fluorescence *in situ* hybridization analysis of the spermatozoa of a male heterozygous for a reciprocal translocation t(11;22)(q23;q11). *Hum Genet* 1999; 104:412-417
22. Ferguson-Smith MA, Yates JR. Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: Report of a collaborative European study on 52 965 amniocenteses. *Prenat Diagn.*1984; 4:5–44.
23. Forrester MB and Merz RD. Pattern of chromosomal inversions identified by a birth defects registry, Hawaii, 1986–2002. *Congenital Anomalies* 2007; 47:97–100.
24. Frias JL, Davenport ML. Clinical report: health supervision for children with Turner syndrome. *Pediatrics.* 2003;111:692-702.

25. Gardner RJM, Sutherland GR. Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. 3rd ed.; New York: Oxford University Press. 2004.
26. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munne S, Balicchia B, Escudero T Crippa B. Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. Hum Reprod. 2002; 17:3201-7.
27. Gilling M, Dullinger JS, Gesk S, Metzke-Heidemann S, Siebert R, Meyer T, Brondum-Nielsen K, Tommerup N, Ropers HH, Tumer Z, Kalscheuer VM, Thomas NS. Breakpoint cloning and haplotype analysis indicate a single origin of the common Inv(10)(p11.2q21.2) mutation among northern Europeans. Am J Hum Genet. 2006; 78(5):878-83.
28. Griffiths AJF, Miller JH, David T. Suzuki, Richard C. Lewontin, and William M. Gelbart. An Introduction to Genetic Analysis. 7th ed; New York: W.H. Freeman. 1999.
29. Gutierrez-Mateo C, Gadea L, Benet J, Wells D, Munne S, Navarro J. Aneuploidy 12 in a Robertsonian (13;14) carrier: Case report. Hum Reprod. 2005; 20:1256-60.
30. Henegariu O, Kernek S, Keating MA and Palmer CG. PCR and FISH analysis of a ring Y chromosome. Am J Med Genet. 1997; 69:171–176.
31. Hysert M, Bruyère H, Côté GB, Dawson AJ, Dolling JA, Fetni R, Hrynchak M, Lavoie J, McGowan-Jordan J, Tihy F, Duncan AM. Prenatal cytogenetic assessment and inv(2)(p11.2q13). Prenat Diagn. 2006; 26(9):810-3.
32. Horger EO, Finch H, Vincent VA. A single physician's experience with four thousand six hundred genetic amniocenteses. Am J Obstet Gynecol. 2001; 185:279–88.
33. Youings S, Ellis K, Ennis S, Barber J, Jacobs P. A study of reciprocal translocations and inversions detected by light microscopy with special reference to origin, segregation, and recurrent abnormalities. Am J Med Genet. 2004; 126:46-60.
34. Jaarola M, Martin RH, Ashley T. Direct evidence for suppression of recombination within two pericentric inversions in humans: a new sperm-FISH technique. Am J Hum Genet. 1998; 63(1):218-24.
35. Jacobs PA. Mutation rates of structural chromosome rearrangements in man. Am. J. Hum. Genet. 1981; 33:44– 54.
36. Jakiūnienė D, Gustaitytė D, Kučinskas V. Ternerio sindromų kariotipų įvairovė (Žmogaus genetikos centro 1990-2001 m. duomenimis). Laboratorinė medicina. 2002; 3 (15):13-8.
37. Kato T, Inagaki H, Yamada K, Kogo H, Ohye T, Kowa H, Nagaoka K, Taniguchi M, Emanuel BS, Kurahashi H. Genetic variation affects *de Novo* translocation frequency. Science 2006; 311:971.

