

**DETEKCIA RECIPROČNYCH TRANSLOKÁCIÍ CHROMOZÓMOV
AKO INDIKÁTOROV EXPOZÍCIE ORGANIZMOV IONIZUJÚCEMU
ŽIARENÍU METÓDOU FISH-WCP.**

**DETECTION OF RECIPROCAL CHROMOSOME TRANSLOCATIONS
AS AN INDICATOR OF ORGANISM EXPOSURE TO IONIZING
RADIATION BY FISH-WCP METHOD.**

**Beáta Holečková, Katarína Šiviková, Ján Dianovský, Elena Piešová, Martina
Lakatošová,**

Ústav genetiky, Univerzita Veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice,
Slovenská republika
holeckova@uvm.sk

ABSTRACT

Chromosome translocations are considered to be the gold standard for assessing ionizing radiation exposure. Because translocations are inherently more stable through cell division than dicentrics, translocations have become the aberration of choice for evaluating many types of exposure. Fluorescence *in situ* hybridization with whole chromosome painting probes (FISH-WCP) has been shown to be a rapid method of detecting chromosomal rearrangements, and appears to be especially useful for analysis of induced translocations. The present paper shortly describes FISH-WCP method for detection of reciprocal translocations as indicators of exposure to ionizing radiation.

Key words: ionizing radiation, translocations, fluorescent *in situ* hybridization

ÚVOD

Poruchy molekulovej štruktúry a funkcie DNA patria medzi najvýznamnejšie zmeny, ktoré je možné zaznamenať v bunkách organizmov vystavených účinku mutagénov. Poškodenia genetického materiálu môžu viesť k narušeniu ultraštruktúry a organizácie chromozómov, ovplyvňujúcej delenie a životaschopnosť buniek.

Chromozómové aberácie sú vo všeobecnosti definované ako štruktúrne zmeny chromozómov, podmienené zlomami a následným spojením alebo výmenami nehomologických častí chromozómov. Dôsledkom zlomov môže byť strata častí chromozómu, alebo chybné spojenie, pri ktorom dochádza ku zmenám obsahu genetického materiálu v bunke alebo zmenám lokalizácie celých väzbových skupín génov.

Molekulové mechanizmy vzniku chromozómových aberácií nie sú doposiaľ úplne známe. Predpokladá sa, že tvorba chromozómových aberácií je zložitý proces, úzko súvisiaci s bunkovými mechanizmami reparácie, replikácie a rekombinácie (Obe et al., 2002).

Chromozómové aberácie sú považované za dôležitý biomarker expozície ľudí a zvierat ionizujúcim žiarením a genotoxickým látkam (Natarajan, 2002). Ionizujúce žiarenie, patrí ku fyzikálnym klastogénom, indukujúcim chromozómové aberácie. Na rozdiel od UV žiarenia je absorbované všetkými bunkovými komponentami, preto je poškodenie DNA po takomto type ožiarenia komplexné a jeho kvantifikácia zložitá.

RECIPROČNÉ TRANSLOKÁCIE

Translokácie sú výmeny častí úsekov medzi chromozómami (homologickými alebo nehomologickými). Translokácie patria medzi stabilné typy aberácií, čo znamená, že vo väčšine prípadov vážne nenarušujú bunkové delenie a môžu tak v organizme pretrvávajú mnoho rokov. V súčasnosti sa predpokladá, že ich vznik je podmienený chybami pri reparácii poškodenej DNA (Obe et al., 2002).

Pri jednoduchej translokácii ide o prenos určitého segmentu z jednej lokalizácie na inú, pričom sa tento prenos uskutoční buď v rámci toho istého chromozómu, alebo medzi homologickými, či nehomologickými chromozómami.

Pri recipročných translokáciách ide o vzájomnú výmenu dvoch segmentov medzi homologickými alebo nehomologickými chromozómami. Keďže nedochádza k zmnoženiu ani strate genetického materiálu, označujú sa tieto translokácie ako balansované (vyvážené). Polohový efekt (odlišná poloha génov na inom chromozóme) však môže byť príčinou abnormálnej expresie translokovaných génov. Translokované alebo fúzne gény sú často príčinou vzniku nádorových ochorení alebo iných zdravotných komplikácií.

Pri niektorých typoch recipročných translokácií vznikajú dicentrické chromozómy a acentrické fragmenty. Táto časť recipročných aberácií patrí ku nebalansovaným (nevyváženým) translokáciám, ktorých následkom sú odchýlky v klinickom obraze.

