

# PRIMJENA TEHNIKA MOLEKULARNE CITOGENETIKE U DETEKCIJI KROMOSOMSKIH PROMJENA

---

Vraneković, Jadranka

Source / Izvornik: **Medicina**, 2004, 42(40), 247 - 255

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:749526>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



## PRIMJENA TEHNIKA MOLEKULARNE CITOGENETIKE U DETEKCIJI KROMOSOMSKIH PROMJENA

### MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES IN DETECTION OF CHROMOSOME CHANGES

Jadranka Vraneković

#### SAŽETAK

Krajem prošloga stoljeća humana je citogenetika uvođenjem tehnika molekularne biologije doživjela velik napredak, čime je omogućen razvoj molekularne citogenetike. Metode kao što su fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH), višebojna kariotipizacija (M-FISH, SKY, RXFISH) i komparativna hibridizacija genoma (CGH) riješile su nedostatke klasičnih metoda citogenetike, kojima se često nije mogao precizno opisati kariotip. Klinička primjena ovih metoda važna je u dijagnostici numeričkih i strukturnih promjena kromosoma kao što su trisomije, mikroleucije, subtelermerne translokacije, te u identifikaciji podrijetla marker-kromosoma i promjena gena u tumorskim stanicama.

**KLJUČNE RIJEČI:** FISH, M-FISH, SKY, CGH, PRINS

#### ABSTRACT

By the end of last century, human cytogenetics experienced a remarkable progress by applying molecular biology techniques to the conventional chromosome analysis, and, in that way, a new discipline was established – molecular cytogenetics. The limitations of the conventional banding analysis in the accurate karyotyping and interpretation of certain chromosome abnormalities were largely overcome by these new technologies, such as, fluorescence *in situ* hybridisation (FISH), multicolour FISH (M-FISH, SKY, RXFISH) and comparative genomic hybridisation (CGH). The clinical applications include the diagnosis of numerical and structural aberrations (trisomy, microdeletion, subtelomeric translocations), as well as the identification of marker chromosomes and gene rearrangements in tumours.

**KEY WORDS:** FISH, M-FISH, SKY, CGH, PRINS

#### UVOD

Prva saznanja o humanim kromosomima potječu iz davne 1880. godine, a vezana su uz radove Fleminga i Arnolda. No tek su 1956., čak tri godine nakon otkrića strukture DNA-molekule, Tijo i Levan ustanovili točan broj humanih kromosoma, koristeći se kulturom stanica fetalnih pluća.<sup>1</sup> Iste godine Ford i Hamerton izbrojili su u spermaticitama čovjeka 23 bivalenata. Obje grupe potvrdile su da je diploidan broj kromosoma u humanim stanicama 46.<sup>2</sup> Tim je otkrićem, zahvaljujući tehničkim

postignućima i standardizaciji kultiviranja tkiva i pripreme kromosomskih preparata, započeo intenzivan razvoj citogenetike. Daljnji napredak tehnologije omogućio je identifikaciju pojedinačnih kromosoma i njihovu povezanost s određenim bolestima. Tako je 1956. godine otkriven Downov (DS), Patauov (PS) i Edwardsov sindrom (ES).<sup>6</sup> Otkrivene su i promjene u broju spolnih kromosoma, koje se povezuju sa specifičnom kliničkom slikom kao što je to slučaj kod Turnerova i Klinefelterova sindroma.<sup>3</sup> Napredak tehnologije omogućio je razvoj tehnika oprugavanja kromosoma, čime je započelo novo razdoblje u humanoj citogenetici, *razdoblje oprugavanja*.<sup>7</sup> Svaki kromosom ima specifičan slijed pruga, prema kojima se mogu razlikovati, a to je omogućilo detekciju strukturnih promjena na kromosomima. Najraširenija je metoda oprugavanja kromosoma GTG-metoda (engl. –

Ustanova: Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

Prispjelo: 24. 4. 2004.

Prihvaćeno: 10. 5. 2004.

Adresa za dopisivanje: Mr. sc. Jadranka Vraneković, prof. biol/kem., Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Braće Branchetta 20, 51000 Rijeka. Tel. 051651131. e-mail: jadranka.paravic@medri.hr

G-bands by trypsin using Giemsa) ili G-pruge, kod koje se kromosomski preparati tretiraju enzimom tripsinom i boje nefluorescentnom bojom – Giemsom. Poznate su i druge metode oprugavanja kromosoma kao što su: QFQ-metoda, RHG-metoda te CBG-metoda. Tehnike oprugavanja stalno se unapređuju kako bi se povećao broj vidljivih pruga, čime se povećava i senzitivnost detekcije kromosomskih promjena. Najmanji broj pruga na metafaznom kromosomu, dobivenih GTG-metodom oprugavanja, iznosi 400. Visokorezolutnom tehnikom na metafaznom se kromosomu može dobiti od 500 do 550 pruga. Broj pruga na profaznom ili prometafaznom kromosomu doseže čak 850 i više.<sup>2</sup> Te metode često nisu dovoljno informativne pa se za potpunu i preciznu analizu kromosoma mora primijeniti jedna ili više tehnika molekularne citogenetike. Najmlađe je razdoblje u razvoju citogenetike *molekularno razdoblje* koje je započelo prije dvadesetak godina zahvaljujući razvoju tehnika molekularne biologije, koje su svoju primjenu našle i u ovoj grani genetike. Kombinacija tehnika klasične citogenetike i molekularne genetike dovela je do razvoja nove grane nazvane molekularna citogenetika. Brojne njezine tehnike postale su neizostavni dio i u području kliničke citogenetike i u područjima citogenetike tumora, mapiranja gena te analizi evolucije kariotipa.<sup>3</sup> Sve se više postavlja pitanje jesu li tehnike molekularne citogenetike zamjena za klasične tehnike citogenetike ili tek njihova nadopuna. Sasvim sigurno, radi se o nadopuni jer citogenetička analiza u okviru prenatalne i postnatalne dijagnostike uvijek započinje primjenom jedne od klasičnih metoda identifikacije kromosoma.

