

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NUŠA KOSEDNAR

**VLOGA MOLEKULARNE CITOGENETIKE PRI
OPREDELITVI KROMOSOMSKIH PREUREDITEV PRI
HEMATOLOŠKIH NOVOTVORBAH**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NUŠA KOSEDNAR

**THE ROLE OF MOLECULAR CYTOGENETICS IN
RESOLVING CHROMOSOMAL REARRANGEMENTS IN
HAEMATOLOGICAL NEOPLASMS**

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala v Specializiranem hematološkem laboratoriju, Kliničnega oddelka za hematologijo UKC Ljubljana pod mentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž., spec. med. biokem.

Zahvalila bi se rada mentorici doc. dr. Heleni Podgornik za vso strokovno pomoč in nasvete pri pisanju magistrske naloge. Posebna zahvala gre vsem sodelavkam v laboratoriju za nesebično pomoč in vse koristne napotke, ki sem jih dobila tekom izvajanja naloge. Iskrena hvala tudi moji družini in fantu za moralno podporo in spodbudo, ne samo pri nastajanju naloge, temveč tekom celotne študijske poti. Brez vseh vas bi bila pot do cilja bistveno težja.

Izjava:

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž., spec. med. biokem.

Nuša Kosednar

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK	III
KAZALO TABEL	IV
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1 UVOD	1
1.1 KROMOSOMSKE PREUREDITVE PRI KRVNIH BOLEZNIH	1
1.2 VLOGA CITOGENETIKE V HEMATOLOGIJI	2
1.2.1 STANDARDNA CITOGENETSKA PREISKAVA	2
1.2.2 FLUORESCENČNA <i>IN-SITU</i> HIBRIDIZACIJA	3
1.3 FISH DNA-SONDE	4
1.3.1 SONDE CEP	4
1.3.2 SONDE WCP	4
1.3.3 SONDE LSI	5
1.3.4 SEKVENČNO SPECIFIČNI KLONI BAC/YAC	5
1.4 SPEKTRALNA KARIOTIPIZACIJA	6
1.4.1 SONDE IN BARVE PRI SKY	6
1.4.2 IZVEDBA SKY	6
1.4.3 PRINCIP SPEKTRALNEGA PRIDOBIVANJA SLIKE	7
1.4.4 KLINIČNA UPORABNOST SKY	8
1.4.5 UPORABA SKY ZA RAZREŠEVANJE KOMPLEKSNIH PREUREDITEV	9
2 NAMEN DELA	10
3 EKSPERIMENTALNI DEL	11
3.1 PREISKOVANCI	11
3.2 MATERIALI	12
3.2.1 OSNOVNE RAZTOPINE	12
3.2.2 RAZTOPINE ZA GOJENJE, IZOLACIJO IN FIKSACIJO CELIC PERIFERNE KRVI IN KOSTNEGA MOZGA	13
3.2.2.1 Gojenje celic	13
3.2.2.2 Izolacija in fiksacija celic	13
3.2.3 FLUORESCENČNA <i>IN-SITU</i> HIBRIDIZACIJA	13
3.2.3.1 Predobdelava stekel	13

3.2.3.2	Nanos sond	14
3.2.3.3	Spiranje po hibridizaciji	14
3.2.4	FISH Z UPORABO KLONOV BlueFISH™	15
3.2.4.1	Ločena denaturacija z uporabo klonov BlueFISH™	15
3.2.4.2	Nanos klonov	15
3.2.4.3	Spiranje po hibridizaciji	15
3.2.5	SPEKTRALNA KARIOTIPIZACIJA (SKY)	15
3.2.5.1	Denaturacija kromosomov	15
3.2.5.2	Denaturacija sonde in hibridizacija	16
3.2.5.3	Spiranje po hibridizaciji	16
3.2.5.4	Barvna reagenta Cy5 in Cy5.5	16
3.2.5.5	SKY na predhodno GTG proganih preparatih	16
3.2.6	GTG PROGANJE	17
3.2.7	LABORATORIJSKI PRIPOMOČKI	17
3.2.8	APARATURE	18
3.3	METODE	19
3.3.1	GOJENJE CELIC PERIFERNE KRVI IN KOSTNEGA MOZGA	19
3.3.2	IZOLACIJA IN FIKSACIJA CELIC	19
3.3.3	NANOS CELIC NA OBJEKTA STEKLA	19
3.3.4	FLUORESCENČNA <i>IN-SITU</i> HIBRIDIZACIJA	20
3.3.4.1	Predobdelava stekel	20
3.3.4.2	Nanos sond	20
3.3.4.3	Spiranje po hibridizaciji	21
3.3.5	FISH Z UPORABO KLONOV BlueFISH	22
3.3.5.1	Denaturacija in hibridizacija	22
3.3.5.1.1	Ločena denaturacija in hibridizacija	22
3.3.5.1.2	Kodenaturacija	22
3.3.5.2	Spiranje po hibridizaciji	23
3.3.6	SPEKTRALNA KARIOTIPIZACIJA	23
3.3.6.1	Denaturacija vzorca	23
3.3.6.2	Denaturacija sond SKY in hibridizacija	23
3.3.6.3	Spiranje po hibridizaciji	24
3.3.6.4	SKY na predhodno GTG proganih metafazah	24
3.3.7	GTG PROGANJE	25
3.3.8	MIKROSKOPSKA ANALIZA	25
4	REZULTATI	26
4.1	UVEDBA SKY	26
4.1.1	VPLIV BLEDENJA NA KAKOVOST PRIDOBLENJENIH SLIK	27
4.1.2	VPLIV BLEDENJA NA SESTAVO BARV KROMOSOMOV	29
4.1.3	VPLIV STARANJA PREPARATOV NA IZVEDBO SKY	30
4.1.4	SKY NA PREDHODNO PROGANIH METAFAZAH	31
4.2	ANALIZA ZAJETIH SLIK	32
4.3	RAZREŠEVANJE KROMOSOMSKIH PREUREDITEV	34

4.3.1 OPREDELITEV MARKERSKIH KROMOSOMOV IN KOMPLEKSNIH PREUREDITEV	34
4.3.1.1 Markerski kromosom kot edina preureditev	34
4.3.1.2 Markerski kromosom v kompleksnem kariotipu	35
4.3.2 DOLOČANJE PRELOMNIH MEST IN VPLETENIH GENOV	37
5 RAZPRAVA	47
5.1 UVEDBA IN OPTIMIZACIJA SKY	47
5.2 RAZREŠEVANJE KROMOSOMSKIH PREUREDITEV Z METODAMI MOLEKULARNE CITOGENETIKE	51
5.2.1 OPREDELITEV MARKERSKIH KROMOSOMOV IN KOMPLEKSNIH PREUREDITEV	51
5.2.2 DOLOČANJE PRELOMNIH MEST IN VPLETENIH GENOV	52
6 SKLEPI	56
7 LITERATURA	57
8 PRILOGE	60

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz principa FISH: (a) tarčno zaporedje DNA na kromosomu; (b) DNA-sonda; (c) označevalec (npr. digoksigenin-11-dUTP), ki omogoča vezavo protitelesa; (d) protitelo (npr. anti-digoksigenin); (e) fluorokrom (npr. Texas Red).	3
Slika 2: Shematski prikaz pridobivanja spektralne slike pri SKY.	8
Slika 3: Prikazi iste metafaze pri SKY. Levo: pogled RGB; sredina: pogled DAPI; desno: psevdo barve. Puščice prikazujejo preurejeni kromosom 7 (der(7)) ter normalna kromosoma 7 in 14.	8
Slika 4: Rezultat SKY pri normalnem moškem: a) v RGB pogledu; b) v psevdo barvah; c) SKY kariogram.	26
Slika 5: Zaporedno slikanje metafaz v psevdo barvah (desne slike) in RGB pogledu (leve slike): a) prva; b) druga; c) tretja, d) četrta slikana metafaza.	27
Slika 6: Zaporedno slikanje metafaz: SKY kariogrami: a) prve; b) druge; c) tretje; d) četrte slikane metafaze.	28
Slika 7: Vpliv staranja preparatov na intenziteto obarvanja kromosomov: a) brez predhodnega sušenja; b) s predhodnim sušenjem.	30
Slika 8: Vpliv predhodnega proganja na izvedbo SKY: a) predhodno GTG progana metafaza; b) sveže nanešena metafaza.	31
Slika 9: Postopno "popravljanje" slike SKY: a) neobdelana slika; b) v celoti popravljena slika. Puščice označujejo preurejene kromosome.	32
Slika 10: Pogranska opredelitev translokacij pri SKY: a) t(14;16); b) t(5;22); c) markerski kromosom.	33
Slika 11: Kariotip z markerskim kromosomom kot edino spremembo: a) GTG progani kromosomi; b) SKY kariogram v RGB pogledu in psevdo barvah.	34

Slika 12: Kariotip kompleksno preurejenega levkemičnega klona z markerskima kromosomoma. _____	35
Slika 13: SKY metafaza in kariogram kompleksno preurejenega klona. _____	36
Slika 14: Mitoza in kariogram izvirnega klona: 46,XY,t(2;14)(p23;q32),del(11)(q23). _____	37
Slika 15: FISH z DNA-sondo LSI IGH (Vysis). _____	38
Slika 16: Analizirani (onko)geni pri preiskovancu 3. _____	39
Slika 17: a) FISH z DNA-sondo ON ALK (Kreatech); b) nahajališče testiranega onkogenega <i>ALK</i> na kromosomu 2. _____	39
Slika 18: a) FISH z uporabo klona BlueFISH RP11-38F5; b) nahajališče trenutno <i>SOX11</i> (rdeča) in predhodno <i>ALK</i> (modra) analiziranega onkogenega na kromosomu 2. _____	40
Slika 19: FISH z DNA-sondo MYCN/CEP2 (Vysis): a) normalna metafaza; b) preurejena metafaza; c) nahajališče onkogenega <i>MYCN</i> ; z modro sta označeni mesti predhodno analiziranih tarčnih genov <i>ALK</i> in <i>SOX11</i> na kromosomu 2. _____	40
Slika 20: a) FISH z uporabo klona BlueFISH RP11-458N5; b) nahajališče predhodnih in trenutno analiziranega onkogenega <i>DNMT3A</i> na kromosomu 2. _____	41
Slika 21: Nahajališče predhodnih in trenutno analiziranega onkogenega <i>SDC1</i> na kromosomu 2. _____	41
Slika 22: a) FISH z BlueFISH kloni RP11-42N12 in RP11-259P23; b) nahajališče predhodnih in trenutno analiziranih področij 2p24.1 in 2p.24.2. _____	42
Slika 23: Nahajališče predhodnih in trenutno analiziranega področja 2p24.2. _____	42
Slika 24: Kariograma dveh različnih metafaz z različnima preureditvama kromosomov 8 in 17. _____	43
Slika 25: FISH z uporabo WCP sond (Kreatech). Dve različni preureditvi kromosomov 8 in 17: a) der(8;17)(q10;q10); b) derivativna kromosoma 8 in 17. _____	44
Slika 26: Kariogram levkemičnega klona s preureditvijo kromosoma 2. _____	45
Slika 27: a) FISH z DNA-sondo LSI MYCN/CEP2 (Vysis) in BlueFISH klonom RP11-38F5; b) nahajališče obeh analiziranih onkogenov <i>SOX11</i> in <i>MYCN</i> na kromosomu 2. _____	45
Slika 28: a) FISH z DNA-sondo ON ALK (Kreatech) ter klonoma RP11-368O18 in RP11-458N5; b) nahajališča predhodnih in trenutno testiranih onkogenov na kromosomu 2. _____	46
Slika 29: Analizirani onkogeni na kromosomu 2 pri preiskovancu 3. Z rdečo so označeni geni, ki so bili translocirani na kromosom 14. _____	53
Slika 30: Analizirani onkogeni na kromosomu 2 pri preiskovancu 5. _____	55

KAZALO TABEL

Tabela 1: Osnovni podatki o preiskovancih. _____	11
Tabela 2: Delež posameznih barv pri določenem kromosomu pri treh zaporednih slikanjih. _____	29

POVZETEK

Z razvojem fluorescenčne *in-situ* hibridizacije (FISH) je citogenetika naredila velik korak naprej v smislu tarčnega iskanja kromosomskih preureditev. Razvoj preiskav molekularne citogenetike, kakršni sta večbarvna FISH preiskava (M-FISH) in spektralna kariotipizacija (SKY), pa je omogočil bolj celosten vpogled v kariotip in povečal učinkovitost citogenetske preiskave.

Vse našteje metode temeljijo na hibridizaciji enoverižnega tarčnega zaporedja DNA z enoverižno DNA-sondo, ki je fluorescenčno označena, in ob vezavi na komplementarno zaporedje daje specifičen vzorec in število signalov. Spektralna kariotipizacija hkrati vključuje še princip spektralnega slikanja in Fourierjeve spektroskopije, ki omogočata vizualizacijo celotnega nabora kromosomov hkrati, pri čemer ima vsak edinstveno barvo. To prednost ima tudi M-FISH preiskava, ki pa za razliko od SKY, uporablja drugačen način pridobivanja slike, ki temelji na uporabi specifičnih filtrov za posamezen fluorokrom. Obe preiskavi omogočata hitro prepoznavanje preureditev, lahko razkrijeta določene predhodno neopažene preureditve in tako tudi zagotovita bolj učinkovito razreševanje kompleksno preurejenih kariotipov.

V našem delu smo uporabljali FISH in SKY pri razreševanju predhodno neopisanih in kompleksnih preureditev pri vzorcih kostnega mozga in periferne krvi bolnikov s krvnimi novotvorbami. S pomočjo normalnih vzorcev krvi smo vpeljali spektralno kariotipizacijo. Pri tem smo morali optimizirati nekatere dejavnike pri izvedbi te zahtevne in izvedbeno drage preiskave. Nato smo s prilagojenim postopkom poskusili razrešiti nekatere preurejene kariotipe, pri čemer smo ugotovili, da je metoda SKY zelo uporabna pri opredelitvi kompleksnih preureditev, manj pa pri določitvi izvora markerskih kromosomov.

Z običajno FISH preiskavo in uporabo sond, ki pokrivajo specifična kromosomska področja, smo določili mesta preloma in morebitne vpletene gene pri translokaciji, ki doslej še ni bila opisana.

Ključne besede: fluorescenčna *in-situ* hibridizacija, spektralna kariotipizacija, kloni BAC, kompleksne kromosomske preureditve, markerski kromosom.

ABSTRACT

With the development of fluorescence *in-situ* hybridization (FISH), cytogenetics took a major step forward in terms of target search of chromosomal rearrangements. The development of molecular cytogenetic tests, such as multicolour FISH (M-FISH) and spectral karyotyping (SKY), has allowed a more comprehensive insight into the karyotype and increased the efficiency of cytogenetic analysis.

All these methods are based on the hybridization of single-stranded target DNA sequence with a single-stranded DNA probe that is fluorescently labelled and, bound to a complementary sequence, gives a specific pattern and number of signals. Spectral karyotyping at the same time includes also the principle of spectral imaging and Fourier spectroscopy, which finally enable the visualization of the entire set of chromosomes simultaneously, each having a unique colour. M-FISH method also has this advantage, but unlike SKY, it uses a different way of obtaining the image based on the fluorescent specific filters. Both methods allow a rapid identification of rearrangements; they can reveal certain previously unknown rearrangements and thus ensure a more efficient resolving of complex rearranged karyotypes.

In our work we used FISH and SKY in resolving unknown and complex rearrangements in bone marrow and peripheral blood samples of patients with haematological neoplasms. Using normal blood samples, we introduced a spectral karyotypization. For this we needed to optimize certain factors in the execution of this demanding and in case of implementation, costly method. With this set procedure we tried to resolve some rearranged karyotypes, in which we concluded, that the SKY method is very useful in resolving complex chromosome rearrangements and less for resolving the origin of marker chromosomes.

We used the routine FISH method and probes covering specific chromosome regions to determine the points of chromosome breakage and possible genes involved in the translocation that has not been described yet.

Key words: fluorescence *in-situ* hybridization, spectral karyotyping, BAC clones, complex chromosome rearrangements, marker chromosome.

SEZNAM OKRAJŠAV

AML	akutna mieloblastna levkemija
ALL	akutna limfoblastna levkemija
BAC	umetni bakterijski kromosom
CEP	centromerna DNA-sonda
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorid
del	delecija
der	derivativni kromosom
EKAMP	CpG oligonukleotidi, B-celični mitogen
FBS	fetalni goveji serum
FISH	fluorescenčna <i>in situ</i> hibridizacija
FITC	fluorescein izotiocianat
GTG	G – proganje s tripsinom in Giemso
i	izokromosom
inv	inverzija
KLL	kronična limfocitna levkemija
KML	kronična mieloična levkemija
LSI	lokus specifična DNA-sonda
mar	markerski kromosom
MDS	mielodisplastični sindrom
NP-40	spiralna raztopina, detergent
OPD	dolžina optične poti
PBS	fosfatno pufrana slanica
PBT	puferska raztopina s Tweenom
PHA	fitohemaglutinin
RGB	”Red-Green-Blue” prikaz kromosomov v fluorescenčnih barvah
SKY	spektralna kariotipizacija
SSC	citratni puffer
t	translokacija
TEL	telomerna DNA-sonda
WCP	DNA-sonda za obarvanje celotnega kromosoma
YAC	umetni kromosom kvasovke

1 UVOD

Začetki citogenetike segajo v drugo polovico 19. stoletja, natančneje v leto 1882, ko je Walther Flemin kot prvi objavil fotografije človeških kromosomov. Kot prelomnico moderne citogenetike označujemo leto 1956, ko sta Tjio in Levan kot prva uspešno preštela celoten nabor 46 kromosomov, ki se nahajajo v normalni človeški celici (1,2).

Potrditev pravega števila kromosomov je bila hkrati tudi odskočna deska naslednjim odkritjem, ki so potrdila povezavo med določeno kromosomsko nepravilnostjo in specifičnim fenotipom oziroma boleznijo. Leta 1959 je prišlo do odkritja trisomije 21, sprememb v številu spolnih kromosomov ter kromosoma Philadelphia kot vzroka kronične mieloične levkemije (3).

1.1 KROMOSOMSKE PREUREDITVE PRI KRVNIH BOLEZNIH

Preureditve kromosomov so lahko naključne ali pa se pri določeni bolezni ponavljajo. Ponavljajoče preureditve so tiste kromosomske spremembe, ki se dosledno pojavljajo pri večjem številu bolnikov z isto boleznijo in so pomembne, ker omogočijo prepoznavo genov vpletenih v razvoj maligne novotvorbe. Določitev ponavljajočih preureditev ima lahko diagnostični in/ali prognostični pomen. Prisotnost določenih preureditev lahko napoveduje ugodnejši potek bolezni, druge preureditve in/ali več preureditev, hkrati pa ima neugoden napovedni pomen (4).

Kromosomske preureditve delimo na uravnotežene (translokacije, inverzije) in neuravnotežene (insercije, pomnožitve, delecije...). Med pogostejše preureditve pri malignih krvnih boleznih spadajo translokacije, delecije ter številčne spremembe kromosomov (monosomije, trisomije) (5).

Klonalne citogenetske nepravilnosti so prisotne pri večini bolnikov z akutno mieloblastno levkemijo (AML). Pogoste nepravilnosti so trisomija 8, delecije (del(5q) in del(7q)), translokacije (t(8;21)(q22;q22) in t(15;17)(q22;q21)) ter inverzije (inv(16)(p13;q22), inv(3)(q21q26)). Nepravilnosti t(8;21), t(15;17) in inv(16) so napovedno ugodne, medtem ko so izgube celotnih kromosomov ali delov kromosomov 5 in 7 neugodne (6). Translokaciji t(9;22)(q32;q11) in t(4;11)(q21;q23), ki sta značilni za akutno limfoblastno levkemijo (ALL), pomenita izrazito neugoden potek bolezni, medtem ko sta translokacija t(12;21)(p12;q22) in hiperdiploidnost, zlasti pogosti pri otroških ALL, napovedno ugodni.

Translokacija t(9;22) je značilen označevalec kronične mieloične levkemije (KML), vendar velja za ponavljajočo preureditev tudi pri ALL (5).

Nekdaj uveljavljena trditev, da je kompleksni kariotip s tremi ali več preureditvami izrazito neugoden, danes ne velja več popolnoma, saj je napovedni pomen odvisen tako od števila preureditev, od vpletenosti kromosomov 5 in 7 ter tega, ali je kariotip monosomen. Monosomni kariotip vsebuje eno monosomijo avtosomnih kromosomov poleg drugih strukturnih preureditev in je pogosto tudi del kompleksnega kariotipa. Pri AML je povezan z izrazito slabim napovednim pomenom (7).

Pri opredelitvi kompleksnejših preureditev nam, poleg standardne analize proganja kromosomov, pomagajo različne izvedbe fluorescenčne *in-situ* hibridizacije (FISH), med njimi tudi večbarvni FISH (M-FISH) oziroma spektralna kariotipizacija (SKY) (8).

1.2 VLOGA CITOGENETIKE V HEMATOLOGIJI

Citogenetika je veja genetike, katere namen je proučevanje strukture in posledično funkcije kromosomov. Preučevanje kromosomov v metafazi celične delitve, ko so najbolj vidni, zahteva uporabo specifičnih tehnik. Preiskujemo vzorce, ki vsebujejo spontano deleče se celice, ali pa moramo celice spodbuditi k delitvi. Spontano deleče se celice najdemo v amnijski tekočini, kostnem mozgu, različnih tumorjih in tumorskih infiltratih, limfatičnem tkivu, pa tudi v venski krvi bolnikov z levkemizirano obliko maligne novotvorbe. Ker ti vzorci večinoma ne vsebujejo dovolj delečih se celic, jih predhodno praviloma gojimo. Zrele limfocite T venske krvi gojimo rutinsko z dodatkom mitogena fitohemaglutinina (PHA) (2).

1.2.1 STANDARDNA CITOGENETSKA PREISKAVA

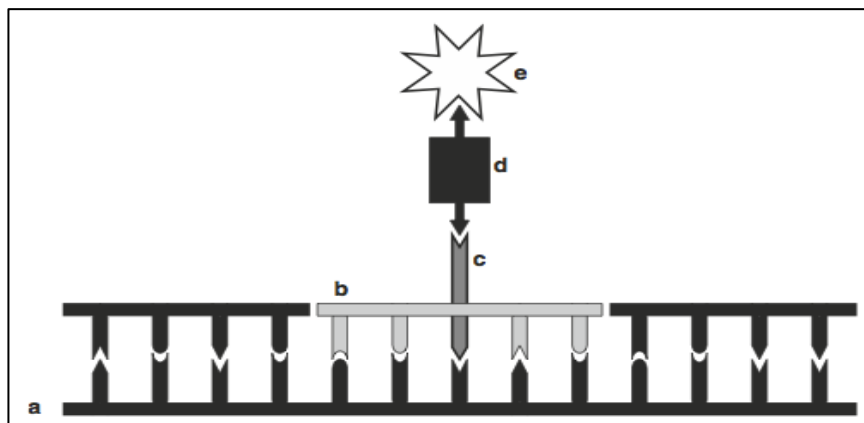
Standardna citogenetska preiskava je osnovno in temeljno orodje vpogleda v genom in je v hematologiji pomembna tako za postavitev natančne diagnoze in izbiro ustrezne terapije, določitev velikosti malignega klona, napoved poteka bolezni, prav tako pa tudi za potrditev remisije ali ugotavljanje ponovitve bolezni. Po sprejetih smernicah se mora vedno opraviti standardna citogenetska preiskava, FISH je njej dopolnilna preiskava (8).