38. Kosztolanyi G, Mehes K, Hook EB. Inherited ring chromosomes: an analysis of published cases. *Hum Genet.* 1991; 87:320–324.
39. Kučinskas V. *Genetika.* Kaunas, Šviesa, 2001.
40. Kurahashi H ir Emanuel BS. Unexpectedly high rate of *de novo* constitutional t(11;22) translocations in sperm from normal males. *Nat Genet.* 2001; 29(2):139-40.
41. Kurahashi H, Tsuda E, Kohama R, Nakayama T, Masuno M, Imaizumi K, Kamiya T, Sano T, Okada S, Nishisho I. Another critical region for deletion of 22q11: a study of 100 patients. *Am J Med Genet.* 1997; 72:180–5.
42. Lacbawan FL, White BJ, Anguiano A, Rigdon DT, Ball KD, Bromage GB, Yang X, DiFazio MP, Levin SW. Rare interstitial deletion (2)(p11.2p13) in a child with pericentric inversion (2)(p11.2q13) of paternal origin. *Am J Med Genet.* 1999; 87(2):139-42.
43. Le Caignec C, Boceno M, Joubert M, Winer N, Aubron F, Fallet-Bianco C, Rival JM. Prenatal diagnosis of a small supernumerary, XIST-negative, mosaic ring X chromosome identified by fluorescence *in situ* hybridization in an abnormal male fetus. *Prenat Diagn.* 2003; 23:143–5.
44. Levsky JM, Singer RH. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *Journal of Cell Science.* 2003; 116:2833-8.
45. Luciani JM, Guichaoua MR, Mattei A, Morazzani MR. Pachytene analysis of a man with a 13q;14q translocation and infertility. Behavior of the trivalent and nonrandom association with the sex vesicle. *Cytogenet Cell Genet.* 1984;38(1):14-22.
46. Magee AC, Humphreys MW, McKee S, Stewart M, Nevin NC. De novo direct duplication 2 (p12-->p21) with paternally inherited pericentric inversion 2p11.2 2q12.2. *Clin Genet.* 1998; 54(1):65-9.
47. Magli MC, Gianaroli L, Ferrareti AP. Chromosomal abnormalities in embryos. *Mol Cell Endocrinology* 2001; 22:29–34.
48. Márquez C, Sandalinas M, Bahçe M, Alicani M, Munne S. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod Biomed Online* 2000; 1:17–27.
49. Mathew S, Rao PH, Dalton J, Downing JR, Raimondi SC. Multicolor spectral karyotyping identifies novel translocations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2001; 15:468-72.
50. Michilsen C. New Molecular Cytogenetics Facilities - SKY and Microdissection. *Quarterly newsletter.* 1999; 49.
51. Miller OJ and Therman E (2001) *Human Chromosomes*, 4th edn. Springer-Verlag, New York, USA.

52. Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Herry A, Amice V, Amice J, De Braekeleer M. Meiotic segregation of translocations during male gametogenesis. *Int J Androl.* 2004; 27(4):200-12.
53. Morell F, Roux C, Bresson JL. FISH analysis of the chromosomal status of spermatozoa from three men with 45, XY, der(13;14)(q10;q10) karyotype. *Mol Hum Reprod.* 2001; 7:483-8.
54. Nusbaum C, Zody MC, Borowsky ML, Kamal M, Kodira CD, Taylor TD, Whittaker CA, Chang JL, Cuomo CA, Dewar K, FitzGerald MG, Yang X, Abouelleil A, Allen NR, Anderson S, Bloom T, Bugalter B, Butler J, Cook A, DeCaprio D, Engels R, Garber M, Gnirke A, Hafez N, Hall JL, Norman CH, Itoh T, Jaffe DB, Kuroki Y, Lehoczky J, Lui A, Macdonald P, Mauceli E, Mikkelsen TS, Naylor JW, Nicol R, Nguyen C, Noguchi H, O'Leary SB, O'Neill K, Piquani B, Smith CL, Talamas JA, Topham K, Totoki Y, Toyoda A, Wain HM, Young SK, Zeng Q, Zimmer AR, Fujiyama A, Hattori M, Birren BW, Sakaki Y, Lander ES. DNA sequence and analysis of human chromosome 18. *Nature.* 2005; 437(7058):551-5.
55. Oliver-Bonet M, Navarro J, Codina-Pascual M, Carrera M, Egozcue J, Benet J. Meiotic segregation analysis in a t(4;8) carrier; comparison of FISH methods on sperm chromosome metaphases and interphase sperm nuclei. *Eur J Hum Genet.* 2001; 9:395-403.
56. Page SL, Shaffer LG. 1997. Nonhomologous Robertsonian translocations form predominantly during female meiosis. *Nat. Genet.* 15:231-32
57. Pardo-Manuel de Villena F ir Sapiezna C. Nonrandom segregation during meiosis: the unfairness of females. *Mamm Genome.* 2001 May;12(5):331-9.
58. Park JP, Wojiski SA, Spellman RA, Rhodes CH, Mohandas TK. Human chromosome 9 pericentric homologies: implications for chromosome 9 heteromorphisms. *Cytogenet. Cell Genet.* 1998; 82:192-4.
59. Patsalis PC, Evangelidou P, Charalambous S, Sismani C. Fluorescence in situ hybridization characterization of apparently balanced translocation reveals cryptic complex chromosomal rearrangements with unexpected level of complexity. *Eur J Hum Genet.* 2004; 12:647-53.
60. Pedersen B, Norgaard JM, Pedersen BB, Clausen N, Rasmussen IH, Thorling K. Many unbalanced translocations show duplication of a translocation participant. Clinical and cytogenetic implications in myeloid hematologic malignancies. *Am J Hematol.* 2000; 64:161-9.
61. Perry J, White SM, Nouri S, Bain SM, Hutchinson RG, La P, Northrop E, Eyre HJ, Pertile MD, Hocking TA, Thompson EM, Yu S, Choo KH, Slater HR. Unstable Robertsonian translocations der(13;15)(q10;q10): Heritable chromosome fission without phenotypic effect in two kindreds. *Am J Med Genet A.* 2005; 11.