## TEHNIKE MOLEKULARNE CITOGENETIKE

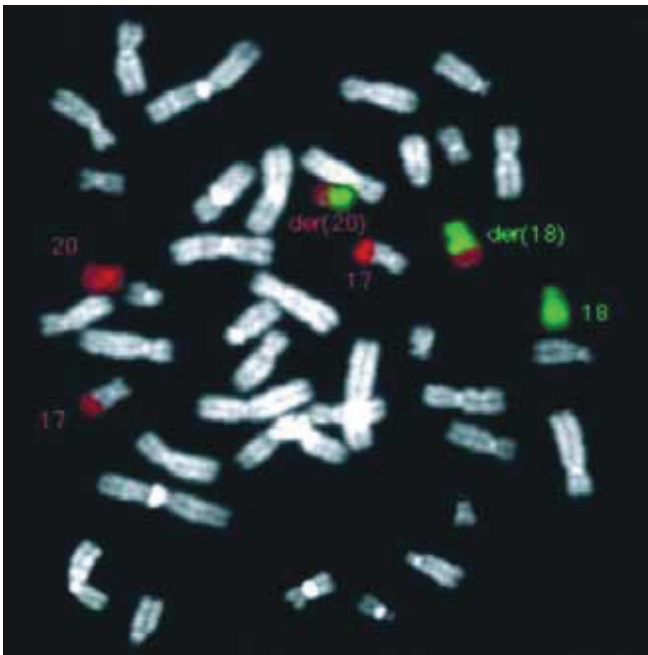
### In situ hibridizacija

Metoda *in situ* hibridizacije (ISH, engl. – *In situ* hybridization) kombinacija je citogenetičkih i molekularnih tehnika, koja omogućuje detekciju kromosoma i promjena koje se na njima mogu dogoditi. ISH se temelji na interakciji obilježene jednolančane DNA- ili RNA-molekule određenog slijeda nukleotida s komplementarnim slijedom jednolančane ciljane DNA na metafaznim kromosomima ili u interfaznoj jezgri.<sup>2</sup> ISH u originalu razvili su 1969. godine Pardue i Gall<sup>8</sup> neovisno o trojici drugih znanstvenika – Johnu, Birmstielu i Jonesu – koji su također razvijali tu metodu i iste godine objavili rad o svojim rezultatima.<sup>9</sup> Nukleinske su se kiseline u to vrijeme mogle obilježiti jedino upotrebom radioaktivnih izotopa, a detekcija je bila moguća isključivo autoradiografski. ISH je bio ograničen na one sljedove baza koji su se mogli izolirati i pročistiti konvencionalnim biokemijskim metodama. Molekularno kloniranje nuk-

leinskih kiselina i poboljšanje metoda radioaktivnog obilježavanja omogućili su detekciju redosljeda nukleotida veličine i do nekoliko stotina parova baza na metafaznim kromosomima.<sup>10-12</sup> Unatoč visokoj senzitivnosti i primjenjivosti metode, ISH se nije proširio na kliničke laboratorije nego se primjenjivao u istraživačkim laboratorijima. Glavni je razlog tome rad s radioaktivnim materijalom te mjerama sigurnosti koje se u tom slučaju moraju primijeniti što, nesumnjivo, poskupljuje i sam proces.

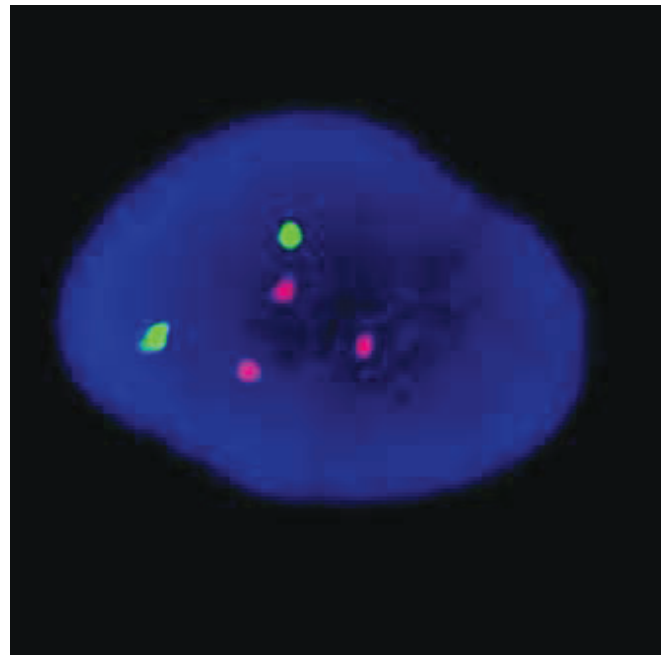
### Fluorescentna in situ hibridizacija

*In situ* hibridizacija pri kojoj se upotrebljavaju neradioaktivne fluorescentne boje za obilježavanje slijeda baza u DNA-sondi, poznata je pod imenom fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH).<sup>2</sup> Osnovni princip detekcije ciljane DNA-molekule s obilježenom sondom, isti je kao kod izvorne metode. Razlika je u načinu obilježavanja sonde. DNA-molekula koja služi kao sonda, obilježava se direktno s pomoću fluorescentnih boja ili indirektno s pomoću haptena (biotin) najčešće vezanih za deoksiraciltrifosfate (dUTP) koji se inkorporiraju u DNA-molekulu enzimatskim reakcijama kao što su metoda pomicanja usjeka (engl. – nick-translation) ili lančana reakcija polimerazom (engl. – polymerase chain reaction – PCR). Za detekciju indirektno obilježenih sonde upotrebljavaju se fluorescentno obilježena antitijela (avidin-Cy3). Fluorescencija ima mnoge prednosti nad autoradiografijom, a jedna je od njih ta što može istodobno detektirati nekoliko različitih ciljnih dijelova DNA-molekule upotrebom različitih fluorescentnih boja, a sam je signal puno veći i bolji nego kod ISH-a. Detekcija signala moguća je upotrebom fluorescentnog mikroskopa s odgovarajućim filterima, digitalnom kamerom te odgovarajućom kompjutorskom programskom podrškom.<sup>13-15</sup> Metoda fluorescentne *in situ* hibridizacije primjenjuje se na kromosomske preparate pripremljene standardnim citogenetičkim metodama odnosno kultivacijom različitih stanica kao što su: limfociti periferne krvi, stanice koštane srži, stanice kože ili bukalne sluznice te ostalih tkiva<sup>13,14,16</sup> (slika 1.). U prenatalnoj dijagnostici FISH se primjenjuje na kromosomske preparate dobivene kultivacijom stanica ploda dobivenih biopsijom korionskih resica, amniocentezom ili kordocentezom. Za potrebe preimplantacijske dijagnostike koriste se polarna tjelešca ili stanice ranog embrija (blastomere).<sup>17</sup> Dok je za metode klasične citogenetike nužna kultivacija stanica, FISH se može primjenjivati i na nekultiviranim stanicama, odnosno na interfaznoj jezgri. Prve ekperimente koji to dokazuju napravio je 1986. godine Pinkel sa svojim suradnicima.<sup>18</sup> Oni su pokazali da svaki kromosom zauzima određeno mjesto u interfaznoj jezgri te da ih je moguće u njoj i detektirati koristeći se sondom za cijeli kromosom.



