

Analiza sekvenci kromosoma Y u Turnerovom sindromu

Juretić, Nestija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:787284>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Nestija Juretić

Analiza sekvenci kromosoma Y u Turnerovom sindromu
Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen u laboratoriju Zavoda za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Petre Korać i Odjelu za laboratorijsku citogenetiku Klinike za ginekologiju i porodništvo Kliničke bolnice „Sveti Duh“ u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Feodore Stipoljev. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvaljujem se iznimnim mentoricama izv. prof. dr. sc. Petri Korać i izv. prof. dr. sc. Feodori Stipoljev na stručnom vodstvu te svom vremenu, strpljenju, razumijevanju i trudu uloženom mene i u ovaj rad.

Posebnu zahvalu želim uputiti najvažnijoj osobi u mom životu, mom temelju, mom sidru,
mojoj Majci Iris Juretić.

Hvala Majko za sve što je prethodilo ovom radu, hvala za svu potporu pruženu tijekom izrade ovog rada i unaprijed hvala za sve ono što tek dolazi. Hvala za svako 'Ajde' koje sam do sada čula i za svako koje tek trebam čuti. Hvala što baš uvijek vjeruješ u mene i što si uvijek, bez iznimke i uvjeta, uz mene. Svjesna sam da sam sretna, najsretnija, što imam
Tebe za Majku.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

ANALIZA SEKVENCI KROMOSOMA Y U TURNEROVOM SINDROMU

Nestija Juretić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U ovom diplomskom radu učinjena je analiza uzoraka spontano pobačenih plodova kod kojih je citogenetičkom analizom utvrđen Turnerov sindrom (45,X ili 45,X/46,XX) s ciljem utvrđivanja prisutnosti sekvenci Y-kromosoma. Ukupno su analizirana 23 uzorka metodom lančane reakcije polimerazom. Hipoteza rada je bila da su rani prekidi trudnoće kod kariotipa specifičnog za Turnerov sindrom izazvani razvojnim mehanizmima u kojima ulogu imaju sekvence Y-kromosoma prisutne u genomu ploda. Analizirano je 8 sekvenci Y-kromosoma (*SRY*, *PABY*, *TSPY*, *HSFY*, *DDX3Y*, *AMXY*, *DYZ1* i *DYZ3*). Kod 13% plodova s Turnerovim sindromom utvrđena je prisutnost neke od sekvenci Y-kromosoma.

(55 stranica, 25 slika, 8 tablica, 85 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: PCR, DNA, posteljica, kultura stanica, plodova voda

Voditelj 1: dr. sc. Petra Korać, izv. prof.

Voditelj 2: dr. sc. Feodora Stipoljev, izv. prof.

Ocjenitelji: dr. sc. Petra Korać, izv.prof.;

dr. sc. Ana Galov, izv. prof.;

dr. sc. Goran Kovačević, izv.prof.

Rad prihvaćen: 1. ožujka 2018. godine.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

ANALYSIS OF THE Y CHROMOSOME SEQUENCES IN TURNER SYNDROME

Nestija Juretić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

In this graduation thesis, analysis of samples of spontaneously aborted fetuses with cytogenetically established Turner syndrome karyotype (45,X or 45,X/46,XX) was made and the aim of the study was to determine the presence of Y chromosome sequences in those samples. A total of 23 test samples were analyzed using polymerase chain reaction. The hypothesis of this study was that early spontaneous termination of the pregnancy with Turner syndrome specific karyotype may have been caused by the mechanisms of development in which the sequences of Y chromosome embedded in the fetus play a significant role. Eight sequences for Y chromosome genes were used in the analysis (*SRY*, *PABY*, *TSPY*, *HSFY*, *DDX3Y*, *AMXY*, *DYZ1* i *DYZ3*). In 13% of the fetuses with Turner syndrome, the presence of Y chromosome sequence was determined.

(55 pages, 25 figures, 8 tables, 85 references, original in:Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: PCR, DNA, placenta, cell culture, amniotic fluid

Supervisor 1: Dr. Petra Korać, Assoc. Prof.