Temeljne stopnje citogenetske preiskave so priprava celične kulture in gojenje celic v ustreznem ravnem mediju pri pogojih, ki so čim bolj podobni fiziološkim, izolacija in fiksacija celic, proganje in barvanje kromosomov ter končno analiza kariotipa (2).

1.2.2 FLUORESCENČNA *IN-SITU* HIBRIDIZACIJA

Enega najpomembnejših napredkov je v osemdesetih letih predstavljalo odkritje *in-situ* hibridizacije določenega zaporedja DNA na tarčno kromosomsko zaporedje. Detekcija, ki je sprva temeljila na radioaktivno označenih sondah, se je do današnjega časa zelo izpopolnila s pomočjo fluorescenčnih označevalcev (2).

FISH je integralni del citogenetske preiskave, saj omogoča tarčno iskanje kromosomskih preureditev. Glavna prednost FISH preiskave je možnost njenega izvajanja na interfaznih jedrih celic, saj je zaradi majhnega mitotskega indeksa, zlasti pri novotvorbah, težko dobiti celice v metafazi celične delitve. Predhodno moramo poznati vpletene gene, ker na osnovi tega uporabimo točno določeno sondo z zaporedjem, komplementarnim tem genom. Sonda je označena s fluorokromom, to je barvilo, ki pod vplivom UV-svetlobe emitira vidno svetlobo (fluorescenca) in tako omogoči zaznavanje sonde (9).



Slika 1: Shematski prikaz principa FISH: (a) tarčno zaporedje DNA na kromosomu; (b) DNA-sonda; (c) označevalec (npr. digoksigenin-11-dUTP), ki omogoča vezavo protitelesa; (d) protiteleso (npr. anti-digoksigenin); (e) fluorokrom (npr. Texas Red) (9)

Zaporedje korakov pri FISH postopku mora biti izvedeno natančno (9):

- nanos fiksiranih celic na objektno steklo,
- encimska predobdelava celic,
- denaturacija vzorca in sonde,
- hibridizacija,
- spiranje nespecifično vezane sonde,
- ocenjevanje signalov.

Za FISH preiskavo se lahko uporablja enak način gojenja, fiksacije in izolacije celic kot pri standardni citogenetski preiskavi. Denaturacija vzorca in sonde lahko poteka ločeno ali sočasno (kodenaturacija).

Običajno poteka pri 73 °C, kar povzroči ločitev dvoverižnega zaporedja DNA na dve enoverižni zaporedji. Hibridizacija poteka (navadno čez noč) pri 37 °C. Ker sonde na objektno steklo dajemo v presežku, je potrebno po hibridizaciji sprati odvečno sondo z raztopino neionskega detergenta. Na preparat naneseemo še DAPI, to je nasprotno obarvan fluorokrom, ki obarva jedrni kromatin (9).

1.3 FISH DNA-SONDE

Danes je na voljo veliko kvalitetnih, direktno označenih komercialno dostopnih FISH sond. Omogočajo močno intenziteto signala brez motečega ozadja. Glavna prednost direktno označenih sond je, da se lahko hkrati uporabita dve ali več sond, pri čemer je vsaka označena z drugačnim fluorokromom (10).

FISH DNA sonde običajno delimo na (11):

- centromerno specifične sonde (CEP),
- telomerno specifične sonde (TEL),
- WCP sonde (“whole chromosome painting probes”)
 - sonde za SKY in večbarvni FISH (M-FISH),
- lokus specifične sonde (LSI),
- sekvenčno specifični kloni BAC/YAC.

1.3.1 SONDE CEP

Sonde CEP (centromere enumerating probe) so ponavljajoča zaporedja DNA, katerih tarča so visoko ponavljajoča 171 kb dolga $\alpha(\beta)$ satelitna zaporedja centromerne DNA. Ta zaporedja so specifična za posamezen kromosom, zato lahko s sondami CEP zaznamo številčne spremembe (monosomije, trisomije) (11).

1.3.2 SONDE WCP

Sonde WCP so sestavljene iz večih prekrivajočih se sond, ki prepoznavajo in se vežejo na specifična ne-ponavljajoča zaporedja vzdolž celotne dolžine tarčnega kromosoma. Z njihovo uporabo določamo izvor markerskih kromosomov in preureditev, ki jih s standardno citogenetsko preiskavo ne znamo razrešiti (9). Majhnih ali kriptičnih preureditev velikosti < 2–3 Mbp z WCP sondami ne moremo zaznati (10). FISH z uporabo sond WCP je podlaga za M-FISH (24-barvni FISH) in SKY. Obe preiskavi izvajamo na metafaznih kromosomih (12).

1.3.3 SONDE LSI

Lokus specifične sonde se vežejo na specifična tarčna kromosomska zaporedja. Z njimi zaznamo pomnožitve ali izgube (večje ali manjše število kopij določenega lokusa oziroma gena) ter različne preureditve tako na interfaznih jedrih kot na metafaznih kromosomih. FISH z uporabo sond LSI lahko razkrije kriptične preureditve, ki s standardno citogenetsko preiskavo niso vidne. V nasprotju s centromernimi sondami, ki dajo močan fluorescenčni signal, so sonde LSI manjše, biti pa morajo velikosti vsaj 20 kb za zagotavljanje dovolj močnega signala, da ga lahko vrednotimo (10,11).

Sonde LSI za zaznavanje translokacij delimo na dva podtipa (11):

- fuzijske sonde (dvojne, enojne),
- razcepne sonde.

1.3.4 SEKVENČNO SPECIFIČNI KLONI BAC/YAC

FISH z uporabo klonov BAC/YAC se običajno uporablja za označevanje kromosomske regije, znotraj katere se nahaja prelomna točka. Sonde imajo lahko za tarčo zaporedje na ravni posameznega gena. Pogosto se uporabljajo pri diagnostiki mikrolecij in mikroduplicacij (< 1 Mb). Klone izberemo iz t. i. genomske knjižnice, ki predstavlja nabor rekombinantnih klonov vseh genov človeškega organizma (12).

Za nastanek genomske knjižnice je potrebnih več zaporednih korakov. Začne se z izolacijo DNA iz levkocitov in uporabo restriksijskih encimov, da pridobimo manjše fragmente DNA. S pomočjo gelske elektroforeze fragmente ločimo po velikosti in jih vstavimo v vektorje, katere nato prenesemo v bakterijske celice. Nazadnje sledi izbira primernih klonov BAC za genomsko knjižnico (13).

Vektorji so molekule, sposobne pomnoževanja znotraj gostiteljske celice z namenom proizvodnje velikega števila kopij rekombinantne DNA. Najpogosteje uporabljeni vektorji so plazmidi in bakteriofagi. BAC vektorji temeljijo na plazmidu F, ki izvira iz bakterije *Escherichia coli* in imajo večjo kapaciteto v primerjavi z običajnimi plazmidnimi vektorji, zato so primerni za človeški genom. BAC omogočajo vstavljanje fragmentov DNA do 300 kb in s tem zmanjšajo obseg človeške genomske knjižnice na 30 000 klonov (14).

Klone za analizo smo izbrali na podlagi njihovega mesta hibridizacije na kromosome. Glede na podatkovno bazo CGAP (Cancer Genome Anatomy Project) smo izbrali klon s tako širino pokrivanja, da je zajel celotni analizirani gen. Začetek in konec klona morata biti izven meja analiziranega gena. Začetno smo izbirali klone, ki hibridizirajo na področja že znanih onkogenov, nato pa smo se usmerili na gene, ki jih ne uvrščamo med onkogene.

1.4 SPEKTRALNA KARIOTIPIZACIJA

Spektralna kariotipizacija (SKY) je 24-barvna metoda, ki omogoča hkratno vizualizacijo vseh kromosomov. Temelji na hibridizaciji kombinatno označenih sond na metafazne kromosome, ki jih preiskujemo. Zmožnost SKY metode za zaznavanje izvora markerskih kromosomov in drugih kromosomskih preureditev jo uvršča med zelo občutljive in uporabne načine razreševanja kompleksnih kromosomskih preureditev (15).

1.4.1 SONDE IN BARVE PRI SKY

Sonde za SKY pripravljajo s pomnoževanjem kromosomov (DOP-PCR), predhodno izoliranih s pomočjo pretočne citometrije. Tako pomnoženo zaporedje DNA (sonda) v naslednjem koraku označijo z različnimi fluorokromi (16).

Uporablja se 5 različnih fluorescenčnih barv, da z njihovo kombinacijo lahko označimo 24 različnih kromosomov (22 avtosomnih, X in Y). Teoretično je možno proizvesti $2^N - 1$ barv, če je N število uporabljenih fluorescenčnih barv. V primeru 5 različnih barv je torej na voljo 31 različnih kombinacij. V praksi je zaradi določenih fluorescenc, ki so preblizu infrardečemu spektru, uporabnih barv manj. Za procesiranje spektralnih slik se uporablja dvodimenzionalni spektroskopski sistem, ki tvori 24 makroskopsko ločljivih barv (17).

Na podobnem principu deluje tudi M-FISH, razlika je le pri procesu pridobivanja spektralne slike. Pri M-FISH-u pridobimo ločene slike za vsakega izmed petih fluorokromov posebej s pomočjo ozkih mikroskopskih filtrov. Te slike se potem z ustrežno programsko opremo združijo v eno skupno sliko. Kromosomi se razvrstijo glede na fluorescenčni vzorec, ki ga zazna vsak filter (18,19).

1.4.2 IZVEDBA SKY

Postopek je sestavljen iz šestih korakov, in sicer priprave metafaznih preparatov, predobdelave preparatov, ločene denaturacije preparata in sond, hibridizacije in post-hibridizacijskega spiranja, zajemanja slike in njene analize.

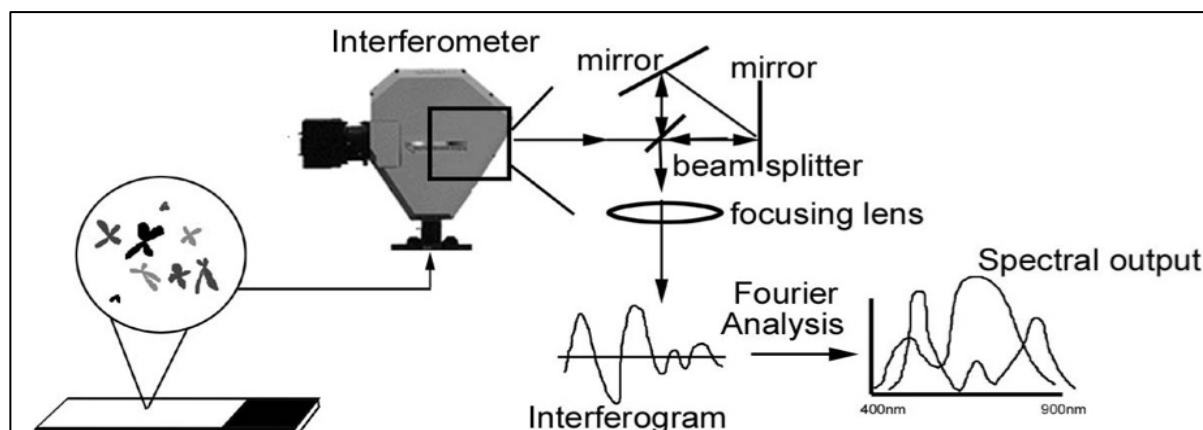
Priprava metafaznih preparatov zahteva poznavanje ustreznih razmer kulture za pridobitev čim večjega števila metafaz ter ustrezno nanašanje vzorca, da se pridobijo čim bolj kakovostni preparati s čim manj citoplazme okoli kromosomov in z njihovo dobro razporeditvijo. To je temeljni predpogoj za uspešno izvedbo postopka (20).

Predobdelava preparatov je zelo podobna tisti pri FISH preiskavi, vključno z inkubacijo preparatov v raztopini proteaze za lažji dostop sond do kromosomov, spiranjem v pufrih in končno dehidracijo. Na predhodno s formamidom denaturirane preparate nanesemo predhodno denaturirane sonde SKY, nakar 24–72 ur poteka **hibridizacija** sond na metafazne kromosome. Po končani hibridizaciji sledi **spiranje** nevezanih in nespecifično hibridiziranih sond. **Zajemanje in analiza slike** poteka s pomočjo epifluorescenčnega mikroskopa, ki je opremljen z ustrezno strojno in programsko opremo za vizualizacijo kromosomov (20).

1.4.3 PRINCIP SPEKTRALNEGA PRIDOBIVANJA SLIKE

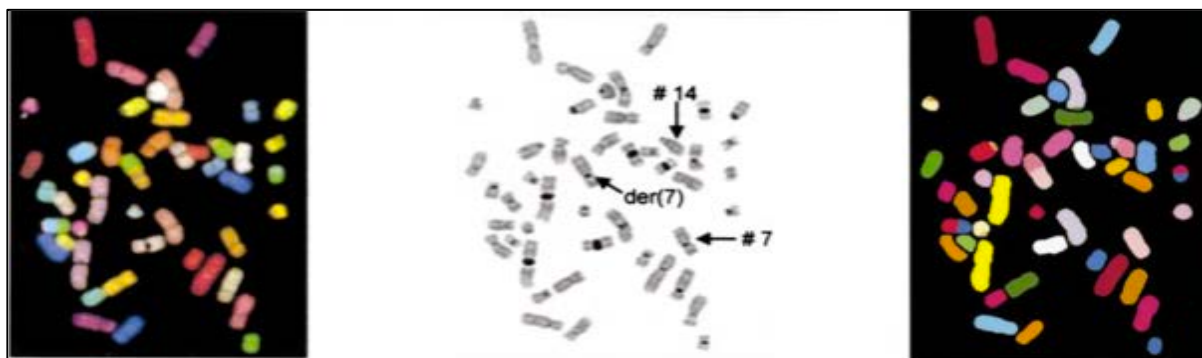
SKY temelji na principih spektralnega slikanja in Fourierjeve spektroskopije. Pet spektralno različnih čistih barv se uporablja v različnih kombinacijah za proizvodnjo mešanice sond, ki hibridizira na metafazne preparate. Priprava slike zahteva uporabo običajne fluorescenčne mikroskopije in posebno oblikovanega trojnega filtra (SKY CUBE™). Svetloba potuje skozi interferometer na napravo, ki je občutljiva na svetlobo (CCD kamera). Interferometer razdeli svetlobo, ki izhaja iz mikroskopa, na dva koherentna žarka in med njima ustvari razliko optične poti. Žarka sta potem rekombinirana, tako da interferirata med sabo. Nastalo intenziteto interference žarkov izmeri detektor kot funkcijo razlike optične poti (OPD). Ta intenziteta interference napram funkciji OPD se imenuje interferogram. Spektralna slika nastane tako, da pridobimo ~ 100 okvirjev iste slike, ki se med sabo razlikujejo le po razliki optične poti (OPD). Spektralne slike pridobimo in analiziramo s pomočjo ustrezne programske opreme, ki pri njihovi obdelavi uporablja Fourierjevo transformacijo interferograma (*slika 2*). Na ta način pridobimo spekter za vsako slikovno točko (15, 21).

Metoda spektralnega slikanja s Fourierjevo spektroskopijo ima vrsto prednosti pred ostalimi, med najpomembnejšimi je zagotovo visoka optična pretočnost ter visoka in variabilna spektralna resolucija (21).



Slika 2: Shematski prikaz pridobivanja spektralne slike pri SKY (15)

Vsak kromosom ima edinstven izgled, ki nastane zaradi specifične kombinacije ene ali več izmed petih barv. Ko je spektralna slika pridobljena, programska oprema primerja to sliko s kombinatorno knjižnico. Ta vsebuje vse kombinacije fluorokromov za vsak kromosom. Na ta način se tvori t. i. klasificirana slika, kjer so kromosomi v psevdo barvah. Druga možnost prikaza kromosomov je slika RGB (Red-Green-Blue), ki prikazuje kromosome v fluorescenčnih barvah in hkrati tudi omogoči oceno določenih parametrov, kot sta intenziteta in homogenost hibridizacije (slika 3). Identiteta vsakega kromosomskega področja je določena z meritvijo spektralne emisije vsake slikovne točke. Področja, kjer prihaja do preureditev, so vidna kot spremembe barve (15, 21).



Slika 3: Prikazi iste metafaze pri SKY. Levo: pogled RGB; sredina: pogled DAPI; desno: psevdo barve. Puščice prikazujejo preurejeni kromosom 7 (der(7)) ter normalna kromosoma 7 in 14 (22).

1.4.4 KLINIČNA UPORABNOST SKY

Glavna prednost SKY je enostavna vizualizacija in interpretacija rezultatov. SKY je uporabna za razreševanje izvora markerskih kromosomov, translokacij in pomnožitev, z njo pa ne moremo ocenjevati strukturnih preureditev kot so inverzije, delecije, insercije in duplikacije znotraj samega kromosoma, ker v teh primerih ni spremembe barv. Zaradi teh omejitev je SKY najbolje uporabljati v kombinaciji z barvanjem GTG ter FISH (17, 21).

Eno izmed prvih objavljenih poročil uporabe SKY na področju hematoloških novotvorb je bila študija hematoloških novotvorb Veldmana T. s sodelavci, ki je vključevala bolnike s KML, AML, MDS in ALL. V tej študiji je SKY analiza potrdila prvotne preureditve, identificirala izvor markerskih kromosomov kot tudi pokazala nekatere translokacije, ki niso bile odkrite s predhodnim proganjem. Izboljšana občutljivost in zmožnost zaznavanja teh preureditev je takoj nakazovala na pomembno vlogo, ki bi jo metoda lahko imela (23).

Markovic in sodelavci so preučevali serijo variantnih translokacij t(9;22) z uporabo FISH in SKY. Pokazali so, da gre za *de-novo* translokacije, ki naj bi sovpadale z nastopom bolezni (15).

Uporaba SKY je potrdila pogoste spremembe kromosomov 5 in 7 pri AML. Podoben rezultat je dala študija bolnikov z MDS, kjer pogosto prihaja do izgub materiala na dolgih krakih kromosomov 5 in 7 (15). SKY analiza je razkrila, da so te, sicer pogoste izgube, povezane z neuravnoteženimi in kriптиčnimi translokacijami. Kakazu in sodelavci so s konvencionalnim proganjem in SKY preiskali 20 primerov MDS. Proganje je razkrilo pričakovane izgube -7/7q in -5/5q. SKY pa je pri določenih vzorcih dodatno razkril, da delecije niso bile enostavne intersticijske izgube, temveč je šlo za kriптиčne, neuravnotežene translokacije, ki so posledično vodile v delecije 5q oziroma 7q (24).

SKY so uporabili tudi pri drugih krvnih novotvorbah. Sawyer in sodelavci so našli 6 primerov diseminiranega plazmocitoma s translokacijo t(14;16)(q32;q23). SKY torej izboljša občutljivost citogenetske analize in omogoči tudi zaznavo novih preureditev (15).

1.4.5 UPORABA SKY ZA RAZREŠEVANJE KOMPLEKSNIH PREUREDITEV

Preureditve v sklopu kompleksnih kariotipov pomenijo še posebej težavno interpretacijo za analitike, še zlasti ko so vpletene kromosomske regije, ki imajo podoben vzorec G proganja. SKY lahko izboljša zaznavo preureditev oziroma popravi njihovo napačno interpretacijo, ki temelji na proganju GTG. Ker kromosomske spremembe predstavljajo neodvisen napovedni dejavnik in omogočijo izbiro ustrezne terapije, je njihova natančna opredelitev nujna (25).

Mrozek in sodelavci so uporabili SKY pri 29 bolnikih z AML in kompleksno preurejenimi kariotipi, ki so vsebovali do devet preureditev, ki niso bile uspešno prepoznane s proganjem. S pomočjo SKY so uspešno prepoznali izvor kromosomskega materiala pri vseh neuravnoteženih translokacijah in pri večini markerskih kromosomov. Hkrati so zaznali tudi 3 skrite preureditve pri navidezno normalnih kromosomih (26).

2 NAMEN DELA

Namen naloge je vpeljati in optimizirati metodo spektralne kariotipizacije ter jo uporabiti pri razreševanju kromosomskih preureditev, ki jih ne moremo opredeliti z drugimi citogenetskimi načini. Metodo bomo vpeljali z uporabo vzorcev, ki so imeli potrjen normalni kariotip, nato pa jo bomo uporabili pri vzorcih s preurejenim kariotipom. Pri vpeljavi metode bomo po potrebi optimizirali posamezne dele postopka.

Pričakujemo, da bo SKY omogočila učinkovito odkrivanje izvora markerskih kromosomov. Pričakujemo tudi, da bomo razjasnili preureditve, kjer partnerski kromosomi niso nedvoumni. Metodo bomo kombinirali tudi s proganjem GTG in FISH analizo. Z uporabo komercialno dostopnih DNA-sond in klonov BAC bomo skušali določiti prelomna mesta in vpletene gene pri kromosomskih preureditvah. SKY bomo poskusili izvesti tudi na predhodno GTG proganih kromosomih, kar bi dodatno izboljšalo možnost razreševanja preureditev pri bolnikih z manjšim deležem preurejenih metafaz. Na ta način bomo poskušali razrešiti kompleksno preurejene kariotipe.

Z uporabo predhodno označenih klonov BAC bomo poskušali določiti prelomna mesta in vpletene gene pri tistih kromosomskih preureditvah, ki v literaturi še niso opisane.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

Kot izhodiščni je pri naši nalogi služil izsledek standardne citogenetske preiskave proganih kromosomov in FISH preiskave, ki se uporablja rutinsko pri določeni napotni diagnozi. Pri vseh izbranih bolnikih smo zaradi neopredeljenih ali novih kromosomskih preureditev nato uporabili dodatne metode molekularne citogenetike.

3.1 PREISKOVANCI

Analize smo izvedli na vzorcih, ki so bili poslani v redno diagnostično obravnavo. Naše delo je razširilo nabor preiskav za celovito opredelitev citogenetskih preureditev, ki smo jih opazili.

Izbrali smo vzorce 5 preiskovancev, od katerih je bil en vzorec periferna kri, štirje pa kostni mozeg. Od preiskovancev je eden imel diagnozo KLL, ostali pa različne mieloične maligne novotvorbe. Kot kontrolo smo uporabili vzorec izoliranih celic moškega preiskovanca z normalnim kariotipom 46,XY. Osnovni podatki o preiskovancih so v *tabeli 1*.

Tabela 1: Osnovni podatki o preiskovancih

ZAPOREDNA ŠTEVILKA PREISKOVANCA	SPOL	NAPOTNA DIAGNOZA	VZOREC	PODATKI IZ RUTINSKE ANALIZE
1	Ž	AML	KM	markerski kromosom
2	M	/	KM	brez preureditev – normalna kontrola
3	M	KLL	PERIFERNA KRI	kompleksno preurejen kariotip z neopredeljeno preureditvijo gena <i>IGH</i>
4	M	MDS	KM	kompleksni kariotip z markerskim kromosomom
5	M	AML	KM	nepoznana preureditev kromosoma 2

3.2 MATERIALI

3.2.1 OSNOVNE RAZTOPINE

- **1 M MgCl₂** (203,31 g/L* 6 H₂O); Kemika, Zagreb, Hrvaška
- **1 M NaOH** (20 g/500 mL H₂O); Kemika, Zagreb, Hrvaška
- **1 M HCl** (4,24 mL koncentrirane HCl (36 %) dolijemo z H₂O do 50 mL oznake); Kemika, Zagreb, Hrvaška
- **SSC (citratna slanica - spiralna raztopina):**
 - **20×SSC:** 3 M NaCl (175,3 g/L)
0,3 M Na₃C₆H₅O₇* 2H₂O (88,25 g/L), dolijemo vodo do oznake, uravnamo pH vrednost na 6,3 (5,3) z 1 M HCl ter filtriramo.
- **hipotonični KCl** (0,075 M (5,59 g/L); Sigma, St. Louis, ZDA
- **pepsin (2,5 %)**; Sigma, St. Louis, ZDA
- **PBS raztopina:**
 - **10×PBS:** NaCl (80 g/L)
KCl (2 g/L)
KH₂PO₄ (2 g/L)
Na₂HPO₄ (11,5 g/L)

Dolijemo destilirano vodo do 900 mL oznake, uravnamo pH na 7,4 in dolijemo vodo do oznake 1000 mL. Proizvajalec vseh kemikalij je Kemika.