Slika 1. FISH na metafaznim kromosomima sa sondama za cijeli kromosom 18 (WCP 18) (zeleni signal) i za cijeli kromosom 20 te terminalni dio dugog kraka kromosoma 17q (WCP 20) (crveni signal)

Figure 1 FISH on metaphase chromosomes with the whole chromosome probes 18 (WCP 18) (green signal) and for the whole chromosome 20 and the terminal part of the second extension of the chromosome 17q (WCP) 20) (red signal)



Slika 2. FISH na interfaznoj jezgri sa sondama za kromosom 13 (zeleni signal) i za kromosom 21 (crveni signal)  
Izvor: <http://members.aol.com/chrominfo/intfish.htm>

Figure 2 Fish on the interphase nucleus with probes for chromosome 13 (green signal) and for chromosome 21 (red signal)  
Source: <http://members.aol.com/chrominfo/intfish.htm>

Nakon njihova otkrića započela je detekcija numeričkih i strukturnih promjena kromosoma metodom fluorescentne *in situ* hibridizacije ne samo na metafaznim kromosomima već i u interfaznim jezgrama<sup>19,20</sup> (slika 2.). Nekultivirane stanice s interfaznim jezgrama (npr. amniociti) upotrebljavaju se za potrebe brze detekcije (24 do 48 sati) najčešćih aneuploidija u ljudi, a to su trisomije 13, 18, 21 kao i X- i Y-kromosoma.<sup>21,22</sup> Upotrebom sondi za navedene aneuploidije, ne mogu se istodobno detektirati i ostale moguće numeričke i strukturne promjene kromosoma. Zbog tih su razloga za potpunu analizu kromosoma potrebne i klasične metode citogenetike. FISH se uspješno nadopunjuje metodama klasične citogenetike pri detekciji kompleksnih strukturnih promjena kromosoma, koje su vrlo česte u stanicama tumora.<sup>23</sup> Ova metoda ima veliku važnost i u detekciji mikrodelecija, identifikaciji marker-kromosoma, karakterizaciji strukturnih promjena i analizi genskih promjena.

#### DNA-sonde

Tri su glavne kategorije DNA-molekule koje se upotrebljavaju kao sonde u FISH-u: centromerne sonde (engl. – centromere specific probes), sonde za cijeli kromosom

ili dio kromosoma (engl. – whole/partial chromosome paint probes-WCP/PCP) i sonde za mala specifična područja eukromatina (engl. – single copy ili unique sequence probes).<sup>13,14</sup>

#### Centromerne sonde

Centromerne sonde sadrže kratke, uzastopno ponavljajuće sljedove nukleotida tzv. satelitne DNA, koje ne kodiraju genske produkte. Svaka individua ima različit broj kopija satelitne DNA-molekule. Alfa-satelitnu DNA čine monomeri veličine oko 170 bp, koji se uzastopce ponavljaju više puta. Gotovo u svim humanim kromosomima ta je vrsta ponavljajuće DNA-sekvencije identična, ali je oko 2%–3% specifična za svaki pojedini kromosom pa se na temelju toga mogu razlikovati. Iznimka su kromosomi 13 i 21 te 14 i 22, koji pokazuju veliku homologiju u građi  $\alpha$ -satelitne DNA-molekule pa je tom vrstom sondi nemoguće razlikovati te kromosome. Ta vrsta sondi daje vrlo jasan i intenzivan signal i na metafaznim kromosomima i u interfaznoj jezgri. Jasan signal posljedica je same veličine ciljane DNA čiji se sljedovi ponavljaju više puta<sup>14</sup>. Stoga je primjena tih sondi vrlo pogodna za detekciju promjena u broju kromosoma.<sup>13,15</sup>

### Sonde za cijeli kromosom ili za dio kromosoma

Sonde za cijeli kromosom ili za dio kromosoma sastavljene su od specifičnih i ponavljajućih sljedova koji potječu od cijelog kromosoma ili samo jednog dijela kromosoma pa je prema tome i fluorescentni signal vidljiv duž kromosoma ili samo jednoga njegova dijela. Ova vrsta sonde dobiva se mikrodisekcijom ili protočnim fluorescentnim sortiranjem specifičnog kromosoma iz hibridnih somatskih stanica te umnažanjem izolirane DNA-molekule specifičnom lančanom reakcijom polimeraze.<sup>15</sup> Primjenjuje se samo na metafaznim kromosomima jer je signal, zbog kondenziranosti interfaznog kromatina, nedovoljno jasan.<sup>15</sup> Njezini nedostaci očituju se u nepotpunoj hibridizaciji duž kromosoma, najčešće u području telomera i centromera, pa se može dogoditi da se njezinom upotrebom ne detektiraju promjene koje obuhvaćaju te dijelove kromosoma.<sup>14</sup>

### Sonde za mala područja eukromatina

Sonde za mala područja eukromatina hibridiziraju se na specifičan slijed DNA koja se ne ponavlja u genomu i može kodirati genski produkt. Sonda može sadržavati jedan gen ili fragment DNA poznate lokacije.<sup>14,24</sup> U tu grupu sonde ubrajaju se i *subtelomerne sonde* koje hibridiziraju s telomernim regijama kromosoma. Intersticijske ili telomerne delecije vrlo je teško detektirati standardnim tehnikama, posebno ako je odlomljeni dio kromosoma manji od 500 kb. Za detekciju upravo takvih promjena upotreba tih sonde potpuno nadopunjuje klasične metode oprugavanja kromosoma jer se njihovom primjenom detektiraju delecije veličine od 100 do 300 kb.<sup>14,25</sup> Danas se na tržištu mogu kupiti gotovi setovi subtelomernih sonde za istodobnu analizu telomernih regija svih kromosoma izuzevši telomer p krak akrocentričnih kromosoma. Studije u kojima su se upotrebljavali takvi setovi sonde za analizu telomernih regija u pacijenata s mentalnom retardacijom i prividno normalnim kariotipom, pokazuju da je u oko 23% takvih pacijenata prisutna skrivena telomerna promjena.<sup>26,27</sup> Ti rezultati upućuju na to da su promjene telomera najvjerojatnije drugi uzrok mentalne retardacije nakon Downova sindroma.<sup>28</sup>