Supervisor 2: Dr. Feodora Stipoljev, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Petra Korać, Assoc. Prof.;

Dr. Ana Galov, Assoc. Prof.;

Dr. Goran Kovačević, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 1 March 2018

POPIS KRATICA

TS – Turnerov sindrom

MEM – Eagle-ov minimalni osnovni medij (MEM, od eng. *Minimal Essential Medium*;))

RPMI – medij Memorijalnog instituta Park-a Roswell-a (RPMI, od eng. *Roswell Park Memorial Institute*;))

PCR – lančana reakcija polimerazom (PCR, od eng. *Polymerase Chain Reaction*)

XIC – centar inaktivacije X-kromosoma (XIC, od eng. *X-inactivation center*)

PAR – pseudoautosomna regija (PAR, od eng. *Pseudoautosomal Region*)

del – delecija

i – izokromosom

GB – gonadoblastom

GCC – invazivni germinativni tumor (GCC, od eng. *Germ Cell Cancer*)

SRY – regija koja određuje spol (SRY, od eng. *Sex determining region Y*)

DYZ3 – ponavljajuća sekvenca u ljudskoj DNA specifična za centromernu regiju Y-kromosoma (DYZ3, od eng. *Human Y-chromosome specific repeated DNA family located in centromeric region*)

DYZ1 – ponavljajuća sekvenca u ljudskoj DNA specifična za q krak Y-kromosoma (DYZ1, od eng. *Human Y-chromosome specific repeated DNA family located on the q arm*)

TSPY – protein specifičan za testis, vezan za Y-kromosom (TSPY, od eng. *Testis-specific protein, Y-encoded*)

GBY – lokus za gonadoblastom na Y-kromosomu (GBY, od eng. *Gonadoblastoma locus on Y chromosome*)

GCNIS – neoplazija germinativnih stanica *in situ* (GCNIS, od eng. *Germ Cell Neoplasia in situ*)

DDX3Y – helikaza 3 DEAD-motiva, vezana za Y-kromosom (DDX3Y, od eng. *DEAD-box helicase 3, Y-linked*)

NRY – nerekombinirajući Y (NRY, od eng. *Non-recombining Y*)

NRPY – nerekombinirajuća regija Y (NRPY, od eng. *Non-recombining portion Y*)

MSY – karakteristično muški Y (MSY, od eng. *Malespecific Y*)

DEAD – akronim naziva aminokiselina koje tvore motiv; D-E-A-D, asp-glu-ala-asp, asparaginska kiselina-glutaminska kiselina-alanin-asparaginska kiselina

AZF_a – faktor azoospermije a (AZF_a, od eng. *Azoospermia Factor a*)

SCOS – sindrom Sertolijevih stanica (SCOS, od eng. *Sertoli-Cell-Only-Syndrome*)

HSFY – transkripcijski faktor toplinskog šoka, vezan za Y-kromosom (HSFY, od eng. *Heat shock transcription factor, Y-linked*)

AZFb – faktor azoospermije b (AZFb, od eng. *Azoospermia Factor b*)

HSF – faktor toplinskog šoka (HSF, od eng. *Heat Shock Factor*)

PABY – pseudoautosomna granična regija, vezana za Y-kromosom (PABY, od eng. *Pseudoautosomal boundary region, Y-linked*)

AMXY(AMGX/AMGY) – amelogenin, vezan za X- i Y-kromosom (AMXY, od eng. *Amelogenin, X- and Y-linked*)

LOESS – lokalna regresija (LOESS; od eng. *Locally Weighted Scatterplot Smoothing*)

TAE – tris-acetatni EDTA pufer (TAE, od eng. *Tris Acetate-EDTA buffer*)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA, od eng. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*)

BLAST – alat za poravnavanje sekvenci (BLAST, od eng. *Basic Local Alignment Search Tool*)