 - **1×PBS:** 100 mL 10× PBS dopolnimo z destilirano vodo do 1000 mL.
- **Fosfatni pufer:**
 - 245 mL 0,06 M Na₂HPO₄ (8,52 g/L Na₂HPO₄; Kemika, Zagreb, Hrvaška)
 - 255 mL 0,06 M KH₂PO₄ (8,16 g/L KH₂PO₄; Kemika, Zagreb, Hrvaška)

pH vrednost uravnamo na 6,8.

3.2.2 RAZTOPINE ZA GOJENJE, IZOLACIJO IN FIKSACIJO CELIC PERIFERNE KRVI IN KOSTNEGA MOZGA

3.2.2.1 Gojenje celic

- GOJIŠČA: gojišče RPMI™ Medium 1640 (Gibco, Invitrogen, ZDA) za periferno kri in gojišče MarrowMax™ Bone Marow Medium (Gibco, Invitrogen, ZDA) za kostni mozeg
- RAZTOPINA TIMIDINA (0,025 M, Sigma, St. Louis, ZDA): 1 g timidina raztopimo v 167 mL Hankove raztopine
- HANKOVA RAZTOPINA: Hank's Solution (Sigma, St. Louis, ZDA)
- KOLCEMID: KaryoMax® Colcemid™ Solution (Invitrogen, ZDA)
- RAZTOPINA EKAMP-a (Euroclone, Milano, Italija)
- RAZTOPINA IL-2 (Invitrogen, ZDA)

3.2.2.2 Izolacija in fiksacija celic

- HIPOTONIČNA RAZTOPINA: pripravimo jo svežo iz 7 mL hipotoničnega KCl, 6 mL destilirane vode in 1 mL FBS seruma (Sigma, St. Louis, ZDA)
- FIKSACIJSKA RAZTOPINA ETANOLA IN OCETNE KISLINE:
 - *absolutni etanol* (Sigma, St. Louis, ZDA): *ocetna kislina* (Merck, Darmstadt, Nemčija) = 3:1

3.2.3 FLUORESCENČNA *IN-SITU* HIBRIDIZACIJA

3.2.3.1 Predobdelava stekel

- RAZTOPINA PEPSINA (0,005 %):
 - 99 mL vode,
 - 1 mL 1 M HCl,
 - dodamo 200 µL koncentrirane raztopine pepsina in segrejemo na 37 °C.
- 2×SSC:
 - 100 mL 20×SSC (pH = 6,3) dolijemo 850 mL destilirane vode.
 - Uravnamo pH vrednost na 7,0 +/- 0,2 in dopolnimo z vodo do 1000 mL.

- RAZTOPINA FORMALDEHIDA:
 - 5 mL 1 M MgCl₂,
 - 2,5 mL 37% formaldehida,
 - dopolnimo do 100 mL z 2×SSC (pH = 7) raztopino.
- RAZTOPINE ETANOLA:
 - 70% EtOH: 70 mL absolutnega etanola dopolnimo z destilirano vodo do 100 mL,
 - 90% EtOH: 90 mL absolutnega etanola dopolnimo z destilirano vodo do 100 mL,
 - 100% EtOH: absolutni etanol (Sigma, St. Louis, ZDA).

3.2.3.2 Nanos sond

- sonde proizvajalcev Vysis (Abbott, Illinois ZDA) in Kreotech (ON Poseidon in WC Poseidon) (Leica, Amsterdam, Nizozemska)
- hibridizacijski pufer Vysis (WC Poseidon)
- krovna stekla (Brand, Werheim, Nemčija)
- gumijasti cement Fixo (Marabu, Tamm, Nemčija)

3.2.3.3 Spiranje po hibridizaciji

- NP-40 spiralna raztopina:
 - 0,9 g detergenta NP-40 (BDH Chemicals Ltd., Poole, Anglija),
 - 60 mL 20×SSC (pH = 6,3),
 - 240 mL destilirane vode. Pustimo stati čez noč in filtriramo.
- PBT raztopina:
 - 2 mL BSA (6% raztopina; Sigma, St. Louis, ZDA),
 - 0,5 mL Tween 20 (Sigma, St. Louis, ZDA),
 - dopolnimo do 500 mL s 1×PBS pufrom. Pustimo stati čez noč in filtriramo.
- DAPI counterstain II (Abbott, Illinois, ZDA).

3.2.4 FISH Z UPORABO KLONOV BlueFISH™

Postopek je enak kot pri FISH analizi, razlikujejo se samo naslednji koraki:

3.2.4.1 Ločena denaturacija z uporabo klonov BlueFISH™

- DENATURACIJSKA RAZTOPINA FORMAMIDA:
 - 70 mL formamida (ThermoFischer Scientific, ZDA)
 - 10 mL 20×SSC (pH = 6,3), dopolnimo z destilirano vodo do 100 mL. Raztopino segrejemo na 70 °C.

3.2.4.2 Nanos klonov

- kloni BlueFISH proizvajalca Bluegnome (Illumina, Cambridge, Anglija)
- LSI pufer proizvajalca Vysis (Abbott, Illinois, ZDA)
- krovna stekla (Brand, Werheim, Nemčija)
- gumijasti cement Fixo (Marabu, Tamm, Nemčija)

3.2.4.3 Spiranje po hibridizaciji

- 0,4× SSC raztopina:
 - 2 mL 20×SSC (pH = 6,3) dopolnimo z destilirano vodo do 100 mL.
- 2×SSC/0,05% Tween 20 (Sigma, St. Louis, ZDA):
 - 10 mL 20×SSC,
 - 5 µL Tween 20, dopolnimo z destilirano vodo do 100 mL.
- DAPI counterstain II (Abbott, Illinois, ZDA)

3.2.5 SPEKTRALNA KARIOTIPIZACIJA (SKY)

3.2.5.1 Denaturacija kromosomov

- DENATURACIJSKA RAZTOPINA FORMAMIDA:
 - 35 mL formamida,
 - 5 mL 20×SSC (pH = 6,3), dopolnimo z destilirano vodo do 50 mL oznake. Uravnemo pH vrednost na 7,0 in segrejemo na 72 °C.
- RAZTOPINE ETANOLOV:
 - 70% EtOH: 70 mL absolutnega etanola dopolnimo z destilirano vodo do 100 mL.

- 80% EtOH: 80 mL absolutnega etanola dopolnimo z destilirano vodo do 100 mL.
- 100% EtOH (Sigma, St. Louis, ZDA).

3.2.5.2 Denaturacija sonde in hibridizacija

- SKY reagent (Applied Spectral Imaging, Yokneam ha zafon, Izrael)
- krovna stekla (Brand, Werheim, Nemčija)
- gumijasti cement Fixo (Marabu, Tamm, Nemčija)

3.2.5.3 Spiranje po hibridizaciji

- 0,4×SSC: 2 mL 20×SSC (pH = 6,3) dopolnimo z destilirano vodo do 100 mL.
- 4×SSC /0,1% Tween 20:
 - 200 mL 20×SSC (pH = 6,3),
 - 1 mL Tween 20 (Sigma, St. Louis, ZDA),
 - dopolnimo z destilirano vodo do 1000 mL in dobro premešamo.
- 4×SSC: 10 µL 20×SSC (pH = 6,3) redčimo s 400 µL destilirane vode.
- DAPI Antifade reagent (Applied Spectral Imaging, Yokneam ha zafon, Izrael).

3.2.5.4 Barvna reagentna Cy5 in Cy5.5

- Cy5 in Cy5.5 reagentna (Applied Spectral Imaging, Yokneam ha zafon, Izrael) pred uporabo razparceliramo po 5 µL v črne mikrocentrifugirke in shranimo na -20 °C.
 - Cy5: 1 µL redčimo s 100 µL 4×SSC
 - Cy5.5: 1 µL redčimo z 200 µL 4×SSC

3.2.5.5 SKY na predhodno GTG proganih preparatih

- metanol (Sigma, St. Louis, ZDA)
- *fiksacijska raztopina: metanol (Sigma, St. Louis, ZDA) : očetna kislina (Merck, Darmstadt, Nemčija) = 3:1*
- 2 × SSC:
 - 100 mL 20×SSC (pH = 6,3) dolijemo 850 mL destilirane vode. Uravnamo pH vrednost na 7,0 +/- 0,2 in dopolnimo z vodo do 1000 mL.

3.2.6 GTG PROGANJE

- TRIPSIN (Sigma, St.Louis, ZDA)
- 1×PBS: 100 mL 10×PBS dopolnimo z destilirano vodo do 1000 mL.
- RAZTOPINA GIEMSE (Sigma, St. Louis, ZDA) IN FOSFATNEGA PUFRA:
 - 72 mL fosfatnega pufra dodamo 3 mL Giemse.

3.2.7 LABORATORIJSKI PRIPOMOČKI

- pipete Reference/Research 10µL, 20 µL, 100 µL, 1000 µL (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- nastavki za pipete (T.I.P.S. Eppendorf Dualfilter)
- krovna stekla 22 x 22 mm², 24 x 50 mm² (Brand, Werheim, Nemčija)
- objetna stekla (Vitrognost, Zagreb, Hrvaška)
- merilni valji 100 mL
- bučke 500 mL, 1000 mL
- steklene kivete za objektna stekla
- diamantno rezilo
- pincete
- pasterurjeve pipete 3 mL (Falcon, Kalifornija, ZDA)
- sterilne pipete Dispenser 10 mL, 5 mL
- pipeta Easypet (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- štoparice Asistent
- črne mikrocentrifugirke 1,5 mL
- centrifugirke 15 mL (Greiner Bio One, Frickenhausen, Nemčija)
- centrifugirke – “falkonke” 50 mL
- črna škatla z dvojnimi dnom
- parafilm
- aluminijasta folija
- gumijasti cement Fixo (Marabu, Tamm, Nemčija)

3.2.8 APARATURE

- vodna kopel (Termoproc, Ljubljana, Slovenija)
- vodna kopel Julabo (Electra bema d. o. o., Brezovica, Slovenija)
- vertikalna laminarna komora (Iskra Pio, Šentjernej, Slovenija)
- hibridizator Thermobrite (Abbott, Illinois, ZDA)
- centrifuga Minispin (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- centrifuga Labofuge 400 (Manchester, ZDA)
- vorteks Vibromix 10
- invertni mikroskop (Opton, Zahodna Nemčija)
- CO₂ inkubator Sanyo (Newbrunswick Scientific, New Jersey, ZDA)
- OptiChrome komora (Euroclone, Milano, Italija)
- grelna plošča (Termoproc, Ljubljana, Slovenija)
- pH meter Seven Easy (Mettler Toledo, Ohio, ZDA)
- tehtnica AX (Mettler Toledo, Ohio, ZDA)
- števec za štetje celic
- fluorescenčni mikroskop OLYMPUS BX – 41 (Olympus, Pennsylvanija, ZDA)

3.3 METODE

3.3.1 GOJENJE CELIC PERIFERNE KRVI IN KOSTNEGA MOZGA

Celice kostnega mozga in celice periferne krvi smo gojili na različna načina. Vzorec kostnega mozga smo najprej centrifugirali. S pasteurjevo pipeto smo zajeli plast mononuklearnih celic in jih resuspendirali v Hankovi raztopini ter ponovno centrifugirali. Odstranili smo supernatant in mononuklearnim celicam dodali 1 mL gojišča. Iz nastale raztopine smo potem odmerili potreben volumen celic in jih prenesli na gojišče. Gojišče smo predhodno pripravili iz 6,5 mL gojišča Marrowmax, 300 μ L timidina in 1mL FBS (2).

Periferni krvi smo predhodno izmerili številčno koncentracijo levkocitov, glede na katero smo izračunali potreben vcepek, ki ga pipetiramo na gojišče. Gojišče smo pripravili iz 6,5 mL gojišča RPMI™ Medium 1640, 9 μ L EKAMPA, 10 μ L IL-2 in 1 mL FBS (9).

Na posodice za celične kulture smo napisali ime in priimek preiskovanca, tip gojišča, datum in čas začetka gojenja. Celice kostnega mozga smo podvrgli 24-urnemu gojenju, celice periferne krvi pa 48- ali 72-urnemu gojenju v CO₂ inkubatorju pri 37 °C. Ob zaključku gojenja smo celicam kostnega mozga dodali 70 μ L, celicam periferne krvi pa 100 μ L kolcemida.

3.3.2 IZOLACIJA IN FIKSACIJA CELIC

Celice smo po končanem gojenju prenesli v centrifugirke. Po centrifugiranju in odstranitvi supernatanta smo celice izpostavili segreti hipotonični raztopini in jih inkubirali 25 min pri 37 °C.

Po končani inkubaciji smo raztopini dodali 3 kapljice fiksativa in jo ponovno centrifugirali. Odstranili smo supernatant in celicam po kapljicah dodajali fiksativ do skupnega volumna 8 mL, nakar smo jih inkubirali na sobni temperaturi 15 min. Ob izteku časa smo ponovno odcentrifugirali in po kapljicah dodajali fiksativ. Postopek smo ponavljali dokler supernatant ni bil prozoren. Izolirane celice smo shranili v zmrzovalniku pri -20 °C.

3.3.3 NANOS CELIC NA OBJEKTNA STEKLA

Objektna stekla smo namakali v raztopini Kemex A ter jih nato spirali 20 minut pod toplo vodo in 20 min pod hladno vodo. Sprana stekla smo potem še dvakrat sprali z destilirano vodo.

Nanosi celic na objektna stekla so se razlikovali glede na metodo, ki smo jo uporabili. Pri SKY, FISH z uporabo klonov BlueFISH in proganju GTG smo celice nanašali pod kotom 45° glede na objektno steklo. Pri ostalih FISH analizah smo nanašali celice pravokotno na objektno steklo. Nanašali smo po 20 µL celične suspenzije, pri kateri smo predhodno preverili gostoto celic. Preparate smo starali na vroči plošči 30 min pri 60 °C in 30 min pri 90 °C.

3.3.4 FLUORESCENČNA *IN-SITU* HIBRIDIZACIJA

3.3.4.1 Predobdelava stekel

Pred obdelavo stekel v raztopinah smo pod invertnim mikroskopom preverili gostoto in razporejnost celic in z diamantnim rezilom označili področja kasnejšega nanosa sond.

V vodni kopeli smo na 37 °C segreli dve stekleni kiveti, ki sta vsebovali 2×SSC in raztopino pepsina. Stekla smo v obeh raztopinah inkubirali 5 minut. Zatem smo spirali stekla v raztopinah na sobni temperaturi:

- 2×SSC, 2 minuti
- 2×SCC, 2 minuti
- 2×SSC, 2 minuti
- raztopina formaldehida, 10 minut
- 2×SSC, 2 minuti
- 2×SSC, 2 minuti
- 2×SSC, 2 minuti
- 70% EtOH, 2 minuti
- 90% EtOH, 2 minuti
- 100% EtOH, 2 minuti

Stekla smo posušili na zraku.

3.3.4.2 Nanos sond

Za FISH analizo smo uporabljali DNA-sonde proizvajalcev Vysis in Kreatech. Med sabo se ločijo glede na mesto hibridizacije, velikost in označevalec. Uporabili smo sonde, ki obarvajo celoten kromosom (WCP) in take, ki obarvajo specifičen del kromosoma oziroma posamezen gen (LSI, CEP). Podatki o uporabljenih DNA-sondah so zbrani v *prilogi 3*.

Nekatere od sond je bilo potrebno pred uporabo odtajati, ker se hranijo v zmrzovalniku. Izbrane sonde smo položili v minicentrifugo. Pred uporabo smo jih centrifugirali, da se vsebina zbere na dnu vsebnika, jih vorteksirali in spet ponovno centrifugirali. Na ta način smo zagotovili, da se je vsebina dobro premešala in se ni izgubila po stenah.

Po predpisanem postopku za točno določen tip sonde smo v črnih mikrocentrifugirkah pripravili hibridizacijske mešanice:

- Vysis (LSI/CEP):
 - 1 μL sonde,
 - 2 μL destilirane vode,
 - 7 μL hibridizacijskega pufra.
- Kreatech (ON POSEIDON):
 - 10 μL sonde.
- Kreatech (WC POSEIDON):
 - 2 μL sonde,
 - 8 μL hibridizacijskega pufra.

Vsebinsko mikrocentrifugirk smo ponovno centrifugirali, premešali na vorteksu in ponovno centrifugirali. Celotno hibridizacijsko mešanico smo nanесли na predhodno označeno področje na steklu in pokrili s krovnim steklom. Robove krovnega stekla smo zalepili z gumijastim cementom in stekla položili v hibridizator. Po izbiri programa za kodenaturacijo glede na uporabljeno sondo smo inkubirali stekla v hibridizatorju pri 37 °C.

3.3.4.3 Spiranje po hibridizaciji

Po končani hibridizaciji smo krovna stekla in gumijasti cement odstranili ter stekla najprej 4 minute inkubirali v spiralni raztopini NP-40, segreti na 73 °C, nato smo jih prestavili za 4 minute v PBT pri sobni temperaturi. Kiveto smo pokrili z aluminijasto folijo, da smo zaščitili stekla pred svetlobo.

Stekla smo potem odcedili na staničevini in na označeno območje nanесли 10 μL reagenta DAPI (counterstain) ter pokrili s krovnim steklom. Stekla smo do analize shranili v črni komori v zmrzovalniku pri -20 °C.

3.3.5 FISH Z UPORABO KLONOV BlueFISH

Pri nanosih klonov BlueFISH stekla predhodno nismo predobdelali kot pri standardni FISH analizi.

3.3.5.1 Denaturacija in hibridizacija

3.3.5.1.1 Ločena denaturacija in hibridizacija

Celice nanešene na objektna stekla smo najprej denaturirali z inkubacijo 2 minuti v raztopini formamida pri 70 °C. Sledila je dehidracija stekel v naraščajočih koncentracijah etanolov:

- 75% EtOH, 3 minute,
- 95% EtOH, 3 minute,
- 100% EtOH, 3 minute.

V črni mikrocentrifugirki smo pripravili hibridizacijsko mešanico iz 1 µL BlueFISH sonde in 12 µL LSI hibridizacijskega pufra. Sondo smo predhodno odtalili, premešali in centrifugirali. Hkrati lahko uporabimo največ tri različne BlueFISH sonde, saj hibridizacijska mešanica ne sme preseči volumna 15 µL (27).

Mikrocentrifugirko smo ponovno premešali in centrifugirali ter njeno vsebino denaturirali:

- 5 minut, 75 °C,
- 5 minut, na ledu,
- 30 minut, 37 °C.

12 µL (15 µL) denaturirane mešanice smo nanesli na označeno področje, pokrili s krovnim steklom in robove zalili z gumijastim cementom. Steklo smo inkubirali v črni in vlažni komori pri 37 °C 16 ur (27).

3.3.5.1.2 Kodenaturacija

Pri postopku kodenaturacije ni potrebna predhodna ločena denaturacija preparata in sonde. Hibridizacijsko mešanico smo pripravili po enakem postopku kot pri ločeni denaturaciji, jo nanesli na označeno območje, pokrili s krovnim steklom in zalili robove z gumijastim cementom. Preparate smo položili v hibridizator in izbrali ustrezen program:

- denaturacija 5 minut pri 75 °C in hibridizacija 16 ur pri 37 °C (27).

3.3.5.2 Spiranje po hibridizaciji

Po končani hibridizaciji smo odstranili gumijasti cement in krovno steklo. Stekla smo najprej inkubirali 2 minuti v raztopini 0,4×SSC pri 72 °C, potem pa 30 s na sobni temperaturi v raztopini 2×SSC / 0,05% Tween 20.

Steklo smo odcedili na staničevini in nanесли 10 µL DAPI in pokrili s krovnim steklom. Preparate smo pred analizo shranili v črni škatli vsaj 20 minut na –20 °C (27).

3.3.6 SPEKTRALNA KARIOTIPIZACIJA

Nanose celic na objektna stekla smo pred obdelavo natančno pregledali pod invertnim mikroskopom. Za uspešno analizo le-ti namreč ne smejo imeti preveč citoplazme okrog metafaz, kromosomi pa se ne smejo prekrivati. Gostota celic ne sme biti prevelika. Področje z najbolj primernimi metafazami smo označili z diamantnim rezilom (28).

Postopek predobdelave stekel smo prilagodili rutinskim postopkom v laboratoriju, tako da je enak kot pri predobdelavi stekel za FISH preiskavo.

3.3.6.1 Denaturacija vzorca

Posušena stekla smo 60–90 sekund inkubirali v denaturacijski raztopini formamida segreti na 72 °C (+/–2 °C). Večinoma smo se držali spodnje meje 60 sekund (28).

Stekla smo zatem dehidrirali v seriji etanolov:

- hladen 70% EtOH, 2 minuti,
- 80% EtOH, 2 minuti,
- 100% EtOH, 2 minuti.

3.3.6.2 Denaturacija sond SKY in hibridizacija

Vsebino reagenta za SKY (reagent SKY, ASI) smo premešali in centrifugirali. Pred uporabo smo ga premešali tudi s pipeto in ga 10 µL odpipetirali v črno mikrocentrifugirko. Vsebino smo nato denaturirali:

- 7 minut, 80 °C,
- 10 minut, 37 °C.

10 µL denaturiranega reagenta SKY smo nanесли na označeno področje stekla z denaturiranim vzorcem. Pokrili smo s krovnim steklom in zatesnili robove z gumijastim cementom. Preparate smo prenesli v vlažno in temno komoro ter jih inkubirali 24–72 ur pri 37 °C (28).

3.3.6.3 Spiranje po hibridizaciji

Po hibridizaciji smo odstranili krovna stekla in gumijasti cement ter inkubirali stekla najprej za 3–5 minut v raztopini 0,4×SSC pri 72 °C (+/–2 °C), potem pa še za 1 minuto v raztopini 4×SSC/0,1% Tween 20 pri sobni temperaturi (28).

Preparate smo odcedili na staničevini in nadaljevali z nanosi predhodno pripravljenih raztopin barvnih reagentov Cy5 in Cy5.5:

- Nanesli smo 80 µL raztopine Cy5, pokrili s krovnim steklom in inkubirali 40 min v temni komori na 37 °C.
- Spirali smo v treh zaporednih raztopinah 4×SSC/0,1% Tween 20 pri 45 °C, po 2 minuti v vsaki.
- Nanesli smo 80 µL raztopine Cy5.5, pokrili s krovnim steklom in inkubirali 40 min v temni komori na 37 °C.
- Ponovno smo spirali v drugi seriji raztopin 4×SSC/0,1% Tween 20 pri 45 °C, po 2 minuti v vsaki.

Preparate smo odcedili in nanesli 20 µL DAPI Antifade reagenta (ASI) ter pokrili s krovnim steklom. Preparate smo pred analizo za vsaj 15 minut shranili v črno komoro na –20 °C (28).