## VIŠEBOJNA KARIOTIPIZACIJA

Osnovni princip fluorescentne *in situ* hibridizacije uključen je u metode višebojne kariotipizacije (engl. – multicolor karyotyping) kojom je omogućena analiza metafaznih kromosoma na razini cijeloga genoma u jednom postupku. Za potrebe višebojne kariotipizacije DNA-sonde mogu se obojiti različitom kombinacijom broja fluorokroma (engl. – combinatorial labeling) ili fluorokromima u različitim udjelima (engl. – ratio labeling), što rezultira bojenjem metafaznih kromosoma u 24

različite boje.<sup>29</sup> Istodobna upotreba oba načina obilježavanja sonde naziva se COBRA (engl. – combined binary ratio labelling).<sup>30</sup> Postoje dvije osnovne modifikacije te metode koje se razlikuju uglavnom u tehničkim rješenjima mjerenja spektra upotrijebljenih fluorescentnih boja, a to su: višebojna fluorescentna *in situ* hibridizacija i spektralna kariotipizacija.<sup>31</sup>

### Višebojna fluorescentna *in situ* hibridizacija

Višebojna fluorescentna *in situ* hibridizacija (engl. – multiplex FISH ili M-FISH) zasniva se na principu standardne metode fluorescentne *in situ* hibridizacije, uključujući kombinacijsko obilježavanje sonde te upotrebu nekoliko specifičnih filtera kojima je moguće razlikovati spektre fluorescentnih boja (od 350 nm do 770 nm).<sup>32</sup> Prvi rad u kojem se opisuje upotreba pet fluorokroma za kombinacijsko obilježavanje sonde, što rezultira bojenjem kromosoma u 24 različite boje, objavljen je 1996. godine.<sup>31,33</sup> Takav način obilježavanja sonde pokazao se nedovoljno senzitivnim u detekciji malih intrakromosomskih i interkromosomskih promjena. Azofeifa sa suradnicima dokazala je da senzitivnost i specifičnost ove metode izrazito ovisi o broju i rasporedu fluorokroma uzduž kromosoma.<sup>34</sup> Isti su autori za potrebe detekcije skrivenih translokacija napravili shemu obilježavanja sonde sa sedam fluorokroma, što je omogućilo bolju senzitivnost u detekciji navedenih promjena. Ova se metoda najčešće upotrebljava u svrhu razjašnjenja aberiranih kariotipova utvrđenih GTG-metodom oprugavanja kromosoma.<sup>29,33</sup>

Velik problem pri analizi kromosoma metodama klasične citogenetike stvara prisutnost marker-kromosoma koji se definira kao strukturno abnormalni kromosom (engl. – structurally abnormal chromosome – SAC) nepoznata kromosomskog podrijetla. Takav se kromosom pojavljuje kao prekobrojan u kariotipu pa ga često nazivaju i viškom strukturno abnormalnoga kromosomskog materijala (engl. – extra structurally abnormal chromosome – ESAC).<sup>13,38</sup> Kako se M-FISH-om svaki kromosom boji drugom bojom, boja marker-kromosoma omogućava određivanje njegova kromosomskog podrijetla. Katkad su marker-kromosomi toliko sitni da ne sadrže eukromatinski dio nego samo heterokromatinski materijal koji se ne može detektirati M-FISH metodom. Stoga je razvijena modifikacija te metode koja se temelji na upotrebi svih centromerno specifičnih DANN-sonde, a naziva se centromerno specifična višebojna fluorescentna *in situ* hibridizacija – *cenM-FISH*. U toj se metodi sonde obilježavaju s pet različitih fluorokroma i hibridiziraju se na metafazne kromosome u jednom koraku. Time je omogućena detekcija svih centromera, izuzevši centromer kromosoma 13 i 21 zbog njihove sličnosti. *CenM-FISH* se primjenjuje na preparate kromosoma s

urednim centromerama pa se stoga ne može iskoristiti za detekciju kromosomskog materijala bez centromerne regije.<sup>36,37</sup> Druga modifikacija M-FISH-a napravljena je poradi bolje detekcije marker-kromosoma koji potječu isključivo od akrocentričnih kromosoma, a to je *AcroM-FISH*. Ta metoda uključuje upotrebu specifične kombinacije sonde, i to sonde za cijele akrocentrične kromosome, centromerne sonde za kromosome 13/21, 14/22 i 15 te sonde za ribosomsku DNA-molekulu. Svaka je sonda obilježena drugom kombinacijom fluorokroma. Tom metodom može se detektirati oko 80% marker-kromosoma koji uglavnom potječu od kromosoma broj 15 i 22. Ostalih 20% potječe od drugih kromosoma koji se mogu detektirati nekom od metoda višebojne kariotipizacije. Ta se kombinacija sonde primjenjuje isključivo na metafazne kromosome.<sup>38</sup>