62. Potocki L, Chen K-S, Koeuth T, Killian J, Iannaccone ST, Shapira SK, Kashork CD, Spikes AS, Shaffer LG, Lupski JR. DNA rearrangements on both homologues of chromosome 17 in a mildly delayed individual with a family history of autosomal dominant carpal tunnel syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 1999; 64:471–8.
63. Pujol A, Boiso I, Benet J, Veiga A, Durban M, Campillo M, Egozcue J and Navarro J. Analysis of nine chromosome probes in 1st polar bodies and metaphase II oocytes for the detection of aneuploidies. *Eur J Hum Genet* 2003; 11:325–36.
64. Rančelis V. *Genetika. Lietuvos mokslų akademijos leidykla.* 2000.
65. Richardson C, Moynahan ME, Jasin M. Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations. *Genes Dev.* 1998; 12: 3831- 42.
66. Ryall RG, Callen D, Cocciolone R, Duvnjak A, Esca R, Frantzis N, Gjerde EM, Haan EA, Hocking T, Sutherland G, Thomas DW, Webb F. Karyotypes found in the population declared at increased risk of Down syndrome following maternal serum screening. *Prenat Diagn.* 2001; 21:553–7.
67. Ruiz R, Iguaz F, Campo M, Borque L. Simultaneous Robertsonian and reciprocal translocation in a healthy fertile male. *Chromosome research. 5th European Cytogenetics Conference.* 2005 May 7-10:72.
68. Schinzel A. *Unbalanced chromosome aberrations in man, 2nd edn.* Walter de Gruyter, Berlin. 2001.
69. Schwartz S, Depinet TW, Leana-Cox J, Isada NB, Karson EM, Park VM, Pasztor LM, Sheppard LC, Stallard R, Wolff DJ, Zinn AB, Zurcher VL, Zackowski JL.. Sex chromosome markers: characterization using fluorescence in situ hybridization and review of the literature. *Am. J. Med. Genet.* 1997; 71:1–7.
70. Shaffer LG, Lupski JR. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet.* 2000; 34:297-329.
71. Shaw CJ, Lupski JR. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet.* 2004; 1:57-64.
72. Shi Q and Martin RE. Aneuploidy in human sperm: a review of the frequency and distribution of aneuploidy, effects of donor age and lifestyle factors. *Cytogenet Cell Genet.* 2000; 90:219-26.
73. Sigurdardottir S, Goodman BK, Rutberg J, Thomas GH, Jabs EW, Geraghty MT. Clinical, cytogenetic, and fluorescence in situ hybridization findings in two cases of "complete ring" syndrome. *Am J Med Genet.* 1999; 87(5):384-90.

74. Sybert VP. Turner syndrome. In: Cassidy S, Allanson J, eds. *Management of Genetic Syndromes*. 2nd ed. Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ. 2005; 589-605.
75. Stankiewicz P. and Lupski JR. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet* 2002; 18:74–82.
76. Šliužas V, Čiuladaitė Ž, Kučinskas V. Diversity of human chromosome structural rearrangements identified at the Centre for Medical Genetics in 2002-2007. *Biologija*. 2008; 54:27-32.
77. Vermeesch JR, Baten E, Fryns JP, Devriendt K. Ring syndrome caused by ring chromosome 7 without loss of subtelomeric sequences. *Clin Genet*. 2002; 62:415–7.
78. Wandstrat AE, Leana-Cox J, Jenkins L, Schwartz S. Molecular cytogenetic evidence for a common breakpoint in the largest inverted duplications of chromosome 15. *Am. J. Hum. Genet*. 1998; 62:925–36.
79. Warburton. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet*. 1991; 49(5):995-1013.
80. Wenger SL, Boone LY, Cummins JH, Del Vecchio MA, Bay CA, Hummel M, Mowery-Rushton PA. Newborn infant with inherited ring and de novo interstitial deletion on homologous chromosome 22s. *Am. J. Med. Genet*. 2000; 91:351–4.
81. Zuffardi O, Ciccone R, Giglio S, Pramparo T. Inversion Chromosomes. *Genomic Disorders* [straipsnis internete]. 2005 06 09 [cituota 2008 01 24]; IV:289-299. Adresas: <http://www.charite.de/ch/medgen/eumedis/cytogenetics05/inversion-chromosomes.html>