3.3.6.4 SKY na predhodno GTG proganih metafazah

SKY smo uporabili tudi na predhodno proganih preparatih. Preurejeni metafazi smo določili koordinate na objektnem steklu in glede na to izbrali področje. Pred predobdelavo preparatov smo s površine preparata odstranili imerzijsko olje:

- Ultraclear 20 minut (*postopek ponavljamo dokler površina za nanos ni čista).

Stekla smo posušili, razbarvali in spirali:

- metanol, 2 minuti,
- metanol: očetna kislina = 3:1 (za nekaj sekund smo potopili steklo v raztopino),
- 2×SSC, 2 minuti,
- 2×SSC, 2 minuti.

Stekla smo nato dehidrirali v seriji etanolov in nadaljevali po enakem postopku kot pri neproganih preparatih (28).

3.3.7 GTG PROGANJE

Metafazne nanose smo po staranju na vroči plošči inkubirali v naslednjih raztopinah:

- tripsin, 5 sekund,
- 1×PBS, nekaj sekund,
- raztopina Giemse in fosfatnega pufra, 14 minut.

Nato smo stekla spirali pod tekočo vodo in jih posušili na staničevini. Na začetku smo naredili poskusno proganje, da smo določili čas inkubacije v tripsinu.

3.3.8 MIKROSKOPSKA ANALIZA

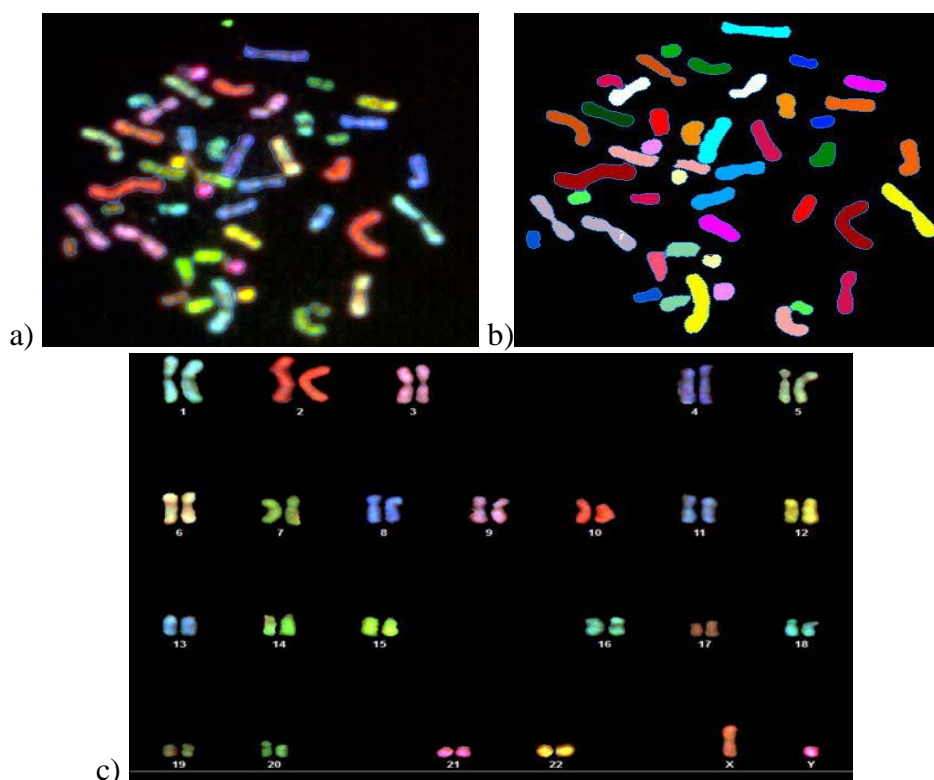
S pomočjo fluorescenčnega mikroskopa smo ocenjevali vzorec in število signalov, upoštevajoč pričakovani vzorec signalov glede na zgradbo sonde. Vsak abnormalni vzorec signalov nam je posredoval nove podatke, potrebne za nadaljnje postopanje in odločanje o izvedbi naslednjega koraka oziroma izbiri naslednje sonde, potrebne za razrešitev določene preureditve. Pri močnem ozadju smo preparat ponovno spirali.

SKY slike smo zajemali in analizirali s programskim sistemom ASI SKY.

4 REZULTATI

4.1 UVEDBA SKY

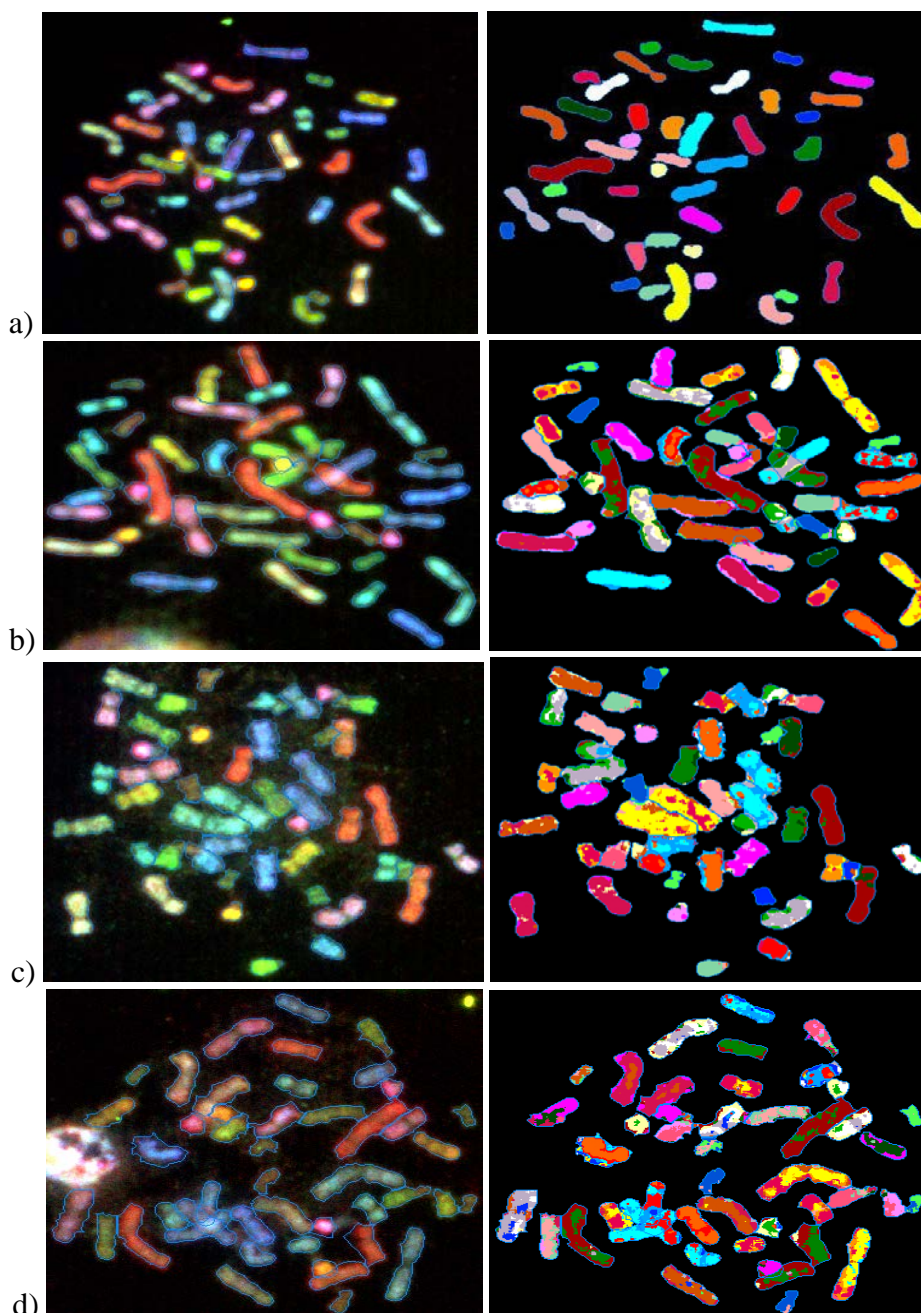
Za postavitev metode SKY smo uporabili vzorec *preiskovanca 2*, saj pri njem rutinska analiza ni pokazala nobenih kromosomskih preureditev, diagnostični postopek pa je izključil morebitne novotvorbe. Preiskovanec je bil moškega spola z normalnim kariotipom 46,XY (slika 4). Po prvotnem testiranju SKY po navodilih proizvajalca smo pri analizi preparata ugotovili, da so celice razpadle. Po pregledu protokola smo se odločili ponovno izvesti analizo pod strogim nadzorom vseh možnih spremenljivk, ki lahko vplivajo na končni rezultat. Preverjali smo ustreznost temperature vodne kopeli, pH vrednost in koncentracijo denaturacijske raztopine formamida ter čas inkubacije stekla v formamidu. Kljub nadzoru vseh dejavnikov so celice tudi pri tej analizi propadle in se jih ni dalo analizirati. Pri tretjem poskusu smo skušali optimizirati čas hibridizacije in čas inkubacije stekla v raztopini pepsina kot možna vplivajoča dejavnika. Celice so ponovno razpadle, nekaj metafaz je sicer ostalo, vendar so bile neuporabne. Pred četrtem poskusom smo ponovno pregledali protokol in se odločili vključiti formaldehid v postopek predobdelave stekla. Tokrat smo uspeli pridobiti ohranjene metafaze in jih tudi uspešno analizirati. Ustreznost tako prilagojenega protokola se je potrdila tudi v naslednjih analizah.



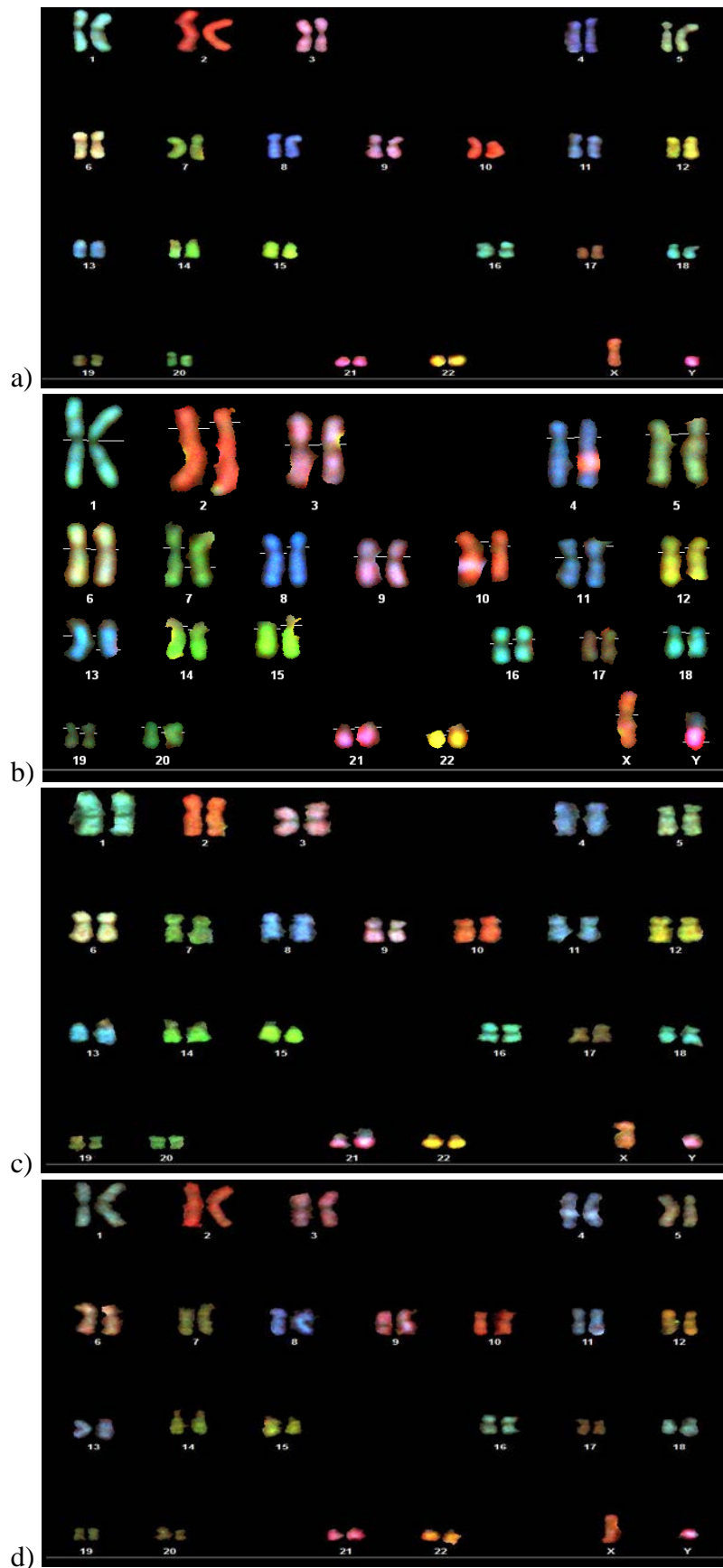
Slika 4: Rezultat SKY pri normalnem moškem: a) v RGB pogledu; b) v pseudo barvah; c) SKY kariogram

4.1.1 VPLIV BLEDENJA NA KAKOVOST PRIDOBLENJENIH SLIK

Ker imamo v citogenetiki raka pogosto opraviti z različnimi kloni, moramo v analizo praviloma zajeti več metafaz. Vsako zajemanje slike traja vsaj 1 minuto, medtem pa je preparat izpostavljen močni svetlobi, ki povzroča bledenje fluorescenčnih označevalcev. Zanimalo nas je, koliko kakovostnih zaporednih slik na istem področju lahko pridobimo. Zaporedno smo slikali 4 različne metafaze z namenom preučevanja vpliva svetlobe na kakovost preparata in posledično kakovost pridobljenih slik. Metafaze smo predstavili v obeh možnih pogledih (*slika 5*), v RGB in psevdo barvah, ter jih uredili v kariotip (*slika 6*).



Slika 5: Zaporedno slikanje metafaz v psevdo barvah (desne slike) in RGB pogledu (leve slike): a) prva; b) druga; c) tretja, d) četrta slikana metafaza



Slika 6: Zaporedno slikanje metafaz: SKY kariogrami: a) prve; b) druge; c) tretje; d) četrte slikane metafaze

4.1.2 VPLIV BLEDENJA NA SESTAVO BARV KROMOSOMOV

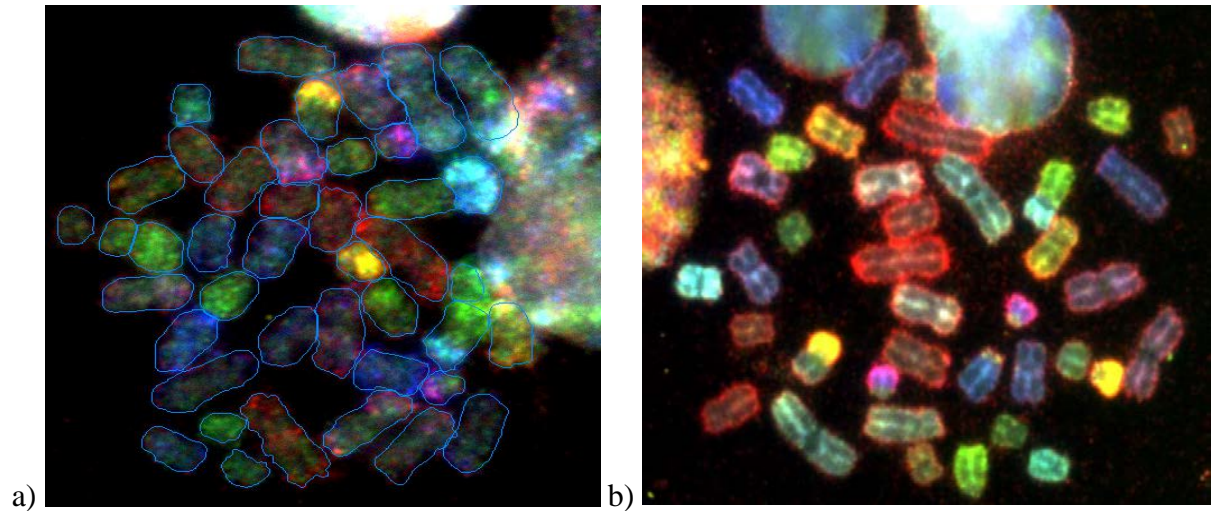
Vpliv bledenja smo ovrednotili tudi s spreminjanjem sestave barv posameznega kromosoma. Barvo vsakega kromosoma določa specifična kombinacija 5 barv (A, B, C, D, E), ki so zastopane v točno določenih razmerjih. Z vsakim nadaljnjim slikanjem so se ta razmerja barv spreminjala in s tem tudi končna barva kromosoma. Med sabo smo primerjali tri zaporedno slikane metafaze (*tabela 2*).

Tabela 2: Delež posameznih barv pri določenem kromosomu pri treh zaporednih slikanjih

Kro- mosom	Predposta- vljena kombinacija barv (A,B,C,D,E)	Koncentracije posameznih barv (v %)														
		A			B			C			D			E		
		Zaporedno slikanje			Zaporedno slikanje			Zaporedno slikanje			Zaporedno slikanje			Zaporedno slikanje		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	*BCD*	13	14	14	25	24	19	22	21	19	36	38	25	8	8	15
2	***E	6	7	13	4	2	9	26	26	26	8	10	16	56	55	37
3	A*CDE	20	20	18	4	4	9	22	23	19	31	31	26	27	26	28
4	**CD*	12	11	14	3	2	7	26	26	40	55	56	40	7	6	13
5	AB*DE	25	25	19	16	14	26	13	15	12	24	25	21	23	20	22
6	*BCDE	12	13	10	22	20	31	22	21	16	21	22	19	24	24	24
7	*BC**	16	16	16	28	34	27	30	23	28	10	11	16	14	15	14
8	***D*	13	15	15	5	5	5	10	13	15	67	62	49	9	11	17
9	A**DE	19	17	17	3	0	6	15	19	15	33	27	31	33	36	31
10	**C*E	8	7	12	3	3	7	7	37	28	6	5	14	47	49	37
11	A*CD**	21	22	19	1	2	6	18	18	24	53	45	37	9	11	16
12	*B**E	13	13	13	35	33	38	21	21	15	6	7	12	25	26	22
13	A**D*	22	22	18	3	4	19	10	11	12	56	54	36	9	8	14
14	**B**	17	18	15	49	47	41	12	12	18	14	14	11	8	9	15
15	ABC**	23	23	20	41	44	32	25	23	27	4	3	10	8	7	11
16	*BCD*	15	17	14	25	31	27	12	11	18	38	34	26	5	7	15
17	**C**	11	12	14	2	6	9	53	43	42	15	17	19	8	22	17
18	AB*D*	24	24	16	22	24	31	6	6	11	45	42	28	3	3	13
19	A*C**	24	26	26	5	10	16	36	30	21	16	15	21	19	19	17
20	A****	42	40	20	4	4	14	14	17	27	20	17	19	19	20	21
21	***DE	9	10	11	3	2	11	18	22	15	31	30	31	39	36	32
22	ABC*DE	19	21	18	22	21	21	25	26	25	4	3	10	32	30	27
X	A***E	19	17	20	2	2	7	20	25	21	8	7	16	50	49	36

4.1.3 VPLIV STARANJA PREPARATOV NA IZVEDBO SKY

Pri *preiskovancu 4* smo ugotavljali vpliv predhodnega sušenja preparatov pred izvedbo SKY analize. V protokolu proizvajalca predhodno sušenje ozrioma staranje preparatov ni predpisano (28). Med sabo smo primerjali dva preparata, en predhodno ni bil staran, drugega pa smo starali na vroči plošči najprej pri pol ure pri 60 °C, nato pa še pol ure pri 90 °C.

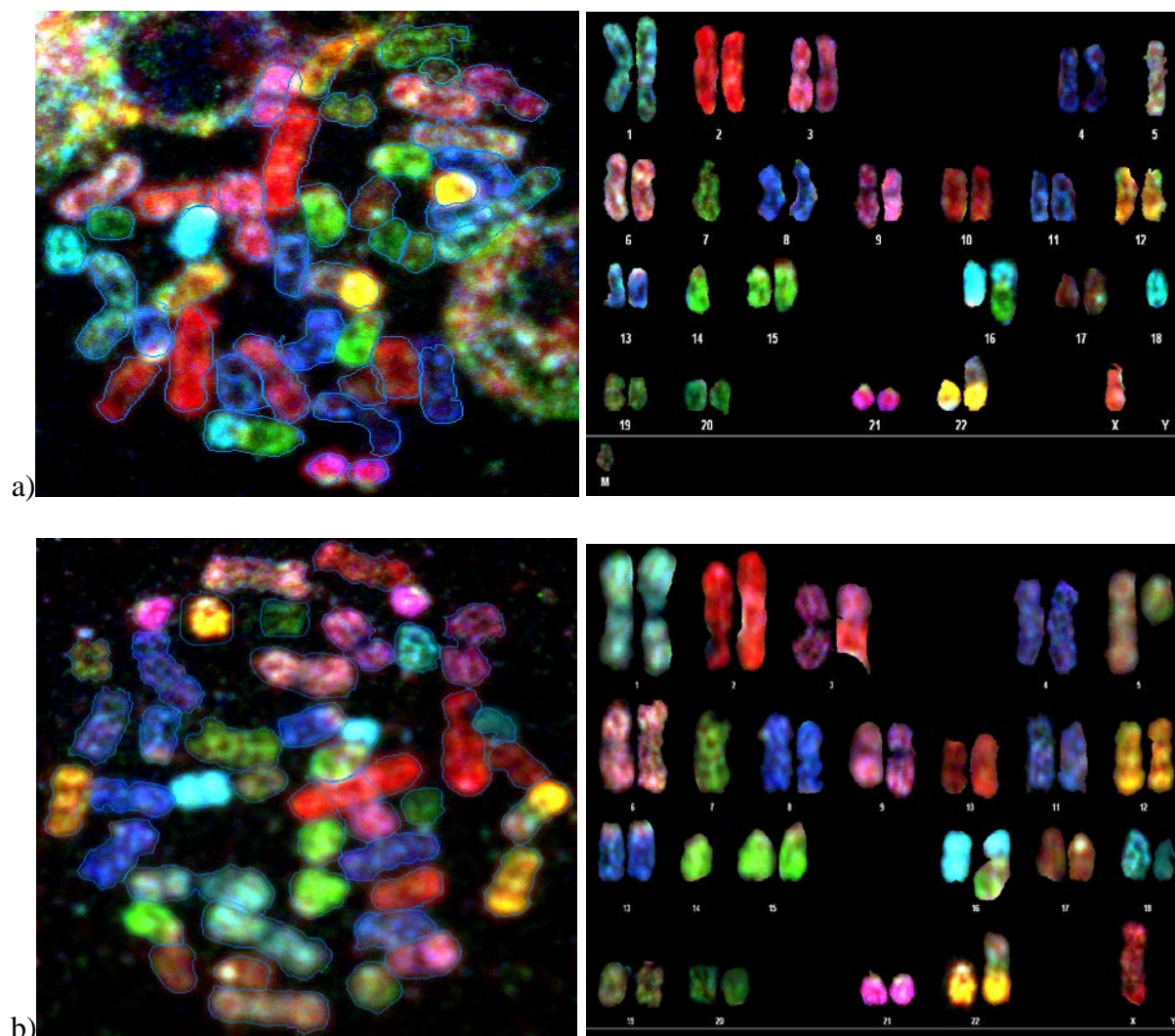


Slika 7: Vpliv staranja preparatov na intenziteto obarvanja kromosomov: a) brez predhodnega sušenja; b) s predhodnim sušenjem

Preparat brez sušenja (*slika 7a*) je bolj nejasen in ima slabšo ostrino v primerjavi s preparatom, ki smo ga sušili (*slika 7b*). Kromosomi nimajo ostrih robov in niso jasno ločljivi od ozadja.