### Spektralna kariotipizacija

Prvi rad o spektralnoj kariotipizaciji (engl. – spectral karyotyping – SKY) pojavio se iste godine kada i rad o M-FISH-u.<sup>39</sup> Spektralna kariotipizacija zasniva se na kombinacijskom obilježavanju sonde koristeći i pet različitih fluorokroma. Svaki je kromosom obilježen jedinstvenom kombinacijom fluorokroma i emitira karakteristične valne duljine spektra na temelju kojih ih je moguće raspoznati. Interferometar i Fouierova analiza upotrebljavaju se za mjerenje spektra, a upotreba trostrukog filtra (engl. – Triple band-pass filter) omogućuje ekscitaciju i emisiju svih fluorokroma u isto vrijeme. Digitalna kamera povezana s interferometrom precizno determinira kompletnu krivulju spektra za svaki *pixel* istodobno pa se tako može diferencirati svaki fluorokrom, bez obzira na to što im se spektri mogu preklapati. Kompjutorska programska podrška omogućuje translaciju spektra u jedinstvenu boju svakog kromosoma.<sup>32,29,40</sup> Ova metoda omogućava mjerenje i analizu signala slabijeg inteziteta nastalog kao posljedica loše hibridizacije, ali je isto tako moguća i detekcija signala nastalih nespecifičnom hibridizacijom.<sup>41,42</sup> Ta je činjenica bitna kad je riječ o slučajevima s minimalnom količinom materijala za analizu te potrebi da se u što kraćem vremenu dobije što više preciznih informacija. Ova je metoda veliku primjenu našla u citogenetici tumora i preimplantacijskoj genetici.<sup>43</sup> Zbog dobre senzitivnosti u detekciji različitih interkromosomskih promjena, aneuploidija te marker-kromosoma, spektralna kariotipizacija uvelike se upotrebljava i u kliničkoj citogenetici.<sup>42,39</sup> Princip istodobne detekcije svih metafaznih kromosoma primijenjen je i u detekciji parcijalnog kariotipa interfazne jezgre limfocita periferne krvi, amniocita i blastomera. Time je omogućena detekcija 70% numeričkih promjena kromosoma, koje se najčešće detektiraju u spontano pobačenih plodova, a vezane su za kromosome 9, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22, X i Y.<sup>43</sup>

### Višebojno oprugavanje kromosoma

Klasične metode oprugavanja kromosoma kao ni metode višebojne kariotipizacije nisu dovoljno senzitivne u detekciji malih intrakromosomskih i interkromosomskih promjena. Detekciju takvih promjena omogućuje metoda višebojnog oprugavanja kromosoma (engl. – high resolution multicolor-banding).<sup>43</sup> Njezinu prvu primjenu opisao je Chudoba sa suradnicima na primjeru precizne detekcije točaka loma kod delecije i inverzije kromosoma broj 5, koje nije bilo moguće detektirati GTG-metodom.<sup>44</sup> Za hibridizaciju je upotrijebio sonde dobivene mikrodisekcijom kromosomskih segmenata, obilježene s pet fluorokroma u različitim kombinacijama. Time je diferencirao specifične regije kromosoma na razini pruga i potpruga i to na temelju produkcije različitog inteziteta fluorescencije duž kromosoma. Liehr sa suradnicima konstruirao je biblioteku specifičnih sonde dobivenih mikrodisekcijom,<sup>45</sup> koja pokriva čitav genom i rezultira višebojnim oprugavanjem svih humanih kromosoma u jednom koraku, što odgovara rezoluciji od 450 do 500 pruga dobivenih klasičnim metodama oprugavanja.

### RxFISH

Metoda višebojnog oprugavanja kromosoma kod koje se sonde dobivaju izolacijom kromosomskih fragmenta gorile je metoda RxFISH (engl. – cross-species color banding).<sup>45</sup> Hibridizacija takvih sonde na kromosome čovjeka moguća je zbog homologije (98%) u građi DNA-molekule između tih dviju vrsta. Najčešće se upotrebljava u analizama kromosomskih promjena u tumorskim stanicama, zajedno sa standardnom metodom oprugavanja kromosoma (GTG-metoda). Kombinacijom tih dviju tehnika dobiva se dovoljna rezolucija za detekciju većine kromosomskih promjena koje se događaju u toj vrsti stanica.<sup>13,32,46</sup>

### KOMPARATIVNA HIBRIDIZACIJA GENOMA

Komparativna hibridizacija genoma (engl. – comparative genomic hybridization – CGH) modificirana fluorescentna *in situ* hibridizacijska tehnika kojom je moguće detektirati duplikacije i delecije kromosoma na razini cijeloga genoma. Obilježena test-DNA, izolirana iz tkiva pacijenta, miješa se s različito obilježenom referentnom DNA-molekulom izoliranom iz tkiva normalnog muškarca. Obje DNA-molekule u istim omjerima kohibridiziraju se na kromosomske preparate s normalnim humanim metafaznim kromosomima.<sup>47</sup> Upotrebom fluorescentnog mikroskopa, digitalne kamere te kompjutorske programske podrške mjeri se udio intenziteta fluorescencije test i referentne DNA-molekule duž svakog kromosoma. Ovom metodom uspješno se detektiraju delecije veličine od 10 do 12 Mb.<sup>48-50</sup>) Kirchoff sa

suradnicima uspješno je detektirala delecije čak od 3 do 5 Mb kod Prader-Willijeva i Angelmanova sindroma.<sup>51</sup> Ovom metodom moguća je analiza aneuploidija iz samo jedne stanice ili vrlo malog broja stanica, što je od velikog značenja u preimplantacijskoj i prenatalnoj dijagnostici.<sup>52,53</sup> Ozcan T. sa suradnicima potvrđuje uspješnost ove metode i u detekciji aneuploidija pri analizi fetoplacentarnog tkiva uklopljenog u parafinske kockice.<sup>54</sup> Kultivacija stanica tumorskih tkiva i pobačenih plodova često rezultira slabim rastom te lošom kvalitetom kromosoma, što otežava analizu klasičnim metodama oprugavanja kromosoma.<sup>55,54,57</sup> Ovom metodom mogu se uspješnije analizirati kromosomske promjene upravo u takvim kulturama. Tako je analizom nedovoljno kvalitetnih kultura spontano pobačenih plodova dokazana veća incidencija trisomije 1, 7, 16, 21 i 22, kao i veća učestalost svih kromosomskih promjena (72%) nego što je to dokazano klasičnim metodama analize kromosoma.<sup>58</sup> Zahvaljujući razvoju ove metode, moguće je otkriti skrivene translokacije u osoba s mentalnom retardacijom i urednim kariotipom detektiranim GTG-metodom.<sup>49</sup> Metodom komparativne hibridizacije genoma mogu se odrediti točke loma kod malih interkromosomskih i intrakromosomskih promjena, što se metodama višebojne kariotipizacije ne može. Usprkos brojnim prednostima, CGH pokazuje nedovoljnu senzitivnost u detekciji balansiranih intrakromosomskih i interkromosomskih promjena.<sup>59</sup> Isto tako, CGH je nedovoljno precizna za detekciju područja kromosoma, koja uključuju ponavljajuće redosljede baza kao što su heterokromatinske regije kromosoma 1, 9, 16 i Y te centromerne regije akrocentričnih kromosoma i telomere. Udio fluorescencije u tim regijama često pokazuje devijacije te se u interpretaciji nalaza isključuju. To je najvjerojatnije povezano s nejednakom denaturacijom i hibridizacijom različitih regija kromosoma, što se prije svega odnosi na regije bogate GC-parovima baza.<sup>59</sup> Neki autori pokazuju da se ova metoda ipak može uspješno primijeniti u detekciji skrivenih telomernih translokacija koje se ne mogu detektirati GTG-metodom oprugavanja kromosoma, kao što je to slučaj u mentalno retardiranih osoba.<sup>60,61</sup> Upotreba CGH-čipova (engl. – array CGH) uvelike će povećati osjetljivost ove metode. Ta nova tehnologija omogućit će detekcije duplikacija i delecija i od 100-tinjak kb<sup>62</sup>.