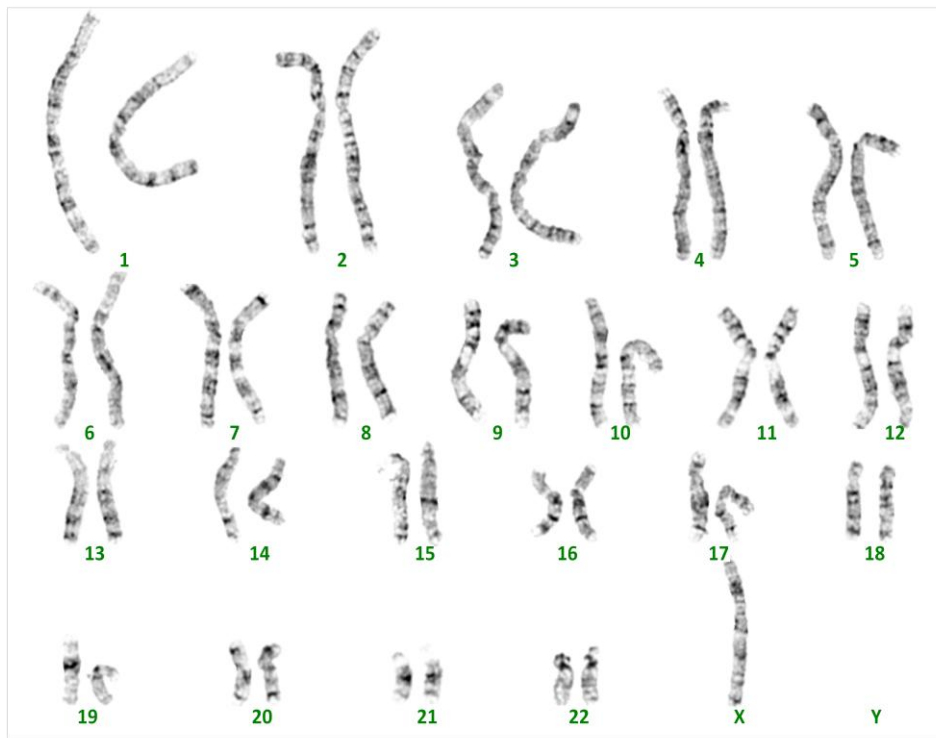
RPMI – medij za kultivaciju stanica Memorijalnog instituta Roswell-a Park-a (RPMI, od eng. *Roswell Park Memorial Insititute Medium*)

| | | |
|----------|---|----|
| 1. | UVOD | 1 |
| 1.1. | Turnerov sindrom | 1 |
| 1.2. | Kliničke osobitosti Turnerovog sindroma | 4 |
| 1.3. | Citogenetičke osobitosti | 5 |
| 1.3.1. | <i>Inaktivacija X-kromosoma i pseudoautosomne regije</i> | 6 |
| 1.3.2. | <i>Mehanizam nastanka Turnerovog sindroma</i> | 10 |
| 1.3.3. | <i>Prisutnost Y-sekvence kod pacijentica s Turnerovim sindromom</i> | 16 |
| 1.4. | Dosadašnja istraživanja | 17 |
| 1.4.1. | <i>Sekvence Y-kromosoma povezane s Turnerovim sindromom</i> | 17 |
| 1.4.1.1. | <i><u>Gen SRY</u></i> | 19 |
| 1.4.1.2. | <i><u>Geni DYZ1 i DYZ3</u></i> | 19 |
| 1.4.1.3. | <i><u>Gen TSPY</u></i> | 19 |
| 1.4.1.4. | <i><u>Gen DDX3Y</u></i> | 20 |
| 1.4.1.5. | <i><u>Gen HSFY</u></i> | 20 |
| 1.4.1.6. | <i><u>Gen PABY</u></i> | 21 |
| 1.4.1.7. | <i><u>Gen AMXY</u></i> | 21 |
| 2. | CILJ I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA | 22 |
| 3. | MATERIJALI I METODE | 23 |
| 3.1. | Uzorci | 23 |
| 3.2. | Citogenetička analiza uzoraka | 23 |
| 3.3. | Izolacija DNA, provjera koncentracije i kvalitete i statistička analiza | 24 |
| 3.4. | Lančana reakcija polimerazom | 25 |
| 3.5. | Gel elektroforeza | 30 |
| 4. | REZULTATI | 31 |
| 4.1. | Kariotipizacija | 31 |
| 4.2. | Izolacija DNA i statistička analiza | 31 |
| 4.3. | Rezultati PCR-analize | 35 |
| 4.3.1. | <i>Kontrolni uzorci</i> | 35 |
| 4.3.2. | <i>Ispitivani uzorci</i> | 38 |
| 4.4. | Sekvenciranje | 44 |
| 5. | RASPRAVA | 45 |
| 6. | ZAKLJUČAK | 48 |
| 7. | LITERATURA | 49 |