4.1.4 SKY NA PREDHODNO PROGANIH METAFAZAH

SKY smo izvedli na dveh različnih preparatih, in sicer na sveže pripravljenem preparatu in predhodno GTG proganem preparatu.

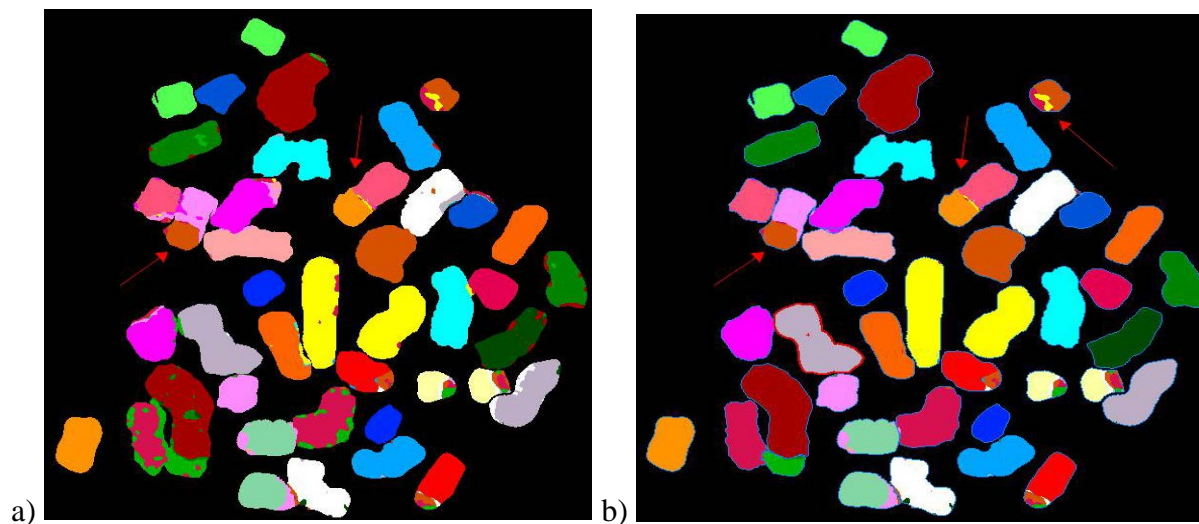


Slika 8: Vpliv predhodnega proganja na izvedbo SKY: a) predhodno GTG progana metafaza; b) sveže nanešena metafaza

Predhodno GTG progana metafaza ima v primerjavi s svežim nanosom nekoliko slabšo ostrino in resolucijo (*slika 8a*). Poleg tega smo opazili tudi večji signal ozadja kot pri svežem preparatu (*slika 8b*). Kljub vsemu pa je končni rezultat bil dovolj dober, da SKY lahko izvajamo tudi po predhodnem proganju kromosomov.

4.2 ANALIZA ZAJETIH SLIK

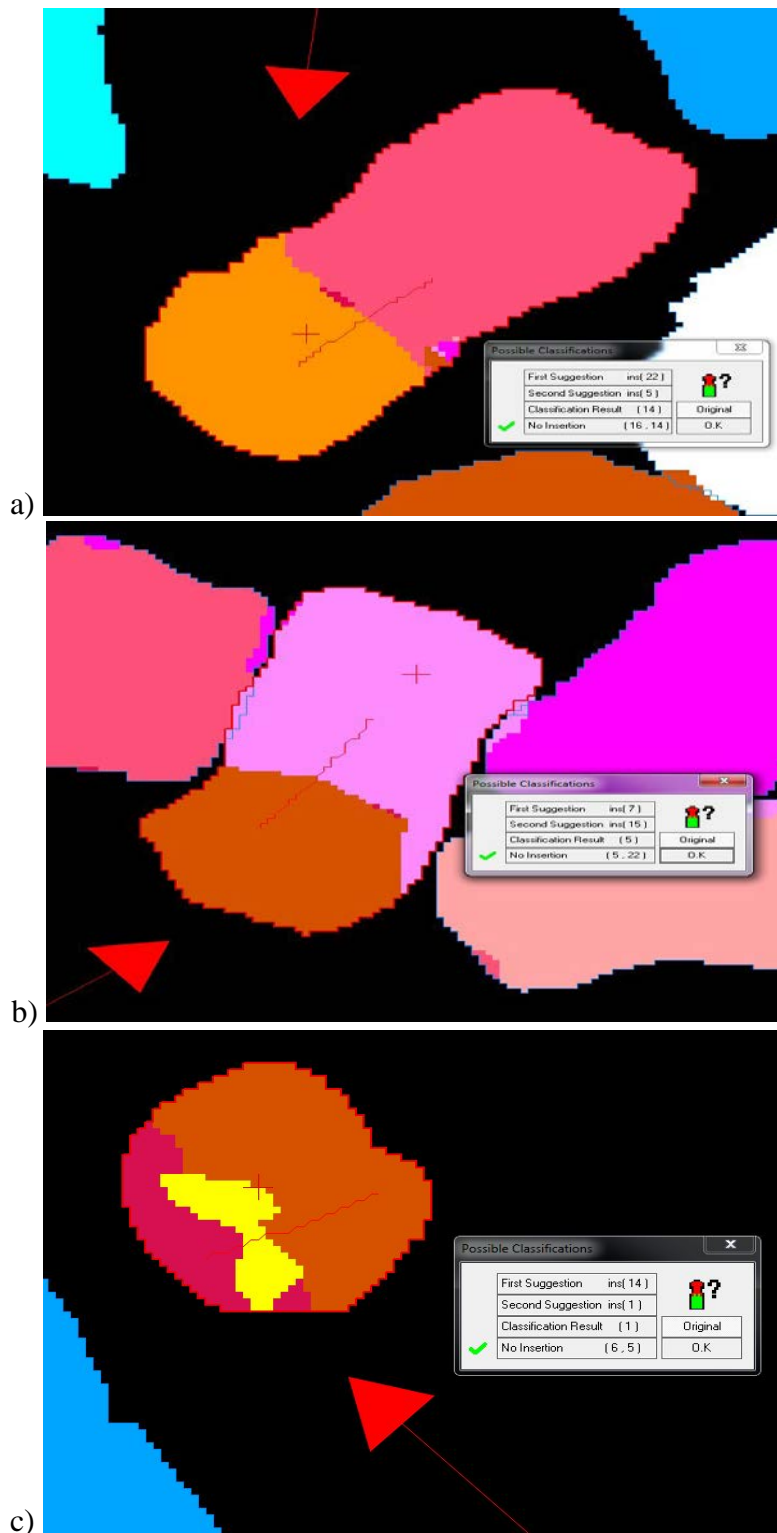
SKY slike lahko predstavimo v treh pogledih: RGB slika, klasificirana slika (psevdo barve) in kariogram (*slika 4*). S klasificiranim pogledom si pomagamo pri razreševanju translokacij, saj program omogoča prepoznavanje nepravilnosti, ki niso posledica kromosomskih premestitev, pač pa prekrivanja barv.



Slika 9: Postopno “popravljanje” slike SKY: a) neobdelana slika; b) v celoti popravljena slika. Puščice označujejo preurejene kromosome

Programska oprema omogoči razločevanje kromosomskih nepravilnosti, ki niso posledica preureditev od pravih preureditev. Na *sliki 9* je prikazano postopno popravljanje slike, kjer smo *sliko 9a* obdelali tako, da smo poenotili barve po celotni dolžini ustreznega kromosoma. Na dokončno popravljeni sliki (*slika 9b*) so jasno vidna področja dejanskih translokacij in prisotnega markerskega kromosoma (puščica desno zgoraj). Satelitna področja akrocentričnih kromosomov so vedno v drugačnih barvah, zato jih nismo popravljali.

Hkrati SKY program tudi samodejno sporoči, ali določena sprememba barve po njegovih algoritmih ustreza translokaciji in hkrati predlaga možne translokacije.



Slika 10: Pogramska opredelitev translokacij pri SKY: a) t(14;16); b) t(5;22); c) markerski kromosom

Slika 10 prikazuje kako program za SKY prepoznava možne translokacije. Na sliki 10a je vidna translokacija, opredeljena kot t(14;16), na sliki 10b pa translokacija t(5;22). Slika 10c prikazuje markerski kromosom. Sistem ga je prepoznal kot nastalega iz kromosomov 5 (oranžna), 1 (rumena) in 6 (roza).

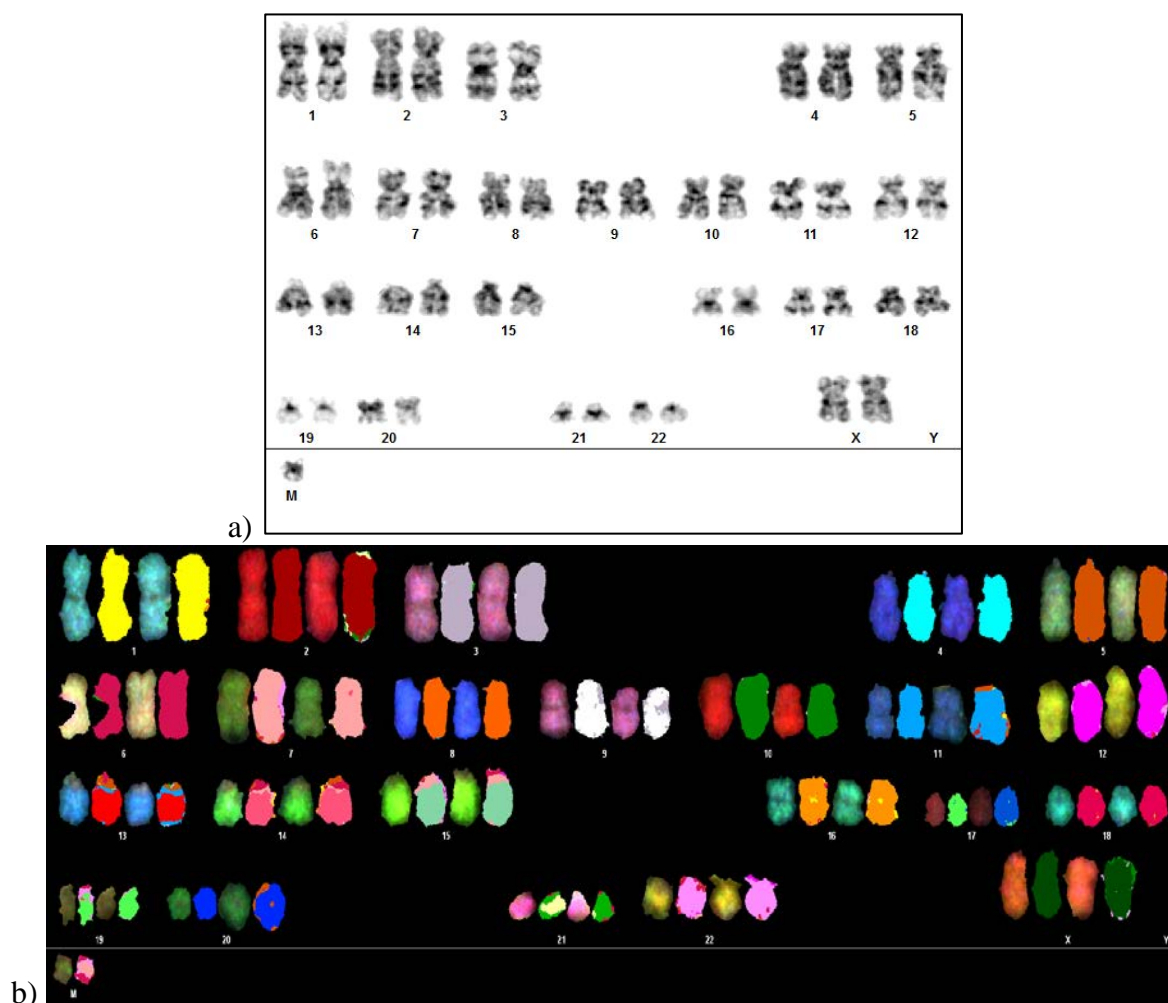
4.3 RAZREŠEVANJE KROMOSOMSKIH PREUREDITEV

4.3.1 OPREDELITEV MARKERSKIH KROMOSOMOV IN KOMPLEKSNIH PREUREDITEV

Pri dveh preiskovancih smo se osredotočili na razreševanje izvora markerskega kromosoma. Prvi preiskovanec (št. 1, ženskega spola, akutna mieloična levkemija) je imel v kariotipu markerski kromosom kot edino spremembo. Drugi preiskovanec (št. 4, moškega spola, mielodisplastični sindrom) je imel markerski kromosom v kompleksno preurejenem kariotipu.

4.3.1.1 Markerski kromosom kot edina preureditev

Pri *preiskovancu 1* smo najprej izvedli proganje GTG. Kariotip levkemičnega klona smo opredelili kot 47,XX,+mar (slika 11).



Slika 11: Kariotip z markerskim kromosomom kot edino spremembo: a) GTG progani kromosomi; b) SKY kariogram v RGB pogledu in psevdobarvah

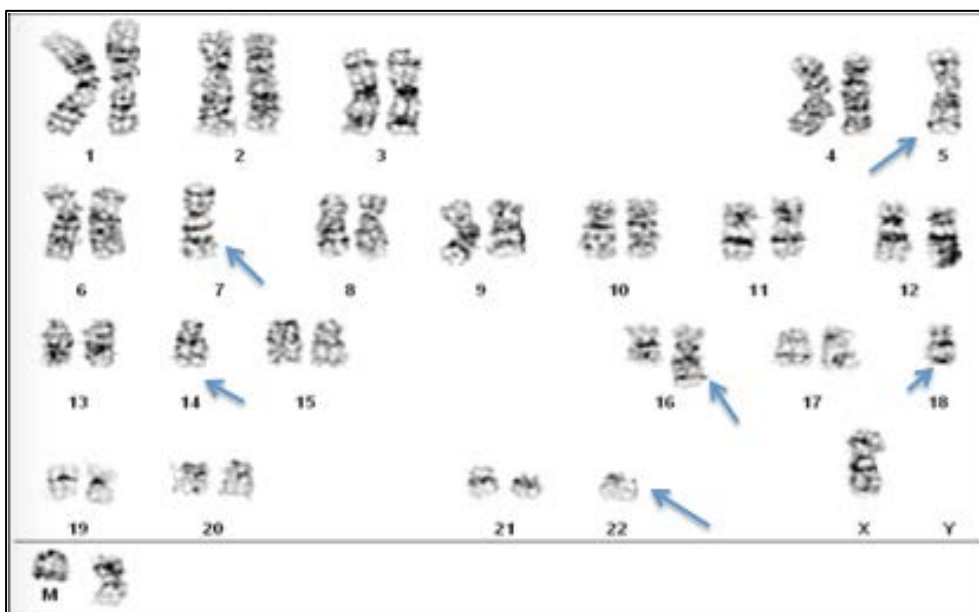
Rezultate SKY analize prikazuje *slika 11b*. Markerski kromosom je obarvan zeleno. Glede na psevdo barve, bi ga lahko uvrstili h kromosomu 22 oziroma 18, glede na RGB pa k 16, 19 ali 20, morda tudi 7, na nekaterih metafazah pa tudi 17.

a) Razreševanje markerskega kromosoma z uporabo sond za obarvanje celotnih kromosomov

Da bi ugotovili izvor markerskega kromosoma, smo uporabili sonde za obarvanje celotnih kromosomov. Nanesli smo sonde WCP za kromosome 7, 16, 17, 18, 19, 20 in 22, kot jih je "prepoznala" SKY. Nobena od uporabljenih sond ni obarvala markerskega kromosoma.

4.3.1.2 Markerski kromosom v kompleksnem kariotipu

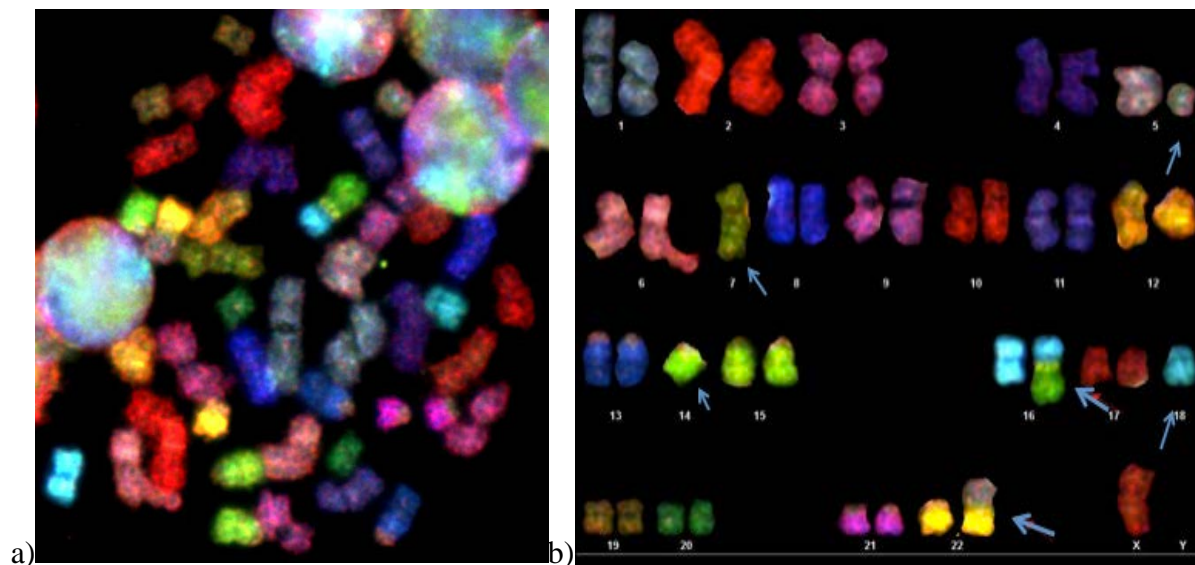
Pri *preiskovancu 4* smo najprej izvedli proganje GTG, ki je pokazalo kompleksno preurejen kariotip.



Slika 12: Kariotip kompleksno preurejenega levkemičnega klona z markerskima kromosomoma

Proganje GTG (*slika 12*) je pokazalo dodatni material na kromosomu 16, monosomijo kromosomov 5, 7, 14, in 22 ter odsotnost kromosoma Y. Na večini metafaz je manjkal tudi kromosom 18. Prisotna sta dva markerska kromosoma.

S FISH preiskavo smo ugotovili, da ne manjka celotni kromosom 5, pač pa gre za del(5q). Tako smo sklepali, da dodatni material na kromosomu 22 ustreza kromosomu 5p, dodatni material na kromosomu 16 pa je premeščen s kromosoma 14. Preostali je neopredeljeni marker. Kariotip smo v skladu z veljavno nomenklaturu izpisali kot: 43,X,-Y,der(5;22)(p10;q10),-14,der(16)t(14;16)(q11;q13),-18,+mar.



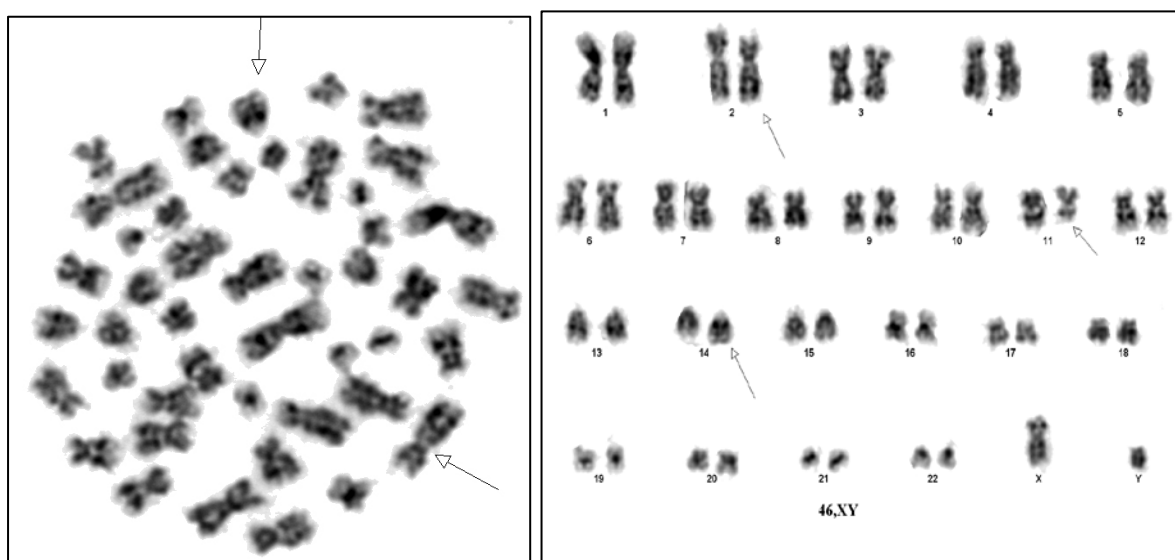
Slika 13: SKY metafaza in kariogram kompleksno preurejenega klona

Nato smo izvedli SKY, da bi preverili preureditve. Potrdili smo predhodno znane preureditve, torej monosomiji 7 in 18. Vidna je odsotnost kromosoma Y. Na *sliki 13* je viden dodaten material na kromosomih 16 in 22. Potrdilo se je, da dodatni material na kromosomu 16 izvira iz kromosoma 14 in da je na kromosomu 22 material kromosoma 5. Markerski kromosom pa na osnovi SKY najbolj ustreza kromosomu 5.

4.3.2 DOLOČANJE PRELOMNIH MEST IN VPLETENIH GENOV

Pri preiskovancih 3 in 5 smo z različnimi pristopi poskušali natančno opredeliti prelomno mesto in partnerske gene. **Preiskovanec 3** s KLL je imel na vseh analiziranih metafazah, ob ponavljajoči napovedno neugodni deleciji del(11)(q23), še translokacijo t(2;14)(p23;q32), ki doslej ni bila opisana in posledično ni bil znan partnerski gen genu *IGH* na 14q32. V nekaterih klonih so bile prisotne še dodatne preureditve, tako da je šlo tudi za kompleksno preurejen kariotip. Zaradi pomena preureditev gena *IGH* pri KLL smo se najprej osredotočili na iskanje prelomnega mesta na kromosomu 2 ter partnerskega gena pri preureditvi tega gena.

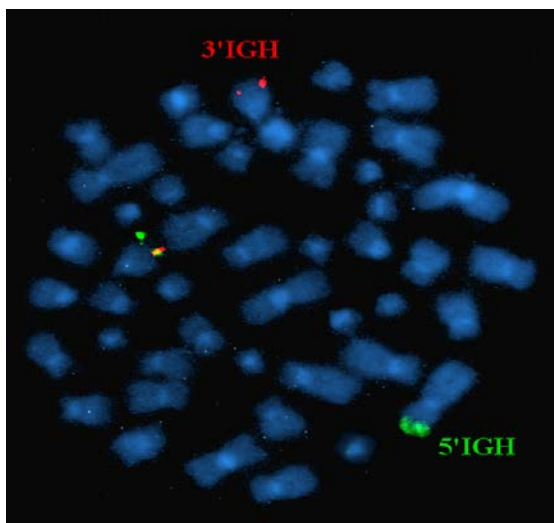
Pričeli smo z osnovnim proganjem GTG.