## PRINS

PRINS (engl. – primed in situ synthesis) brza je i senzitivna metoda za detekciju specifičnog slijeda nukleotida u DNA-molekuli. Metoda se zasniva na lančanoj reakciji polimeraze koja ima samo jedan ciklus, koristeći se specifičnom početnicom i obilježenom otopinom nukleotida.<sup>63</sup> To je pouzdana, jednostavna i

brza metoda kojom se može nadoknaditi nedovoljna senzitivnost centromernih sonda u detekciji kromosoma 13 i 21 jer specifične početnice s velikom senzitivnošću razlikuju ponavljajuće sljedove DNA-molekule u području centromera tih kromosoma.<sup>64-66</sup> Veličina početnica kreće se od 18 do 30 bp pa su vrlo pogodne za detekciju kromosoma u spermijima čovjeka. Za razliku od hibridizacije sonda u FISH-u, hibridizacija PRINS-početnica uspješnija je bez obzira na kondenziranost DNA-molekule.<sup>67,68</sup> Isto tako je senzitivna u detekciji delecija unutar jednoga gena jer se početnice mogu vezati za komplementarni slijed nukleotida veličine 18 do 20 bp, kao što je dokazano u slučaju detekcije delecija u genu za distrofin.<sup>69</sup> FISH i PRINS-metoda pokazuju istu senzitivnost u detekciji delecije jedne kopije gena, no prednost PRINS-metode očituje se u jednostavnosti njezine primjene i brzini dobivanja rezultata.<sup>70,71</sup> Ovisno o protokolu, rezultati FISH-a mogu se dobiti najbrže za 24 sata, a PRINS-metodom za dva do tri sata. Zbog svih tih prednosti, PRINS-metoda se vrlo brzo raširila u citogenetičkim laboratorijima kao nadopuna klasičnim metodama analize kromosoma. Upotrebljava se za detekciju marker-kromosoma<sup>64,72</sup>, za detekciju kromosomskih promjena u tumorskim stanicama<sup>70</sup> i tkivima spontano pobačenih plodova<sup>73</sup> te oštećenjima kromosoma nastalih kao posljedica djelovanja kemijskih i fizičkih mutagena.<sup>74</sup> S obzirom na pouzdanost, jednostavnost i brzinu, ova bi metoda u budućnosti mogla potisnuti FISH.

## MIKRODISEKCIJA I REVERZNO BOJENJE KROMOSOMA

Mikrodisekcija (engl. – microdissection) metoda je kojom se izrezuje cijeli ili dio opruganog kromosoma (npr. GTG-pruge). Izrezivanje se izvodi s pomoću mikromanipulatora sa silikoniziranom staklenom iglom uz uporabu invertnog mikroskopa. Izrezani dio umnožava se lančanom reakcijom polimeraze koristeći degenerirane oligonukleotidne početnice. Umnoženi fragmenti obilježavaju se fluorokromom te se hibridiziraju na metafazne kromosome normalne diploidne stanice, što se naziva reverznim bojenjem kromosoma (engl. – reverse chromosome painting).<sup>13,48,75</sup> Mikrodisekcijom kromosomskih preparata dobivaju se sonde koje služe za potrebe FISH-a i višebojnog oprugavanja kromosoma. Uz to, ova metoda primjenjuje se i za potrebe mapiranja i izolacije gena te za detekciju kromosomskih promjena. Od svih opisanih metoda, mikrodisekcija i reverzno bojenje kromosoma najbolja su kombinacija metoda za detekciju marker-kromosoma jer je njihovom upotrebom moguće identificirati marker-kromosom bilo kojega podrijetla.<sup>76,77,79</sup>

## ZAKLJUČAK

Djelovanje citogenetičkog laboratorija na početku 21. stoljeća nezamislivo je bez mogućnosti primjene metoda molekularne citogenetike. No to ne znači da te metode potpuno zamjenjuju metode klasične citogenetike već su njihova nadopuna ili logičan i nuždan nastavak. Nažalost, ni molekularno citogenetičke metode nisu uvijek dovoljno senzitivne za pojedine kromosomke aberacije pa je nužno pravilno odabrati i kombinirati pojedine tehnike kako bi se najpreciznije i najbrže obavila analiza. Moderno organiziran citogenetički laboratorij bi stoga, uz tehniku klasične citogenetike, morao imati i tehniku FISH-a, kao i jednu od metoda višebojne kariotipizacije (M-FISH ili SKY). Uz mogućnost primjene CGH-a bila bi ostvarena, prema današnjim standardima, gotovo idealna analiza kariotipova.