Rrecipročné translokácie (balansované) sú kľúčovým typom aberácií prítomných v raných štádiách karcinogenézy, u hematologických malignít ako aj u solídnych tumorov (Mitelman et al., 2004). Bolo dokázané, že ich počet v periférnych lymfocytoch ožiarených organizmov je proporcionálny ku expozícii ionizujúcemu žiareniu v nízkych dávkach. Ďalšou významnou vlastnosťou recipročných translokácií je, že ich frekvencia v humánnych lymfocytoch je relatívne stabilná v čase (Lucas, 1989). Z uvedených dôvodov sú recipročné translokácie významným indikátorom expozície organizmov ionizujúcemu žiareniu a dôležitým cytogenetickým biomarkerom využívaným v štandardnej a retrospektívnej biologickej dozimetrii (Finnon et al., 1995, Tucker et al., 1995, Tucker et al., 2005a, Tucker et al., 2005b).

FISH-WCP

Balansované recipročné translokácie je obtiažne detegovať klasickými cytogenetickými metódami ako je konvenčné farbenie a GTG pruhovanie chromozómov. V súčasnosti sa na ich vizualizáciu používa metóda fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) s celochromozómovými sondami (whole chromosome probes), niekedy nazývaná FISH-WCP. Táto metóda bola úspešne použitá v rokoch 1992-1999 pri sledovaní

frekvencie translokácií chromozómov v cirkulujúcich lymfocytoch pracovníkov ožiarených pri likvidácii havárie v Černobyle. Princípom FISH-WCP je príprava vhodných celochromozómových DNA sond (prietoková cytometria, mikrodisekcia, laserová mikrodisekcia, DOP-PCR) a ich označenie fluorochrómom. Celochromozómové sondy hybridizujú k vopred denaturovaným preparátom s metafázami chromozómov na princípe komplementarity s cieľovými sekvenciami chromozómov. Aberácie chromozómov sú vizualizované pomocou fluorescenčného mikroskopu s jednoduchými, duálnymi alebo trojitými filtrami, takže chromozómy s vymenenými úsekmi sú viditeľné ako dvojfarebné, resp. viacfarebné. Metafázy s aberáciami sú fotografované pomocou digitálnej CD kamery a vyhodnocované pomocou PAINT systému (Tucker et al., 1995) a špeciálneho softwaru (LUCIA FISH, ISI Metasystem, MeSyS).

Medzi najväčšie výhody metódy FISH-WCP patrí možnosť detegovania stabilných aberácií (translokácií) paralelne s nestabilnými aberáciami chromozómov (dicentrické chromozómy) (Bonassi et al., 2005). Paralelná identifikácia translokácií a dicentrických chromozómov metódou FISH umožňuje vyhodnocovanie aktuálnych expozícií organizmov ionizujúcemu žiareniu, expozícií spred viacerých rokov, ako aj vyhodnocovanie vplyvu nižších dávok žiarenia v porovnaní so staršími konvenčnými cytogenetickými metódami.

LITERATÚRA

- 1. Bonassi, S., Ugolini, D., Kirsch-Volders, M., Strömberg, U., Vermeulen, R., Tucker, J. D., 2005:** Human population studies with cytogenetic biomarkers: Review of the literature and future perspectives. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45, 258-270
- 2. Finnon, P., Lloyd, D. C., Edwards, A. A., 1995:** Fluorescence *in situ* hybridization in human lymphocytes: applicability to biological dosimetry. *Int. J. Radiat. Biol.*, 68, 429-435
- 3. Lucas J. N., Tenjin, T., Straume, T., Pinkel, D., Moore, D., Litt, M., Gray, J. W., 1989:** Rapid human chromosome aberration analysis using fluorescence *in situ* hybridization. *Int. J. Radiat. Biol.*, 56, 35-44
- 4. Mitelman, F., Johansson, B., Mertens, F., 2004:** Fusion genes and rearranged genes as a linear function of chromosome aberrations in cancer. *Nat. Genet.*, 36, 331-334

- 5. Natarajan, A. T., 2002:** Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutat. Res.*, 504, 3-16
- 5. Obe, G., Pfeiffer, P., Savage, J. R. K., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesem, P., Natarajan, A. T., martínez-López, W., Folle, G. A., Drets, M. EW., 2002:** Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat. Res.*, 504, 17-36
- 6. Tucker, J. D., Morgan, W. F., Awa, A. A., Bauchinger, M., Blakey, D., Cornforth, M. N., Littlefield, G. L., Natarajan, A. T., Shasserre, C., 1995:** A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting. *Cytogenet. Cell Genet.*, 68, 211-221
- 7. Tucker, J. D., Cofield, J., Matsumoto, K., Ramsey, M. J., Freeman, D. C., 2005a:** Persistence of chromosome aberrations following acute radiation: I, PAINT translocations, dicentrics, rings, fragments and insertions. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45, 229-248
- 8. Tucker, J. D., Cofield, J., Matsumoto, K., Ramsey, M. J., Freeman, D. C., 2005b:** Persistence of chromosome aberrations following acute radiation: II, Does it matter how translocations are scored? *Environ. Mol. Mutagen.*, 45, 249-257