Slika 14: Mitoza in kariogram izvornega klona: 46,XY,t(2;14)(p23;q32),del(11)(q23)

Slika 14 prikazuje preureditve kromosomov 2 in 14 ter kromosoma 11, ki sta bili prisotni pri vseh analiziranih metafazah.

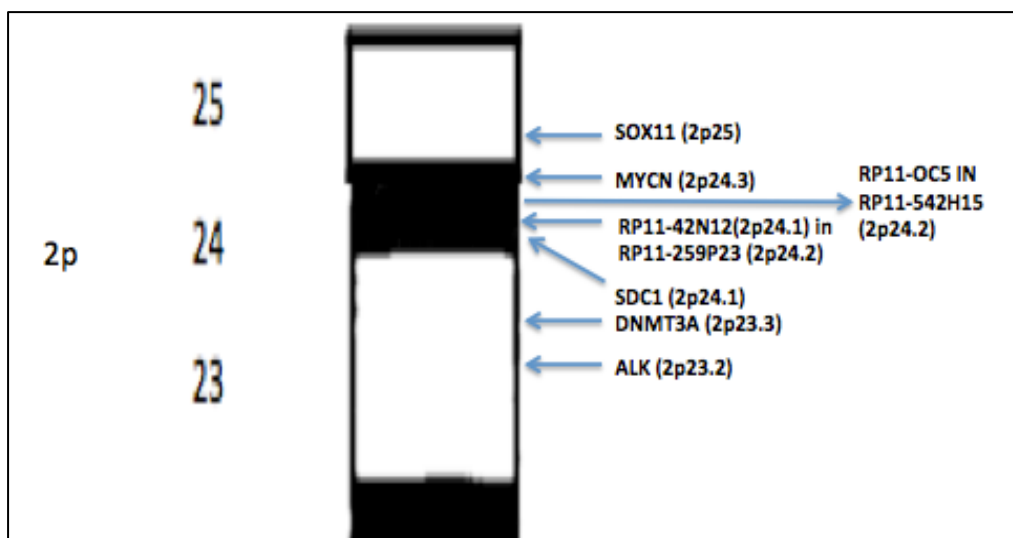
Nadaljevali smo s FISH preiskavo s sondo, specifično za preureditev gena *IGH*. Uporabili smo razcepno DNA-sondo za ta gen.



Slika 15: FISH z DNA-sondo LSI *IGH* (Vysis)

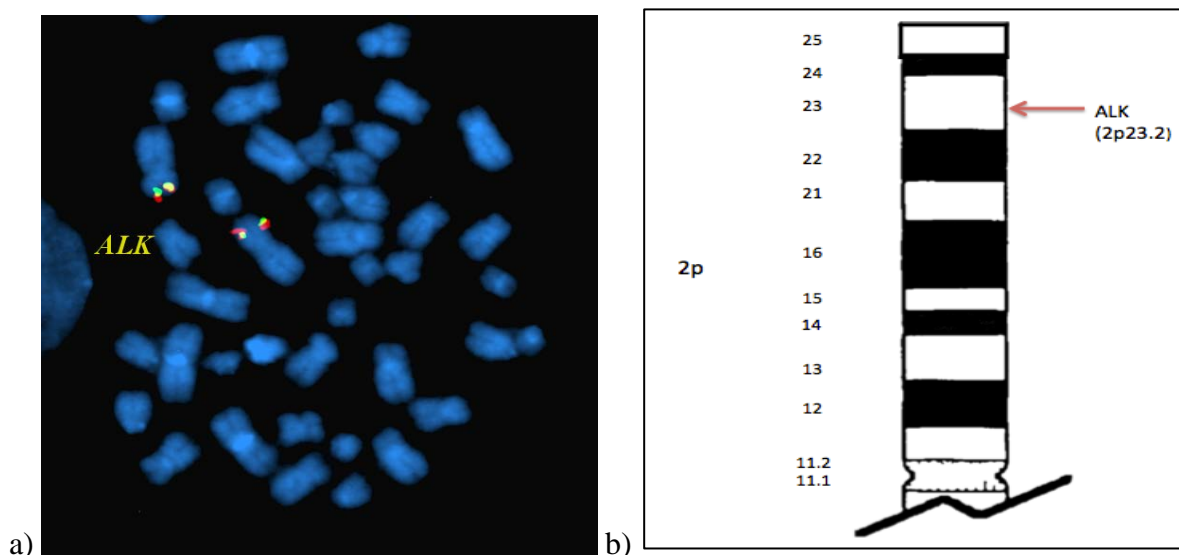
Slika 15 prikazuje metafazo, kjer je vidno, da je 5' *IGH* na kratkem kraku kromosoma 2 (2p), 3' *IGH* pa ostaja na izvornem mestu 14q32 na kromosomu 14 (14q32).

Možne tarčne onkogene smo izbrali glede na njihovo pojavnost pri določeni krvni novotvorbi in verjetnost vpletenosti pri preureditvi. Osredotočili smo se na področje na kromosomu 2, v katerem smo na osnovi proganja GTG določili mesto preloma. Zatem smo izbrali onkogen telomerno, da bi določili, ali je dejansko premeščen na kromosom 14. Tako smo določili osnovni okvir, katerega smo postopoma krčili. Najprej smo analizirali verjetnejše kandidatne gene, ki so že znani kot onkogeni, nato pa še gene oziroma področja, ki doslej v literaturi še niso bila opisana (*slika 16*).



Slika 16: Analizirani (onko)geni pri preiskovancu 3

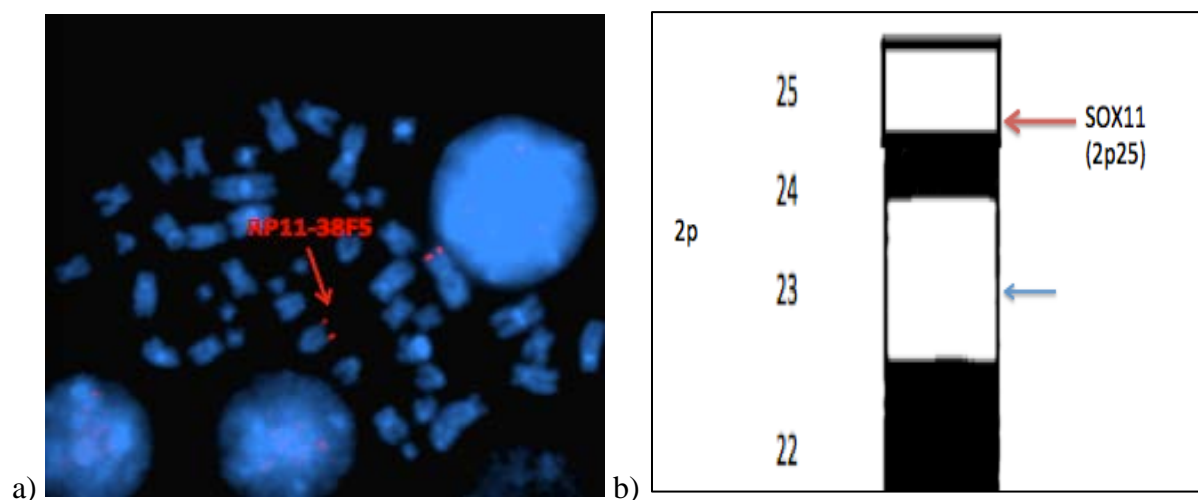
Kot možen vpleteni gen pri translokaciji smo najprej preverili gen *ALK*, ki se nahaja na mestu 2p23. Uporabili smo komercialno razcepno FISH DNA-sondo ON *ALK* (Kreatech).



Slika 17: a) FISH z DNA-sondo ON *ALK* (Kreatech); b) nahajališče testiranega onkogene *ALK* na kromosomu 2

Prisotna sta dva fuzijska signala, kar je normalen vzorec signalov na interfaznem jedru (slika 17). Gen *ALK* se nahaja na izvornem mestu kratkega kraka kromosoma 2, v njem tudi ni prišlo do preloma.

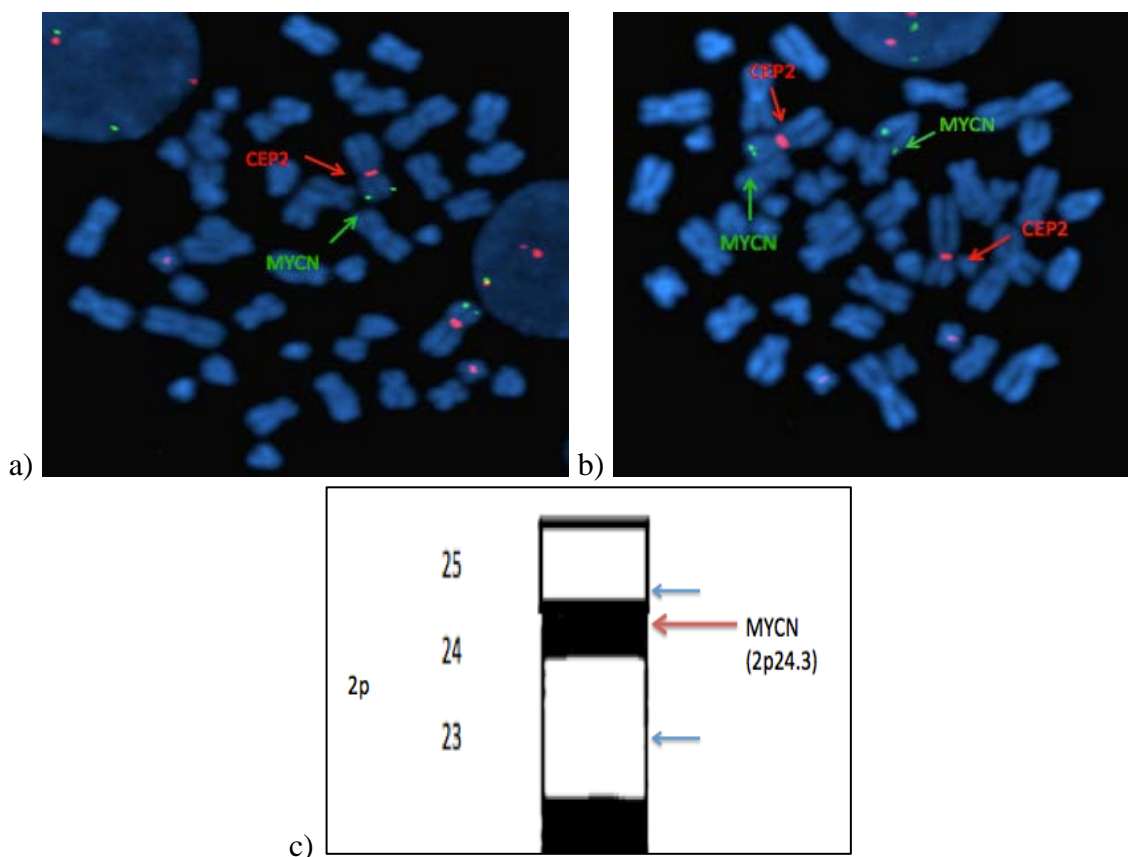
Nadaljevali smo s testiranjem onkogene *SOX11*. Nahaja se distalno glede na *ALK* na področju 2p25 (slika 16). Uporabili smo klon BlueFISH RP11-38F5, ki smo ga izbrali glede na položaj tarčnega gena *SOX11*. Za testiranje tega gena namreč komercialne sonde niso dostopne. Na interfaznih jedrih smo opazili en rdeč signal na kromosomu 2, drugega pa na kromosomu 14 (slika 18).



Slika 18: a) FISH z uporabo klona BlueFISH RP11-38F5; b) nahajališče trenutno *SOX11* (rdeča) in predhodno *ALK* (modra) analiziranega onkogenega na kromosomu 2

S tem smo določili okvir, od kod do kod se razprostira možna točka preloma. Spodnja meja je pri genu *ALK* (2p23.2), ki se še vedno nahaja na kromosomu 2, zgornjo mejo pa predstavlja gen *SOX11* (2p25), za katerega smo ugotovili, da je že translociran na kromosom 14.

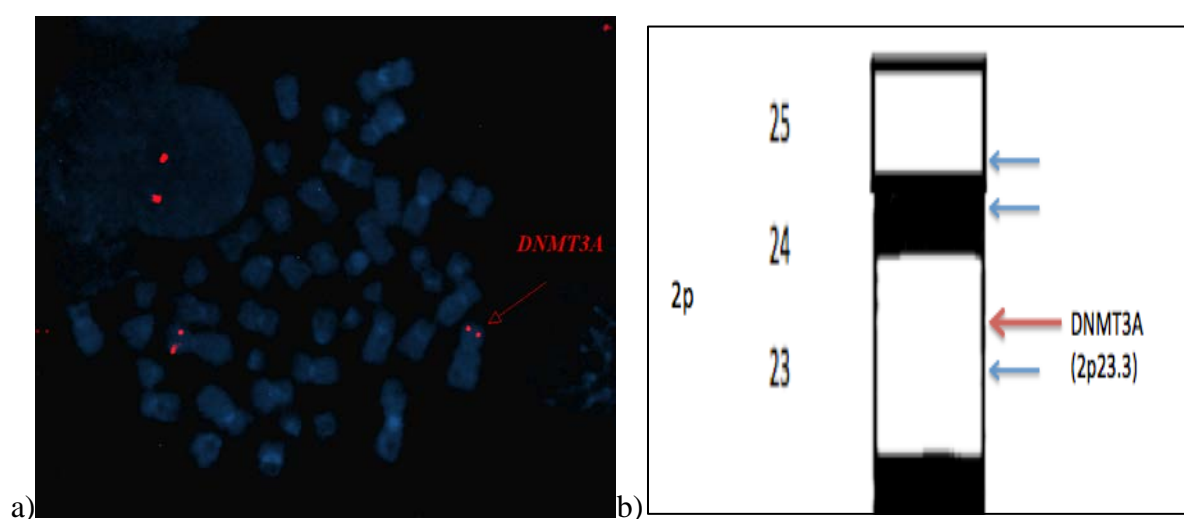
Začeli smo ožiti to področje, in sicer s testiranjem gena *MYCN*, ki se nahaja na področju 2p24.3, torej centromerno glede na gen *SOX11*.



Slika 19: FISH z DNA-sondo *MYCN/CEP2* (Vysis): a) normalna metafaza; b) preurejena metafaza; c) nahajališče onkogenega *MYCN*; z modro sta označeni mesti predhodno analiziranih tarčnih genov *ALK* in *SOX11* na kromosomu 2.

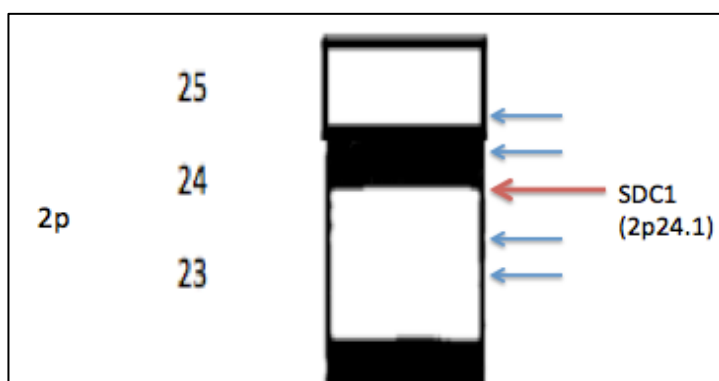
Slika 19 prikazuje rezultate FISH analize z uporabljenom sondo MYCN/CEP2 (Vysis). Zeleni signali označujejo gen *MYCN*, rdeči pa centromere kromosoma 2. Normalen rezultat sta dva zelena in dva rdeča signala (slika 19a). Kot prikazuje slika 19b, se gen *MYCN* pri bolniku premesti na kromosom 14. S to ugotovitvijo smo zožili področje možnega preloma na območje med genoma *ALK* in *MYCN*.

Naslednji onkogen izbora je bil *DNMT3A*. Testirali smo ga s klonom BlueFISH RP11-458N5, ki pokriva območje 2p23.3. Dobili smo dva rdeča signala, oba na kratkem kraku kromosoma 2, prelomno področje pa smo vnovič zožili na območje med genoma *ALK* in *DNMT3A* (slika 20).



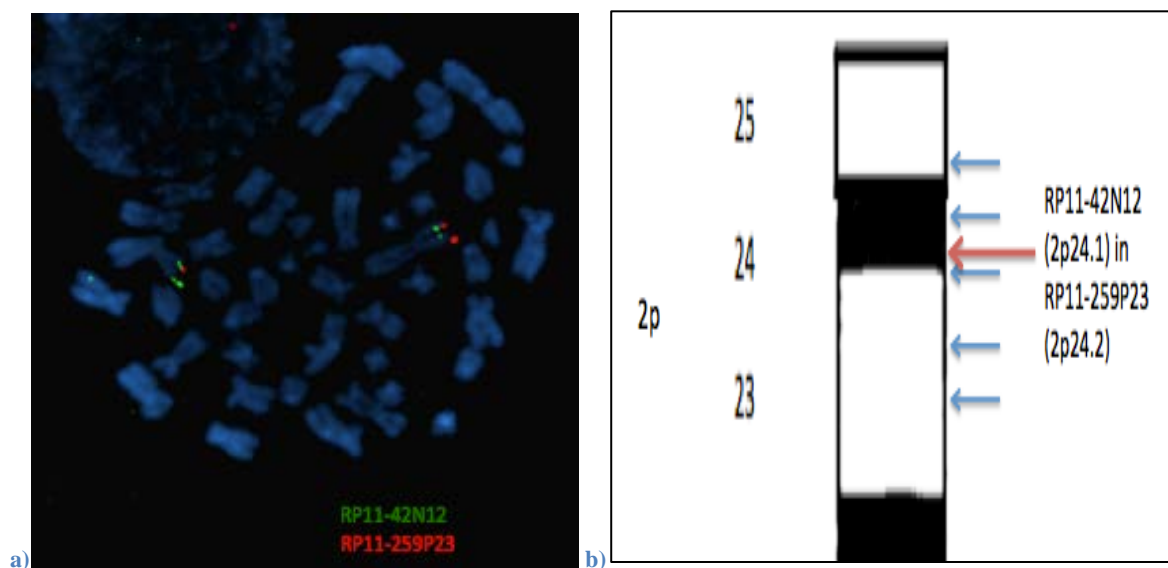
Slika 20: a) FISH z uporabo klona BlueFISH RP11-458N5; b) nahajališče predhodnih in trenutno analiziranega onkogenega *DNMT3A* na kromosomu 2

Sledilo je testiranje za gen *SDC1*, ki se nahaja na področju 2p24.1, telomerno nad predhodno analiziranim genom *DNMT3A*. Uporabili smo BlueFISH klon RP11-202B22. Prisotna sta bila dva oranžna signala na področju 2p, torej gen ni bil premeščen na kromosom 14 (slika 21).



Slika 21: Nahajališče predhodnih in trenutno analiziranega onkogenega *SDC1* na kromosomu 2

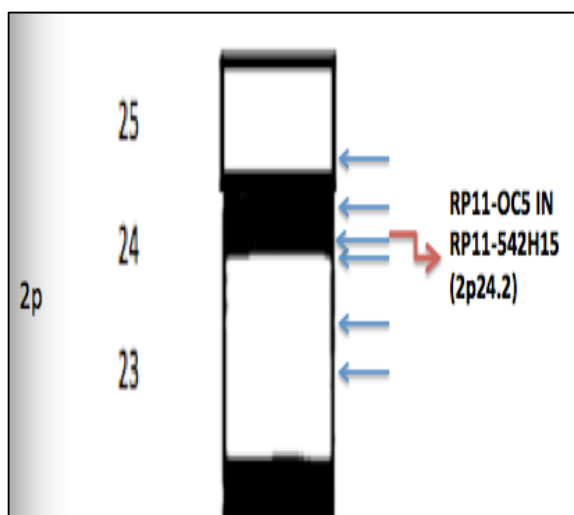
Nadaljevali smo z nanosi dveh BlueFISH klonov, ki pokrivata območje nad genom *SDC1*.



Slika 22: a) FISH z BlueFISH kloni RP11-42N12 in RP11-259P23; b) nahajališče predhodnih in trenutno analiziranih področij 2p24.1 in 2p.24.2

Nanesli smo klon RP11-42N12, obarvan zeleno, ki pokriva območje 2p24.1 in klon RP11-259P23, obarvan oranžno, ki pokriva območje 2p24.2 (slika 22). Dobili smo dva zelena signala in dva oranžna signala, oba na področju 2p.

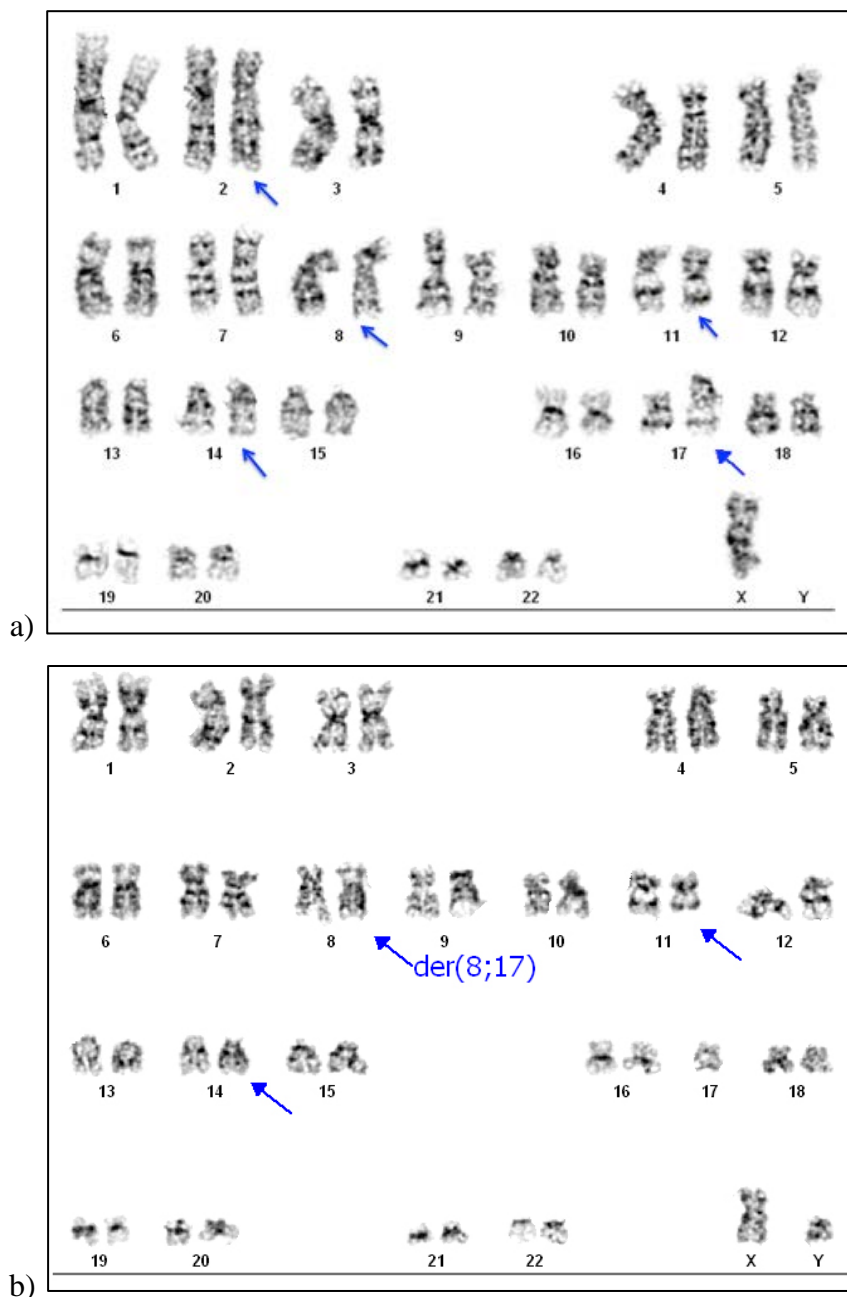
Nanesli smo še dva dodatna klona, RP11-37OC5 (oranžen) in RP11-542H15 (zelen), ki tudi pokrivata območje 2p24.2, vendar telomerno glede na prejšnja dva klona (slika 23). Oba klona sta znova ostala na kromosomu 2 in nista bila razcepljena. Ker v bazah podatkov nismo našli več potencialnih (onko)genov, smo zaključili s sklepom, da je prelom med geni in ne v njih samih, in sicer v področju 2p24.2.