## LITERATURA

1. Tijo JH, Levan A. The chromosome number of man. *Am J Obstet Gynecol* 1956; 130:723-724.
2. Verma RS, Babu A. Tissue culture techniques and chromosome preparation U: Verma RS, Babu A. Human chromosomes - manual of basic technique. Pergamon press, 1989: 6-19.
3. Therman E, Susman M. Human chromosomes, 3rd ed. New York: Springer-Verlag 1993.
4. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 1960; 20: 613-616.
5. Hsu TC. Mammalian chromosomes in vitro I. The karyotype of man. *J Hered* 1952; 43:167-172.
6. Lejeune J, Gautier M, Turpin MR. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *C R Acad Sci (Paris)* 1959; 248: 1721-1722.
7. Seabright M. Rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet II* 1971; 971.
8. Parude ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969; 64:600-604.
9. John H, Birnstiel M, Jones K. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 1969; 223:582-587.
10. Rabin M, Watson M, Backer PE, Ryan J, Breg WR, Ruddle FH. NRAS transforming gene maps to region p11-p13 on chromosome 1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1984; 38:70-72.
11. Jhanwag SC, Neel BG, Hayward WS, Chahanti RS. Localization of the cellular oncogenes ABL, SIS and Fes on human germ-line chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1984; 38:73-75.
12. Schroeder WT, Lopez LC, Harper ME, Saunders GF. Localization of the human glaucon gene (GCG) to chromosome segment 2q36-37. *Cytogenet Cell Genet* 1984; 38:76-79.
13. Blancato JK. Fluorescence in situ hybridization U: Gersen SL, Keagle MB. The principles of clinical cytogenetics. Totowa New Jersey: Humana Press 1999; 443-473.
14. Carpenter NJ. Molecular cytogenetics. *Seminars in pediatric neurology* 2001; 8: 135-146.
15. Trask BJ. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nature rev Genetics* 2002; 3: 769-778.
16. Reddy KS, Mak L. Mosaic unbalanced structural abnormalities confirmed using FISH on buccal mucosal cells. *Ann Genet* 2001; 44:37-40.
17. Miny P, Tercanli S, Holzgreve W. Developments in laboratory techniques for prenatal diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2002; 14:161-168.
18. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:2934-2938.
19. Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, Manueldis L. Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum Genet* 1988; 80:235-246.
20. Lichter P, Cremer T, Borden J, Manueldis L, Ward DC. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 1988; 80:224-234.
21. Estabrooks L, Lamb AN. Prenatal interphase fluorescence in situ hybridization (FISH). *Contemporary Ob/Gyn* 2000; 7:68-87.
22. Moore GE, Ruangvutliert P, Chatzimeletiou K, Bell G, Chen CK, Jonson P, Harper JC. Examination of trisomy 13,18,21 fetal tissues at different gestational ages using FISH. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 223-228.
23. Teixeira MR. Combined classical and molecular cytogenetic analysis of cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38:1580-1584.
24. Minoshima S. Mapping of the gene for human xanthine dehydrogenase XDH to band p23 of chromosome 2. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 68: 52-53.
25. Knight SJL, Lese CM, Precht KS. An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am J Hum Genet* 2000; 67:320-332.
26. Riegel M, Baumer A, Jamar M, Delbecque K, Herens C, Verloes A, Schinzel A. Submicroscopic terminal deletions and duplications in retarded patients with unclassified malformation syndromes. *Hum Genet* 2001; 109: 286-294.
27. Joyce CA, Dennis NR, Cooper S, Browne CE. Subtelomeric rearrangements: results from a study of selected and unselected probands with idiopathic mental retardation and control individuals by using high-resolution G-banding and FISH. *Hum Genet* 2001; 109: 440-451.
28. Knight SJL, Lese CM, Precht KS (2000) An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am J Hum Genet* 67:320-332
29. Lichter P. Multicolor Fishing: what's the catch? *Trends Genet* 1997; 13:475-479.
30. Tanke HJ, Wiegant J, Van Gijlswijk RPM, Bezrookove V, Petteiner H, Heetebrij RJ, Talman EG, Raap AK, Vrolijk J. New strategy for multi-colour fluorescence in situ



- hybridization: COBRA: Combined Binary Ratio labeling. *Eur J Hum Genet* 1999; 7: 2-11
31. Speicher M, Ward D. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genet* 1996; 12: 368-375.
  32. Fauth C, Speicher MR. Classifying by coloros: FISH-based genome analysis. *Cytogenet Cell Genet* 2001; 93: 1-10.
  33. Gorinati M, Caufin D, Minelli A, Memo L, Gaspardo G, Dodero A. Inv dup (8) (p21.1@22.1): further case report and a new hypothesis on the origin of the chromosome abnormality. *ClinGenet* 1991; 39: 55-9
  34. Azofeifa J, Fauth C, Kraus J, Maierhofer C, Langer S, Bolzer A, Reichman J, Schuffenhauer S, Speicher MR. An optimized probe set for the detection of small interchromosomal aberrations by use of 24-color FISH. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1684-1688.
  35. Bui H, Blennow E, Nordenskjold M. Prenatal diagnosis: molecular genetics and cytogenetics. *Best practice & research clin obstetric gynecology* 2002; 16: 629-643.
  36. Liehr T, Nietzl A, Strake H, Heller A, Weise A, Mrasek K, Claussen U. Characterization of small human marker chromosomes by centromere-specific multicolor-FISH (cen-FISH) and high resolution multicolor banding (MCB). *ECA newsletter* 2002; 10: 4-8.
  37. Nietzel A, Rocchi M, Strake H, Heller A, Fiedler W, Włodarska I, Loncarevic IF, Beensen V, Claussen U, Liehr T. A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). *Hum Genet* 2001; 108: 199-204.
  38. Langer S, Fauth C, Rocchi M, Murken J, Speicher MR. AcroM fluorescent in situ hybridization analyses of marker chromosome. *Hum Genet* 2001; 109: 152-158.
  39. Schrock E, Du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Garini Y, Soenksen D, Ried T. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996; 273: 494-49.
  40. Schrock E, Veldman T, Ning Y. Spectral karyotyping refines cytogenetic diagnostics of constitutional chromosomal abnormalities. *Hum Genet* 1997; 101: 255-262.
  41. Rothmann C, Bar-Am I, Malik Z. Spectral imaging for quantitative histology and cytogenetics. *Histol Histopathol* 1998; 13: 921-926.
  42. Fung J, Weier HUG, Goldberg JD, Pedersen RA. Multilocus genetic analysis of single interphase cells by spectral imaging. *Hum Genet*. 2000; 107: 615-622.
  43. Applied spectral-imaging. SKYvs.M-FISH Comparison. DGS/rev. 1998.
  44. Wienberg J, Muller S. Chromosome bar codes: defining karyotypes with molecular tags by multi color FISH. *ECA newsletter* 2002; 9: 3-7.
  45. Wienberg J, Muller S. Chromosome bar codes: defining karyotypes with molecular tags by multi color FISH. *ECA newsletter* 2002; 9: 3-7.
  46. Chudoba I, Plesch A, Lemke J, Claussen U, Senger G. High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1999; 84: 156-160.
  47. Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, Claussen U. Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. *In J Mol Med* 2002; 9: 335-339.
  48. Xu J, Chen Z. Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation. *Am J Med Genet* 2003; 117C: 15-24.
  49. Du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schrock E, Popp S, Dohner H, Kovacs G, Nicoud MR, Lichter P, Cremer T. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* 1993; 90: 590-610.
  50. Fauth C, Speicher MR. classifying by coloros: FISH-based genome analysis. *Cytogenet Cell Genet* 2001; 93: 1-10.
  51. Kirchhoff M, Rose H, Maahr J, Gerdes T, Bugge M, Tommerup N, Tumer Z, Lespinasse J, Jensen PKA, Wirth J, Lundsteen C. High resolution comparative genomic hybridization analysis reveal imbalances in dyschromosomal patients with normal or apparently balanced conventional karyotypes. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 661-668.
  52. Kirchhoff M, Rose H, Gerdes T, Lundsteen C (2001) Screening for submicroscopic chromosomal imbalances by comparative genomic hybridization. *ECA newsletter* 8: 3-7
  53. Tonnies H, Stumm M, Wegner RD, Chudoba I, Kalscheuer V, Neitzel H. Comparative genomic hybridization based strategy for the analysis of different chromosome imbalance detected in conventional cytogenetic diagnostic. *Cytogenet Cell Genet* 2001; 93: 188-194.
  54. Ozcan T, Burki N, Parkash V, Huang X, Pejovic T, Ward DC. Cytogenetical diagnosis in paraffin-embedded fetoplacental tissue using comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn* 2000; 20: 41-44.
  55. Voullaire L, Slater H, Williamson R, Wilton L. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet* 2000; 106: 210-217.
  56. Voullaire L, Slater H, Wilton L, Williamson R. Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn* 1999; 19: 846-851.
  57. Lomax B, Tang S, Separovic E, Phillips D, Hillard E, Thomson T, Kalousek D.K. Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1516-1521.
  58. Fritz B, Hellermann C, Oltert J, Fuchs B, Bruns M, Aslan M, Schmidt S, Coerdts W, Muntefering H, Rehder H. Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridization – Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions. *Eur J Hum Genet* 2001; 9: 539-547.
  59. Ozaki T. Chromosomal alternations in osteosarcoma cell lines revealed by CGH and multicolor karyotyping. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 140: 145-152.
  60. Wang N. Methodologies in cancer cytogenetics and molecular cytogenetics. *Am J Med Genet (Semin Med Genet)* 2002; 115: 118-124.