1. UVOD

1.1. Turnerov sindrom

Turnerov sindrom (TS) je jedna od najčešćih aneuploidija kod ženske novorođenčadi s pojavnošću od 1:2500 kod živorođene djece (Cortés-Gutiérrez *i sur.*, 2012.). Monosomija X-kromosoma (Slika 1), je najučestaliji kariotip kod pacijentica s Turnerovim sindromom. U oko 45% pacijentica s Turnerovim sindromom citogenetičkom analizom otkrije se samo stanična linija s kariotipom 45,X (Wolff *i sur.*, 2010.). Kod ostalih pacijentica prisutne su i druge stanične linije s poremećajem broja X-kromosoma ili strukturno promijenjenim X- ili Y-kromosomom, odnosno mozaičnim oblikom Turnerovog sindroma. Između 6% i 11% ovih pacijentica imaju mozaične oblike s prisutnim normalnim ili strukturno promijenjenim Y-kromosomom (Patsalis *i sur.*, 1998; Fernandes, 2013.). Utvrđivanje prisutnosti dijela ili cijelog Y-kromosoma je od velike medicinske važnosti, jer takve pacijentice imaju veću vjerojatnost razvoja gonadalnih tumora (Bispo *i sur.*, 2013.), čak i do 30% (Verp i Simpson, 1987).



Slika 1 Kariotip Turnerovog sindroma 45, X (ljubaznošću dr.sc. Feodore Stipoljev, izv.prof.).

Sindrom je prvi put opisao Henry Turner 1938. godine na temelju fenotipskih obilježja sedam pacijentica koje su sve bile niskog rasta, spolno infantilne, imale vrat poput sfinge i lakat okrenut prema van (lat. *cubitus valgus*). Uočio je i nižu liniju kose na vratu. Do tada poznati sindromi su uključivali samo po jedan ili dva od navedenih obilježja, a među ostalima, obavezno, i neki tip oštećenja vratne kralježnice kao što je fuzija, dislokacija ili

poremećaj broja vratnih kralježnjaka zbog kojeg je vrat bio kraći, a njegovo pomicanje otežano. Međutim, pacijentice s Turnerovim sindromom nisu imale ograničene kretnje niti kraći vrat već samo vratne nabore zbog kojih je vrat vizualno djelovao kraćim. Nadalje, među do tada opisanim sindromima nije bilo ni jednoga koji je uključivao i infantilizam i vrat poput sfinge i deformitet lakta (Turner, 1938.).