Slika 23: Nahajališče predhodnih in trenutno analiziranega področja 2p24.2

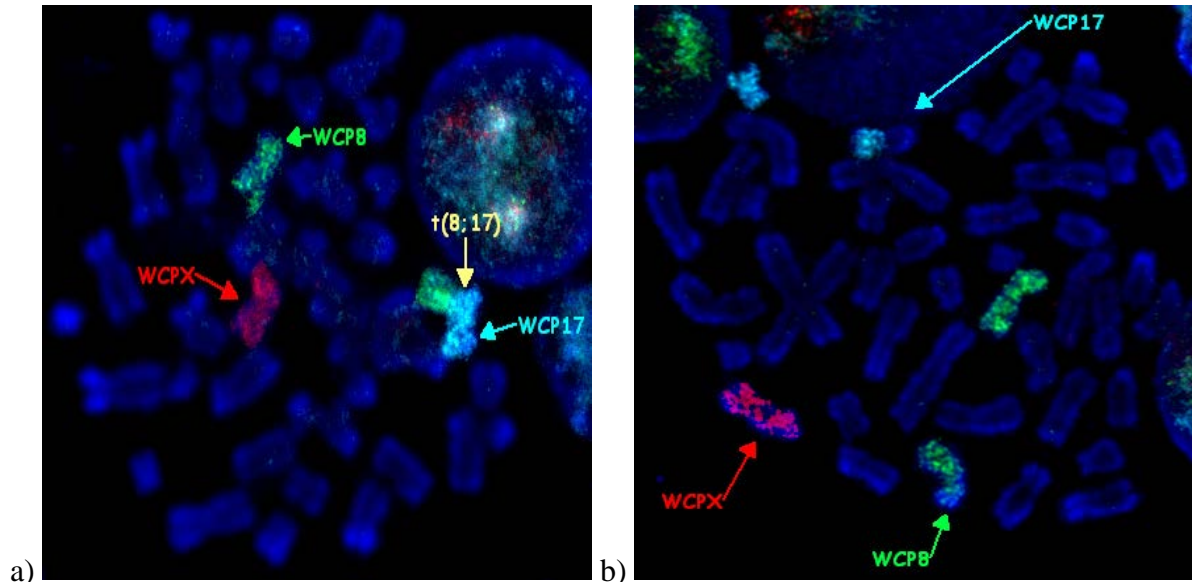
a) Razreševanje ostalih kromosomskih nepravilnosti z uporabo sond za obarvanje celotnih kromosomov

Na kariotipu *preiskovanca 3* smo ob že omenjenih del(11q) in translokaciji t(2;14), ki sta bili prisotni pri vseh pregledanih metafazah, na nekaterih ugotovili tudi nepravilnosti kromosomov 8 in 17 (slika 24). Ker nepravilnosti niso bile prisotne v vseh metafazah, smo poiskali samo preurejene in jih nadalje analizirali. Ker je šlo za dva kromosoma, smo se odločili za uporabo WCP sond.



Slika 24: Kariograma dveh različnih metafaz z različnima preureditvama kromosomov 8 in 17

Sledili so nanosi WCP sond za obarvanje celotnih kromosomov. Nanesli smo WCP 17 (modra), 8 (zelena) in X (rdeča). Slednjega smo izbrali, ker se je na nekaterih od preurejenih metafaz zdelo, da je v preureditev kromosoma 8 vpleten kromosom X.

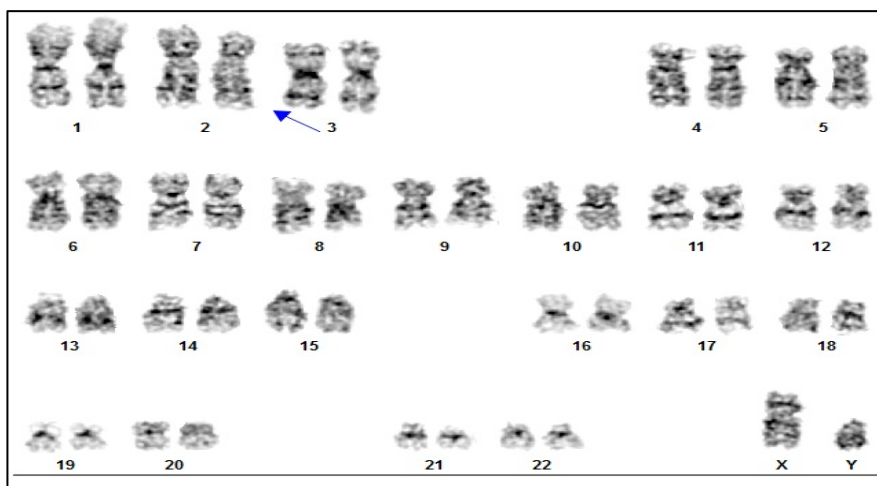


Slika 25: FISH z uporabo WCP sond (Kreatech). Dve različni preureditvi kromosomov 8 in 17: a) der(8;17)(q10;q10); b) derivativna kromosoma 8 in 17.

Opazili smo dva različna klona. Pri enem je viden derivativni kromosom, sestavljen iz dolgih krakov kromosomov 8 in 17 (*slika 25a*), pri drugem pa imata spremenjena kromosoma 8 in 17 neopredeljeni material na kratkih krakih (*slika 25b*). Kromosom X ni vpleten v preureditve.

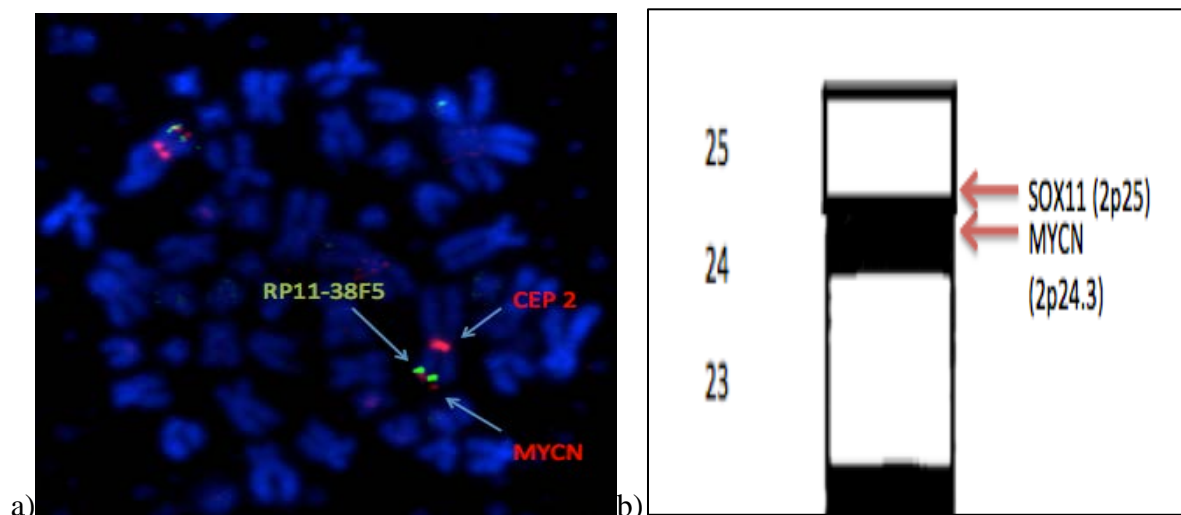
c) Razreševanje nepravilnosti z uporabo komercialno dostopnih FISH sond in klonov BlueFISH pri preiskovancu 5

Pri *preiskovancu 5* smo poskušali opredeliti preureditev na kratkem kraku kromosoma 2. Proganje GTG je namreč pokazalo, da je krak skrajšan, zaradi slabega proganja pa smo želeli dodatno potrditi, da gre za intersticijsko in ne terminalno delecijo (slika 26).



Slika 26: Kariogram levkemičnega klona s preureditvijo kromosoma 2

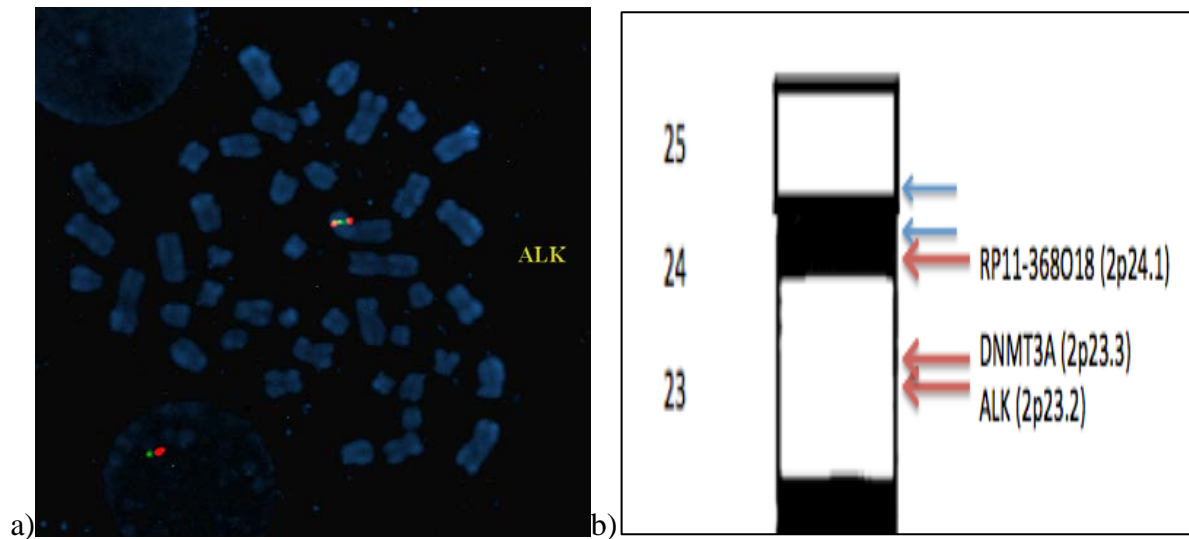
Najprej smo naredili FISH. Označili smo gen *MYCN*, in sicer z DNA-sondo LSI *MYCN/CEP2* (Vysis) ter gen *SOX11* (2p25) z BlueFISH klonom RP11-38F5.



Slika 27: a) FISH z DNA-sondo LSI *MYCN/CEP2* (Vysis) in BlueFISH klonom RP11-38F5; b) nahajališče obeh analiziranih onkogenov *SOX11* in *MYCN* na kromosomu 2

Na *sliki 27* sta vidna dva zelena in centromerni rdeči signal za sondo *MYCN/CEP2*. Na koncu p krakov sta tudi prisotna dva rdeča signala za klon RP11-38F5.

Nadaljevali smo s FISH analizo z DNA-sondo ON ALK (Kreatech) in dvema BlueFISH klonoma. To sta bila RP11-458N5 za onkogen *DNMT3A* (2p23.3) in RP11-368O18 za področje 2p24.1.



Slika 28: a) FISH z DNA-sondo ON ALK (Kreatech) ter klonoma RP11-368O18 in RP11-458N5; b) nahajališča predhodnih in trenutno testiranih onkogenov na kromosomu 2

Prisotni so bili po 1 rdeč signal za *ALK*, 1 oranžen signal za RP11-458N5 in 1 zelen signal za RP11-368O18, kar pomeni, da je prišlo do delecije na celotnem testiranem področju (slika 28). Glede na prisotnost genov *MYCN* in *SOX11* je delecija intersticijska.

5 RAZPRAVA

5.1 UVEDBA IN OPTIMIZACIJA SKY

Prvi poskus SKY analize po protokolu proizvajalca (28) je bil neuspešen, saj so vse celice na steklu razpadle. Predvidevali smo, da je vzrok v predolgi inkubaciji, v kateri izmed raztopin ali pa v neustrezni koncentraciji raztopine formamida. Kot možnost smo dopuščali tudi neustrezno pH vrednost raztopin, predvsem formamida. Pri drugem poskusu smo se zato osredotočili na preverjanje temperature ter pH vrednosti. Posebno pozornost smo namenili denaturacijski raztopini formamida, saj je izmed vseh raztopin najbolj problematična. Preverili smo njeno pH vrednost, jo uravnali natančno na 7,0 in hkrati tudi spremljali temperaturo vodne kopeli, v kateri smo formamid segrevali. Steklo naj bi se po protokolu proizvajalca inkubiralo v formamidu največ 90 sekund, mi pa smo ta čas skrajšali na 60 sekund, da ne bi prišlo do prekomerne denaturacije in posledično razpada celic. Kljub vsemu rezultat ni bil boljši, celice so ponovno razpadle.

V tretjem poskusu smo kot možnost napake upoštevali tudi čas inkubacije stekla v raztopini pepsina pri predobdelavi stekla. Ker je pri FISH analizi čas inkubacije 5 minut, smo enakega sprva uporabili tudi pri SKY, nato smo ga skrajšali na 3 minute. Rezultat ni bil boljši. Preverili smo še čas hibridizacije. Po protokolu naj bi bil ta čas od 24 do 72 ur. Pri vseh prejšnjih poskusih je bil skupen čas hibridizacije 48–72 ur, zato smo tokrat poskusili z natančno 24-urno hibridizacijo. Analiza ponovno ni bila uspešna.

Pred naslednjim poskusom smo še enkrat natančno pregledali protokol proizvajalca in ga primerjali z rutinskim FISH protokolom. Ugotovili smo eno ključno razliko med obema protokoloma, in sicer da SKY protokol ne vsebuje fiksacije s formaldehidom pri procesu predobdelave stekel, kot ga vsebuje FISH protokol. Zato smo se odločili, da jo vključimo v proces predobdelave.

Po vsaki stopnji smo s pomočjo invertnega mikroskopa preverili morfologijo celic. Steklo smo pregledali na začetku, po predobdelavi, po končani denaturaciji in na koncu analize. Pri vseh pregledih stekla smo tokrat dobili ustrezen rezultat in tudi končna analiza je bila uspešna (*slika 4*). Zato smo v protokol za rutinsko uporabo SKY vključili tudi fiksacijo s formaldehidom, ki je sicer rutinski del postopka FISH.

a) Vpliv bledenja na kakovost slik

Primerjava štirih zaporedno slikanih metafaz (*slika 5*) je potrdila, da (pričakovano) čim dlje je preparat izpostavljen svetlobi, tem slabša je kakovost zajete slike. Pri prvi zajeti metafazi (*slika 5a*) in iz nje sestavljenem kariogramu so kromosomi enotnih barv. Barve so čiste, le pri nekaterih kromosomih je vidno rahlo prelivanje odtenkov, kar najbolje vidimo iz prikaza v psevdo barvah. Pri drugi metafazi je prisotna že rahla zamegljenost slike, barve posameznih kromosomov kažejo na večje prelivanje (*slika 5b*). Vzrok temu je delno tudi prekrivanje kromosomov v metafazi. Pri kromosomih 4 in 16 je npr. viden vključek rdeče-roza barve, ki pa ni preureditev, temveč je posledica prekrivanja kromosomov. Pri tretji poslikani metafazi je vidno že znatnejše bledenje, predvsem odtenki zelene barve so zelo svetli in kromosome bi glede na fluorescenčne (RGB) barve zlahka zamenjali (*slika 5c*). Četrta metafaza je glede razpoznavnosti kromosomov in intenzitete barv najslabša. Posamezne barve so si dokaj podobne (*slika 5d*). Pri kasnejši obdelavi slike je tudi veliko več dela in tudi večja možnost napačnega opredeljevanja kromosomov.

Ugotovili smo, da je zaradi velikega presvetljevanja preparata potrebno metafaze slikati čim hitreje, saj je vsaka naslednja slikana metafaza slabše kakovosti. Čas slikanja je odvisen od velikosti zajetega polja. Smiselno je poiskati najboljše razpršeno metafazo za prvo slikanje. Poleg tega moramo veliko pozornost posvetiti tudi primernemu rokovanju s preparatom med samo obdelavo, saj ga ne smemo izpostavljati močni svetlobi.

Pregledali smo tudi koncentracije posameznih barv kromosomov treh zaporedno slikanih metafaz, da bi ovrednotili vpliv bledenja barv (*tabela 2*). Ker je barva vsakega kromosoma kombinacija ene ali največ petih barv, smo za vsako izmed teh barv zapisali delež, ki ga ta barva zavzema od celotne (skupne) barve kromosoma. Npr. končno barvo kromosoma 1 sestavljajo barve B, C in D, kar tudi vidimo kot višje deleže omenjenih barv. Skupna vrednost barv za posamezen kromosom bi morala biti 100 %, vendar v praksi lahko pride do odstopanj.

Za kromosom 1 vidimo, da je zastopanost barve B pri prvi slikani metafazi 25 %, pri drugi 24 % pri tretji pa le še 19 % (*obarvani okvirčki tabele 2*). To kaže, da se intenziteta določene barve z vsakim naslednjim slikanjem zmanjšuje, kar vidimo kot bledenje slike in slabšo ostrino kromosomov. Ta pojav ni enak pri vseh kromosomih in izbranih barvah, saj se vzdolž kromosoma ta razmerja spreminjajo, zato moramo biti pri odčitavanju intenzitete barv pozorni predvsem na pozicijo odčitavanja in da je ta enaka pri vseh kromosomih.

b) Vpliv kakovosti kromosomov na končni rezultat

Pri preučevanju vpliva bledenja smo hkrati ocenili tudi vpliv kakovosti nanešenih metafaz na končni rezultat. Glavni problem predstavlja prekrivanje kromosomov, zato morajo biti kromosomi čim bolj ločeni. Vsako prekrivanje kromosomov lahko vodi do napačne interpretacije, saj povzroči prelivanje barv, kar neizkušen analitik lahko interpretira tudi kot možno preureditev. Področja prekrivanj se obarvajo specifično kot kombinacija obeh prekrivajočih se spektrov. Velik vpliv ima tudi gostota nanosov, ki ne sme biti prevelika. Okoli metafaznih kromosomov ne sme biti preveč citoplazme, saj to otežuje dostop sond do kromosomov. Posledično so taki preparati nejasni, z velikim signalom ozadja.

c) Vpliv staranja preparatov na izvedbo SKY

Ker protokol proizvajalca ne vključuje staranja preparatov (28), smo hoteli preveriti, kakšen vpliv ima predhodno sušenje na končni rezultat SKY. Uporabili smo dva preparata (*preiskovanca 4*), pri čemer enega nismo starali, drugega pa smo starali najprej pol ure pri 60 °C, nato pa še pol ure pri 90 °C.

Preparat brez sušenja (*slika 7a*) ima v primerjavi s preparatom, ki smo ga sušili (*slika 7b*), slabšo ostrino. Kromosomi so slabše ločljivi od ozadja in imajo nejasne robove. Posledično se preparat brez sušenja tudi hitreje presvetli in barve kromosomov hitreje zbledijo. Ker torej s sušenjem dobimo boljšo resolucijo slik in bolj odporne kromosome, smo postopek staranja vključili v protokol za rutinsko uporabo.

d) Vpliv predhodnega proganja GTG

Predhodno progana metafaza ima v primerjavi s svežo slabšo ostrino in ločljivost (*slika 8*). Poleg tega smo zasledili tudi večji signal ozadja kot pri svežem preparatu. Kljub slabši kakovosti pa je rezultat še vedno sprejemljiv. Skratka, pri razreševanju težkih primerov je SKY mogoče izvesti tudi na predhodno proganih metafazah.

Pri proganju moramo biti pazljivi na čas inkubacije stekla v raztopini tripsina, saj predolga inkubacija lahko vpliva na kasnejšo slabšo ločljivost zaradi bolj razgrajene strukture kromosomov.

e) Analiza zajetih slik

Po zajetju slik SKY, lahko le-te predstavimo v treh različnih pogledih (RGB, klasificirana slika in kariotip), pri čemer klasificirana slika, kjer so kromosomi v psevdo barvah, omogoča urejanje in natančnejši pregled možnih preureditev. Na *sliki 9a* vidimo klasificirano sliko metafaze pred obdelavo. Na kromosomih so vidna področja mešanja barv, ki več kot očitno niso preureditve kromosomov, hkrati pa tudi področja, kjer je prišlo do premestitev. Programska oprema SKY omogoča obdelavo področij brez preureditev tako, da lahko barve kromosomov poenotimo in na ta način izpostavimo področja dejanskih premestitev (*slika 9b*). Na *sliki 9b* lahko vidimo končni rezultat postopne obdelave slike, ki je omogočil jasen prikaz preureditev.

Hkrati SKY program ponudi možne preureditve (*sliki 10a in 10b*). Če označimo področja prehodov barv, samodejno prikaže, kateri kromosomi so morda vključeni pri določeni preureditvi. Uspeli smo opredeliti tudi izvor materiala markerskega kromosoma (*slika 10c*). Večinsko je sestavljen iz materiala kromosoma 5 (oranžna), morda pa tudi iz kromosomov 1 (rumena) in 6 (roza).

5.2 RAZREŠEVANJE KROMOSOMSKIH PREUREDITEV Z METODAMI MOLEKULARNE CITOGENETIKE

5.2.1 OPREDELITEV MARKERSKIH KROMOSOMOV IN KOMPLEKSNIH PREUREDITEV

Po začetnem proganju smo pri *preiskovancu 1* (slika 11a) na kariogramu opazili kromosom, kateremu s pomočjo proganja GTG nismo uspeli določiti izvora, zato smo kariotip zapisali kot 47,XX,+mar. Osredotočili smo se na razreševanje izvora markerskega kromosoma. Študija Veldmana T. in sodelavcev (23) je potrdila SKY kot učinkovito in občutljivo metodo za razreševanje markerskih kromosomov. SKY je izboljšala zaznavanje in omogočila odkrivanje preureditev, ki jih predhodno proganje GTG ni razkrilo.

Na *sliki 11b* je viden markerski kromosom, ki pa ga nismo uspeli opredeliti. Glede na njegovo obarvanost s psevdo barvami bi ga lahko opredelili kot izvirajočega iz kromosomov 22 oziroma 18, glede na RGB barve pa iz kromosomov 16, 19 ali 20, morda tudi 7 in na nekaterih metafazah 17. Vendar pa barva markerja ni nedvoumna oziroma so vidni različni odtenki zelene in rjave barve, zato ne moremo z gotovostjo izključiti tudi nekaterih drugih kromosomov, ki so podobnih barv.

Ker s SKY nismo dobili dokončnega odgovora, smo nadaljevali analizo s pomočjo sond WCP, in sicer za kromosome 7, 16, 17, 19, 20 in 22. Dodatno smo nanegli še DNA-sondo CEP7/del(7q). Vzorci signalov so bili normalni, marker ni bil obarvan. Zaključili smo z možnostjo, da je v markerju premalo specifičnih zaporedij, da bi se sonde vezale in da bi se posledično marker obarval, zaradi česar so tudi vzorci signalov vseh sond normalni. Pri majhnih markerjih je zato tudi SKY neučinkovit.