61. Tachdjian G, Aboura A, Lapierre JM, Viguie F. Cytogenetic analysis from DNA by comparative genomics hybridization. *Ann Genet* 2000; 43: 147-154.
62. Joly G, Lapierre JM, Ozilou C, Gosset P, Aurias A, de Blois MC, Prieur M, Raoul O, Colleaux L, Munnich A, Romana SP, Vekemans M, Turleau C. Comparative genomic hybridization in mentally retarded patients with dysmorphic features and normal karyotype. *Clin Genet* 2002; 60:212-219.
63. Yaron Y, Carmon E, Golstein M, Voskobolnik N, Ochshorn Y, Gelman-Kohan Z, Orr-Urtreger A. The clinical application of spectral karyotyping (SKY) in the analysis of parentally diagnosed extra structurally abnormal chromosomes (ESACs). *Prenat Diagn* 2003; 23:74-79.
64. Veltman JA, Schoenmakers EFPM, Eussen HB, Janssen I, Merckx G, van Cleef B, van Ravenswaaij M, Brunner HG, Smeets D, van Kessel AG. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array based comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet* 2002; 70:1269-1276.
65. Gosden J, Lawson D. Instant PRINS: a rapid method for chromosome identification by detecting repeated sequences in situ. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 68:57-60.
66. Hindkjaer J, Koch JK, Ivaraa S, Bolund L. Primed in situ labeling (PRINS) as a rational procedure for identification of marker chromosomes using a panel of primers differentially tagging the human chromosomes. *Clin Genet* 1996; 50:437-441.
67. Pellestor F, Girardet A, Lefort G, Andreo B, Charlieu JP. Use of the primed in situ labeling (PRINS) technique for rapid detection of chromosomes 13,16,18,21,X and Y. *Hum Genet* 1995; 95:12-17.
68. Pellestor F, Quenesson I, Coignet L, Girardet A, Andreo B, Lefort G, Charlieu JP. FISH and PRINS, a strategy for rapid chromosome screening: application to the assessment of aneuploidy in human sperm. *Cytogenet Cell Genet* 1996; 72:34-36.
69. Pellestor F, Coignet L, Girardet A, Andreo B, Lefort G, Charlieu JP. Assessment of aneuploidy for chromosomes 8,9,13,16, and 21 in human sperm by using primed in situ labeling technique. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 797-802.
70. Pellestor F, Imbert I, Andreo B. Rapid chromosome detection by PRINS in human sperm. *Am J Med Genet* 2002; 107:109-114.
71. Chudoba I, Plesch A, Lemke J, Claussen U, Senger G. High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1999; 84: 156-160.
72. Tharapel SA, Kadandele JS. Primed in situ labeling for evaluation of gene deletions in cancer. *Am J Med Genet* 2000; 107:123-126.
73. Tharapel AT, Kadandele JS, Martens PR, Wachtel SS, Wilroy Jr SR. Prader Willi/Angelman and DiGeorge/Velocardiofacial Syndrome deletions: Diagnosis by primed in situ labeling (PRINS). *Am J Med Genet* 2000; 107:119-122.
74. Velagaleti GVN, Tharapel AT, Kadandele JS, Martens PR, Tharapel SA. Rapid identification of marker chromosomes using PRINS. *Am J Med Genet* 1997; 71:130-133.
75. Rabin M, Watson M, Backer PE, Ryan J, Breg WR, Ruddle FH. NRAS transforming gene maps to region p11-p13 on chromosome 1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1984; 38:70-72.
76. Russo A. Prins tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage. *Am J Med Genet* 2002; 107:99-104.
77. Senger G, Ludecke HJ, Horsthemake B, Claussen U. Microdissection of banded human chromosomes. *Hum Genet* 1990; 84:507-511.
78. Frederich U. Microdissection - a precise method to disclose the parental origin of supernumerary marker chromosomes. *Ann Genet* 2000; 43: 109-110.
79. Rothlisberger B, Shinzel A, Kotzot D. A new molecular approach to investigate origin and formation of structural chromosome aberrations. *Chrom Res* 2000; 8:451-453.