Pri *preiskovancu 4* smo skušali ugotoviti izvor markerskega kromosoma in razrešiti nepravilnosti kromosomov s pomočjo proganja GTG in spektralne kariotipizacije. Proganje GTG (*slika 12*) je pokazalo markerski kromosom kot del kompleksno preurejenega kariotipa z več kloni. Glede na odsotnost enega normalnega kromosoma 5 smo kot eno od možnosti dopuščali, da bi izvor markerja lahko bil iz kromosoma 5. Vidne so tudi druge nepravilnosti, in sicer dodatni material na kromosomu 16, monosomija kromosomov 7, 14, 18 in 22 ter odsotnost kromosoma Y (preiskovanec je bil moškega spola).

Nadaljevali smo s spektralno kariotipizacijo (SKY) (*slika 13*). SKY je potrdila pravilnost zapisanih translokacij t(14;16) ter t(5;22) ter monosomije 7 in 18. Vidna je tudi odsotnost kromosoma Y.

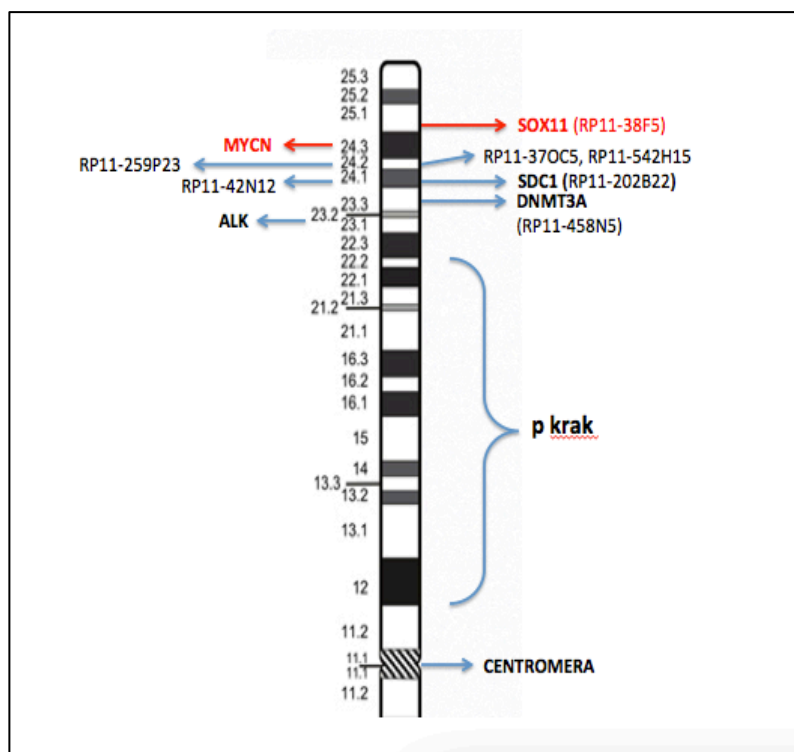
Markerski kromosom sicer prikazuje prelivajoče se zelene in rjave odtenke, ki lahko ustrezajo barvam kromosomov 5, pa tudi 17 in 19. Ker ga je samodejno razporejanje v programu SKY vselej prepoznavalo kot kromosom 5, smo ga končno opredelili kot derivativni kromosom 5.

5.2.2 DOLOČANJE PRELOMNIH MEST IN VPLETENIH GENOV

Pri bolniku s KLL (*preiskovanec 3*) smo iskali prelomne točke in vpletene gene pri t(2;14) ter skušali razrešiti nepravilnosti kromosomov 8 in 17. Najprej smo uporabili proganje GTG, ki je poleg napovedno neugodne del(11q), pokazalo nepravilnosti na kratkem kraku kromosoma 2 in dolgem kraku kromosoma 14 (*slika 14*). Ker je pri translokacijah, ki vključujejo kromosom 14, pri B-celičnih limfomih ponavadi vpleten gen *IGH*, smo najprej začeli s FISH analizo z razcepno sondo LSI *IGH*. Normalen vzorec signalov sta dva fuzijska signala na kromosomih 14 na področju q32. *Slika 15* kaže dobljen vzorec signalov, kjer je viden en fuzijski signal, kar je normalno, ter po en razcepljen, zelen in oranžen signal. Zelen signal ustreza 5' *IGH* in se nahaja na kromosomu 2. Oranžen signal pa ustreza 3' *IGH*, in se nahaja na kromosomu 14. To potrjuje prelom v genu *IGH* na kromosomu 14.

Translokacijo smo po potrditvi preureditve gena *IGH* zapisali kot t(2;14)(p32;q32), doslej pa še ni bila opisana v literaturi. V literaturi so nekatere translokacije t(2;14) že opisane, vendar nobena s prelomno točko tako distalno na kratkem kraku kromosoma 2. Ponavljajoča je t(2;14)(p13~p16;q32), ki vključuje fuzijski gen *IGH/BCL11A* in se pojavlja pri KLL (29). Opisana je še ena t(2;14) s prelomno točko na kratkem kraku kromosoma 2, ki bi lahko prišla v poštev, in sicer t(2;14)(p23;q32) pri bolnici z diseminiranim plazmocitomom.

Ker ima bolnik rakavo krvno bolezen (KLL), smo se pri iskanju partnerskih genov osredotočili na značilne onkogene, ki so opredeljeni kot možni vpleteni partnerji pri translokacijah. *ALK* se pogosto pojavlja kot partnerski gen pri B-celičnih limfomih, prav tako tudi gen *SOX11*. Onkogen *SDCI* smo vključili v analizo zaradi njegove vpletenosti pri KLL, *DNMT3A* se značilno pojavlja pri mielodisplastičnih sindromih. Pomnožitve in preveliko izražanje gena *MYCN* je značilno predvsem pri nevroblastomu, translokacije, ki kot partnerski gen vključujejo *MYCN*, pa se lahko pojavijo tudi pri določenih limfomih (30).



Slika 29: Analizirani onkogeni na kromosomu 2 pri preiskovancu 3.

Z rdečo so označeni geni, ki so bili translocirani na kromosom 14.

Naslednji kandidatni onkogen je bil *SOX11*, ki se nahaja distalno od gena *ALK* na področju 2p25. Analiza s klonom BlueFISH je pokazala translokacijo gena *SOX11* na kromosom 14 (slika 18). S tem smo določili okvir možnih točk preloma na področje med genom *ALK* na mestu 2p23.2 in genom *SOX11* na mestu 2p25, ki je bil translociran na kromosom 14.

Področje smo zožili s testiranjem onkogenega *MYCN*, ki se nahaja centromerno glede na gen *SOX11*, na mestu 2p24.3. FISH analiza z DNA-sondo MYCN/CEP2 je pokazala premeščen gen na kromosom 14 (slika 19), zato smo naslednji onkogen spet izbrali centromerno glede na gen *MYCN*. Analizirali smo gen *DNMT3A* s klonom BlueFISH, ki pokriva področje 2p23.3. Gen ni bil razcepljen in je ostal na 2p (slika 20), zato smo se pomaknili telomerno in analizirali onkogen *SDC1* na področju 2p24.1. Analiza je pokazala normalen vzorec signalov, gen je vnovič ostal na 2p (slika 21). Nadaljevali smo z analizo področja, ki leži telomerno glede na gen *SDC1*, to sta področji 2p24.1 in 2p24.2, obe z BlueFISH klonoma (slika 22). Na področju 2p24.1 ni prišlo do preloma, prav tako ne na področju 2p24.2, čeprav je 5 % celic imelo po 3 signale. Ta vzorec signalov smo pripisali bližini prelomne točke, zato smo nadaljevali z analizo z dvema novima klonoma BlueFISH, ki pokrivata področje 2p24.2, vendar je bil vzorec signalov normalen, ostali so na 2p (slika 23).

Nadaljevali smo z določanjem prelomnega mesta in vpletnih genov na področju kratkega kraka kromosoma 2 (slika 29). Začeli smo s testiranjem kandidatnega gena *ALK* na področju 2p23.2 z razcepno DNA-sondo *ALK*. *ALK* se je nahajal na izvornem mestu kromosoma 2 in v njem ni prišlo do preloma (slika 17).

Z vsemi uporabljenimi sondami smo tako natančno določili mesto preloma v področju 2p24.2, med genoma *MYCN* in *SDC1*, nismo pa uspeli določiti partnerskega gena *IGH*.

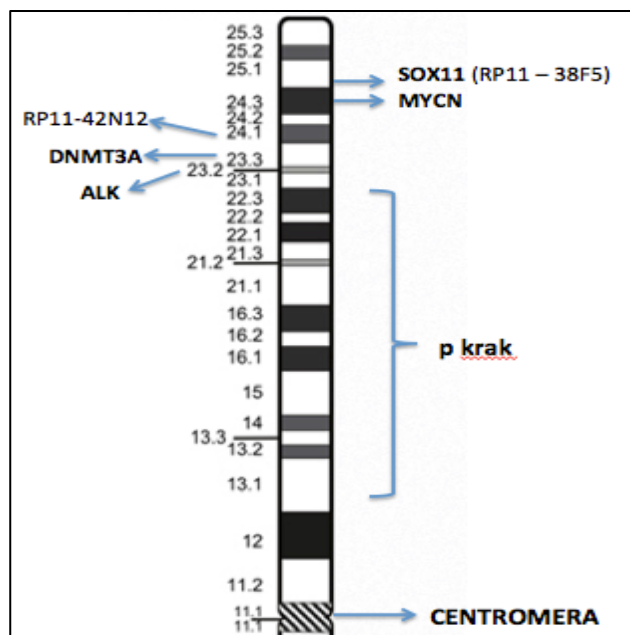
a) Razreševanje ostalih nepravilnosti z uporabo sond za obarvanje celotnih kromosomov

Proganje GTG pri *preiskovancu 3* je, poleg že omenjene del(11q) in t(2;14), pokazalo preurejene metafaze z nepravilnostmi kromosomov 8 in 17 (*slika 24*). Našli smo dva različna klona. V prvem smo opazili dodaten material na vrhu kromosoma 17, v drugem pa še dodatne nepravilnosti kromosomov 8, 11, 14 in monosomijo 17. Najprej smo se osredotočili na iskanje izvora materiala na kromosomu 17. Uporabili smo sonde WCP različnih barv, in sicer WCP 17 (modra), WCP 8 (zelena) in WCP X (rdeča).

Slika 25a kaže derivativni kromosom, ki ga sestavljata dolga kraka kromosomov 8 in 17. Na ta način smo potrdili translokacijo t(8;17). Hkrati smo zaznali tudi drugi klon (*slika 25b*), kjer imata spremenjena kromosoma 8 in 17 neopredeljeni material na kratkih krakih.

Translokacija t(8;17) doslej ni dokumentirana v literaturi kot ponavljajoča preureditev pri KLL. Obstajajo zapisi o t(8;17) pri mieloproliferativnih neoplazmah, kot je t(8;17)(p11;q23) s fuzijskim genom *MYO18A/FGFR1* (31). Poznan je tudi primer t(8;17)(q24;q22), ki se je pojavil pri pacientu s prolimfocitno levkemijo in naj bi vključeval gen *BCL3*, čeprav se ta nahaja na 19q13.3 (32).

b) Razreševanje nepravilnosti z uporabo komercialno dostopnih FISH DNA-sond in klonov BlueFISH pri preiskovancu 5



Pri *preiskovancu 5* smo ugotavljali, ali je delecija na kratkem kraku kromosoma 2 intersticijska ali terminalna (*slika 26*). Pričeli smo s FISH analizo onkogenega *MYCN* na področju 2p24, pri čemer smo uporabili DNA-sondo LSI *MYCN/CEP2*. Hkrati smo analizirali tudi gen *SOX11* na področju 2p25, telomerno glede na *MYCN*. Vzorci signalov so bili normalni, zato smo delecijo tega območja izključili (*slika 27*). Na ta način smo tudi dokazali, da je delecija intersticijska.

Slika 30: Analizirani onkogeni na kromosomu 2 pri preiskovancu 5

Pri naslednji analizi smo hkrati uporabili DNA-sondo za onkogen *ALK* na področju 2p23 ter dva klona BlueFISH, enega za onkogen *DNMT3A* na področju 2p23.3, drugega pa za področje 2p24.1, ki se nahaja telomerno od gena *DNMT3A*. Ker je pri vseh sondah prišlo do izgube signala (*slika 28*), je prišlo do delecije na celotnem testiranem področju. S tem smo natančno opredelili področje delecije.

6 SKLEPI

- ❖ Za razreševanje kompleksnih ali nepoznanih kromosomskih preureditev smo uporabili posamezne FISH temelječe metode molekularne citogenetike ali njihovo kombinacijo, vključno s SKY, ki smo jo uvedli v rutinsko delo.
- ❖ Za uspešno izvedbo SKY je kritičnega pomena natančno in dosledno upoštevati predpisani postopek. Ključno je zagotavljanje kakovosti že pri predhodnih postopkih izolacije, nanosov na objektna stekla, staranju preparatov in predobdelavi stekla, saj vsak korak vpliva na končno kakovost. Na končni rezultat SKY analize ključno vpliva nanos celic na stekla, ki mora biti izveden tako, da se kromosomi ne prekrivajo in da metafaze obdaja malo citoplazme ali nečistoč.
- ❖ Ugotovili smo, da je za uspešno analizo nujno vključiti tudi stopnjo fiksacije s formaldehidom, ki je originalni protokol proizvajalca ne vključuje. Za boljše obarvanje kromosomov je dobro stekla tudi starati vsaj eno uro, čeprav tudi tega protokol proizvajalca ne predpisuje.
- ❖ Predhodno progane metafaze dajejo sicer slabši rezultat kot sveži metafazni nanosi, vendar je možno SKY izvesti tudi na predhodno GTG proganih kromosomih.
- ❖ Metoda spektralne kariotipizacije se je izkazala za zelo uporabno, zlasti pri kompleksnih preureditvah, manj pri opredelitvi markerskih kromosomov. Analize markerskega kromosoma pri preiskovancu 1 nismo uspeli zaključiti. Predpostavljali smo, da marker ne vsebuje dovolj specifičnih zaporedij. Glede na obarvanost markerskega kromosoma pri preiskovancu 4 smo predpostavili njegov izvor iz kromosoma 5.
- ❖ Z uporabo različnih DNA-sond in citogenetskih tehnik smo razreševali neznane preureditve. S pomočjo označenih klonov BAC smo natančno opredelili translokacijo t(2;14) z doslej neznano prelomno točko v področju 2p24.2, nismo pa uspeli odkriti partnerskega gena genu *IGH*. V literaturi neopisano delecijo smo s pomočjo DNA-sond in označenih klonov BAC razrešili kot intersticijsko v področju med 2p23 in 2p24.1. S pomočjo sond za obarvanje celih kromosomov smo razrešili tudi preureditve kromosomov 8 in 17. Pri prvem klonu smo potrdili prisotnost t(8;17), pri drugem pa sta prisotna preurejena kromosoma 8 in 17 z neopredeljenim materialom na kratkih krakih.

7 LITERATURA

1. Kannan TP, Zilfalil BA: *Cytogenetics: Past, present and future*, MJMS, 2009; 16: 4–9.
2. Gersen SL, Keagle MB (Eds.): *The Principles of Clinical Cytogenetics*, 2nd ed., Humana Press Inc, Totowa, New York, 2005, 3–5, 63–79, 93–111, 444–490.
3. Trask BJ: *Human Cytogenetics: 46 Chromosomes, 46 Years and Counting*, Nat Rev Genet, 2002; 3: 769–777.
4. Rowley JD: *Chromosomal translocations: revisited yet again*, Blood, 2008; 112: 2183–2189.
5. Andoljšek D, Černelč P, Mlakar U, Modic M, Pajič T, Podgornik H, Preložnik Zupan I, Pretnar J, Zver S: *Bolezni krvi in krvotvornih organov, V: Interna medicina* (Uredniki: Kocjančič A, Mravlje F, Štajer D); *Littera picta*, 2005, 1172–1314.
6. Heim S, Mitelman F (Eds.): *Cancer Cytogenetics, Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells*, 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 2009, 9–345.
7. Breems DA, Van Putten WLJ, De Greef GE, Van Zelderen - Bhola SL, Gerssen - Schoorl KBJ, Mellink CHM, Nieuwint A, Jotterand M, Hagemeyer A, Beverloo HB, Lowenberg B: *Monosomal Karyotype in Acute Leukemia: A Better Indicator of Poor Prognosis Than a Complex Karyotype*, J Clin Oncol, 2008; 26: 4791–4797.
8. Podgornik H, Pajič T, Kokalj - Vokač N, Zagorac A, Ruprecht R, Černelč P: *Citogenetične in molekularno genetične preiskave pri ugotavljanju kronične mieloične levkemije in spremljanju zdravljenja*, Zdrav vestn, 2004; 73: 13–17.
9. Campbell LJ (Edt.): *Cancer Cytogenetics, Methods and protocols*, 2nd ed., Humana Press, Melbourne, 2010, 13–33.
10. Wan TSK, Ma ESK: *Molecular Cytogenetics: An Indispensable Tool for Cancer Diagnosis*, Chang Gung Med J, 2012; 35: 96–109.
11. Gorczyca W: *Cytogenetics, FISH and Molecular Testing in Hematologic Malignancies*, Informa Healthcare, United Kingdom, 2008, 16–19, 31–97.
12. Vorsanova SG, Yurov YB, Iourov IY: *Human Interphase Chromosomes: A Review of Available Molecular Cytogenetic Technologies*, Molecular Cytogenetics, 2010; 3: 1–15.
13. <http://www.yourgenome.org/>, april 2015

14. Brown TA: *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*, 6th Edition, John Wiley & Sons, Ltd., Publication, Hong Kong, 2010, 13–24, 102–104.
15. Bayani JM, Squire JA: *Applications of SKY in Cancer Cytogenetics*, *Cancer Invest*, 2002; 20: 373–386.
16. Mathew S, Rao PH, Dalton J, Downing JR, Raimondi SC: *Multicolor Spectral Karyotyping Identifies Novel Translocations in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia*, *Leukemia*, 2001; 15: 468–472.
17. Imataka G, Arisaka O: *Chromosome Analysis Using Spectral Karyotyping (SKY)*, *Cell Biochem Biophys*, 2012; 62: 13–17.
18. Jalal SM, Law ME: *Utility of Multicolor Fluorescent in Situ Hybridization in Clinical Cytogenetics*, *Genet Med*, 1999; 1: 181–186.
19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, april 2015
20. Padilla - Nash HM, Barenbiom-Stapleton L, Difilippantonio MJ, Ried T: *Spectral Karyotyping Analysis of Human and Mouse Chromosomes*, *Nat Protoc*, 2006; 1: 3129–3142.
21. Garini Y, Macville M, Du Manoir S, Buckwald RA, Lavi M, Katzir N, Wine D, Bar-Am I, Schrock E, Cabib D, Ried T: *Spectral Karyotyping*. *Bioimaging*, 1996; 4: 65–74.
22. Mohr B, Bornhauser M, Thiede C, Schakel U, Schaich M, Illmer T, Pascheberg U, Ehninger G: *Comparison of Spectral Karyotyping and Conventional Cytogenetics in 39 Patients with Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome*, *Leukemia*, 2000; 14: 1031-1038.
23. Veldman T, Vignon C, Schröck E, Rowley JD, Ried T: *Hidden Chromosome Abnormalities in Haematological Malignancies Detected by Multicolour Spectral Karyotyping*, *Nat Genet*, 1997; 15: 406–410.
24. Kakazu N, Taniwaki M, Horilke S, Nilshida K, Tatekawa T, Nagal M, Takahashi T, Akaogi T, Inazawa J, Ohki M, Abe T: *Combined spectral karyotyping and DAPI banding analysis of chromosome abnormalities in myelodysplastic syndrome*. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999; 26: 336–345.
25. Guo B, Han X, Wu Z, Da W, Zhu H: *Spectral Karyotyping: An Unique Technique for the Detection of Complex Genomic Rearrangements in Leukemia*. *Transl Pediatr*, 2014; 3: 135–139.

26. Mrózek K, Heinonen K, Theil KS, Bloomfield CD: *Spectral Karyotyping in Patients with Acute Myeloid Leukemia and a Complex Karyotype Shows Hidden Aberrations, Including Recurrent overrepresentation of 21q, 11q, and 22q*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2002; 34: 137–153.
27. <http://www.illumina.com/>, maj 2015
28. <http://www.spectral-imaging.com/>, marec 2015
29. Zameckova A: *t(2;14)(p13-16;q32)*, *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, 2010; 14: 1082–1084.
Dostopno na: <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t0214p13q32ID1231.html> (junij 2015).
30. <http://atlasgeneticsoncology.org>, junij 2015
31. Walz C, Chase A, Schoch C, Weisser A, Schlegel F, Hochhaus A, Fuchs R, Schmitt-Gräff A, Hehlmann R, Cross NC, Reiter A: *The t(8;17)(p11;q23) in the 8p11 myeloproliferative syndrome fuses MYO18A to FGFR1*, *Leukemia*, 2005; 19: 1005–1009.
32. Huret JL: *t(8;17)(q24;q22)??BCL3/MYC*, *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, 2011; 16: 236–237. Dostopno na: <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t0817q24q22ID1494.html> (junij 2015).

8 PRILOGE

Priloga 1: Klasifikacijska tabela s prikazom deležev posameznih barv za določen kromosom (28)

Številka kromosoma	Kombinacija barv	Možne zamenjave s kromosomi	Koncentracije posameznih barv (v %)				
			A	B	C	D	E
1	*BCD*		11	26	28	29	6
2	****E		12	10	2	9	67
3	A*CDE		21	2	24	27	26
4	**CD*		8	6	35	43	8
5	AB*DE		23	15	8	27	27
6	*BCDE		9	15	22	28	26
7	*BC**		7	37	40	9	6
8	***D*		11	5	11	60	12
9	A**DE		25	1	7	32	35
10	**C*E		7	6	33	5	48
11	A*CD**	13	21	6	32	18	23
12	*B**E		9	34	5	5	47
13	A**D*		31	2	10	46	12
14	*B***	12	14	40	16	14	16
15	ABC**		27	25	36	7	6
16	*BCD*		6	39	9	41	5
17	**C**		11	7	63	13	6
18	AB*D*		25	23	10	35	7
19	A*C**		42	8	46	7	4
20	A****		67	17	13	11	9
21	***DE		10	5	5	36	44
22	ABC*DE		25	15	24	4	31
X	A***E		29	1	12	12	45
Y	**CDE		5	1	27	24	44

Priloga 2: Uporabljene DNA-sonde

DNA-sonda	Področje vezave	Označevalec	Normalni vzorec signalov	Proizvajalec	Opombe
LSI IGH	14q32	Spectrum Orange, Spectrum Green	2 fuzirana	Vysis	Razcepna sonda
ON ALK	2p23	Spectrum Orange, Spectrum Green	2 fuzirana	Kreatech	Razcepna sonda
LSI MYCN/CEP2	2p24/CEP2	Spectrum Green (2p24), Spectrum Orange (α satelitna zaporedja centromere)	2 zelena, 2 rdeča	Vysis	
LSI D7S486/CEP7	7q31/CEP7	Spectrum Green (α satelitna zaporedja centromere), Spectrum Orange (7q31)	2 zelena, 2 oranžna	Vysis	
WCP 8	8	Spectrum Green	Zelen	Kreatech	Hibridizira na celotno področje kromosoma
WCP 17	17	Spectrum Aqua	Moder	Kreatech	Hibridizira na celotno področje kromosoma
WCP X	X	Spectrum Orange	Rdeč	Kreatech	Hibridizira na celotno področje kromosoma