Prvo kromosomsko istraživanje koje je otkrilo uzrok nastajanja Turnerovog sindroma proveli su Ford i suradnici davne 1959. godine. Pregledom stanica iz krvnih razmaza i bioptata kože pacijentica s gonadalnom disgenezom nisu pronašli Barrovo tjelešće. Analizom 102 metafaze iz koštane srži pronađene su samo stanice s 45 kromosoma (Ford *i sur.*, 1959). Grupiranjem tih kromosoma autori su uočili prisutnost četiri akrocentrična (kao kod zdravih žena; kod zdravih muškaraca je prisutno pet akrocentričnih kromosoma od kojih je jedan Y kromosom) i 15 metacentričnih kromosoma (umjesto 16 kao kod zdravih žena). Sparivanjem kromosoma, dobili su 22 para i jedan nesporeni kromosom za koji je se smatralo da je bio X-kromosom. Na temelju dobivenih rezultata, autori su zaključili da je genotip pacijentice 45,X te su kao uzrok Turnerovog sindroma naveli nedostatak drugog spolnog kromosoma. Kao mehanizam nastanka bolesti autori su predložili nepravilno razdvajanje kromosoma tijekom mejoze. Nadalje, na temelju ispitivanja članova obitelji, koji nisu raspoznavali crvenu i zelenu boju, kod pacijentica s TS-om, zaključili su da se pogreška pri razdvajanju kromosoma može dogoditi i za vrijeme spermatogeneze. Do tada se smatralo da se pogreška događa samo za vrijeme oogeneze (Ford *i sur.*, 1959).

Razvoj prenatalne dijagnostike s ciljem identifikacije kromosomskih poremećaja ploda započeo je ranih 70-ih godina prošloga stoljeća. Tijekom sljedeća tri desetljeća, razvoj citogenetičkih tehnika išao je u smjeru dobivanja manje kondenziranih kromosoma i smanjenja vremena uzgajanja kultura stanica. Prisutnost većeg broja pruga na duljim kromosomima uvjetovala je bolje otkrivanje suptilnijih strukturnih nepravilnosti kromosoma (Hultén *i sur.*, 2003.).

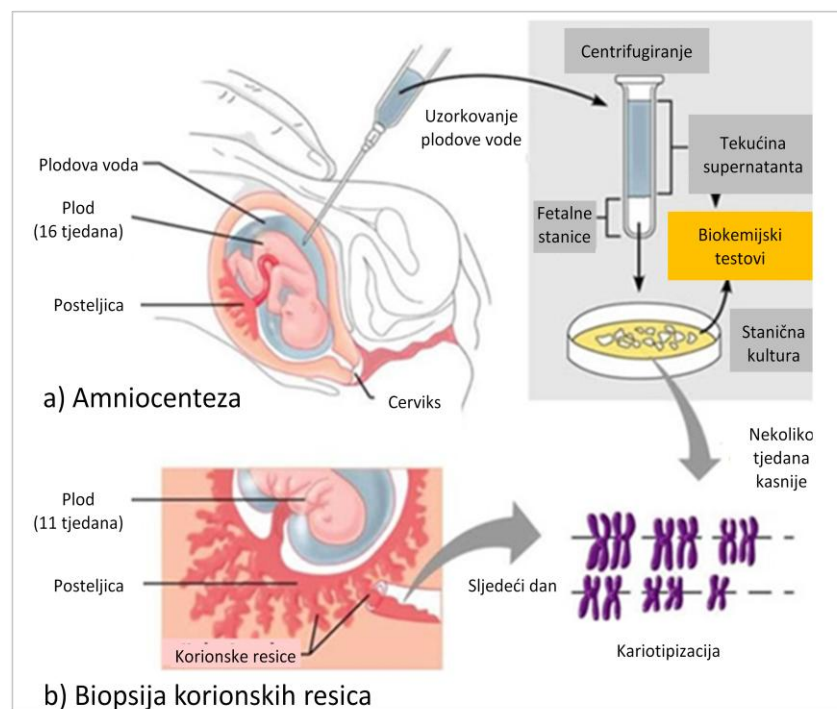
Najčešće indikacije kod prenatalno dijagnosticiranih plodova s Turnerovim sindromom su dob majke, prisutnost nuhalne prozirnosti ili edema ploda, rezultati biokemijskih testova probira ili postojanje drugih strukturnih abnormalnosti ploda (Sybert i Mccauley, 2004.) .

Ukoliko postoje osnovane sumnje za TS, može se raditi test korionskih resica (od 11.-og do kraja 13.-tog tjedna trudnoće) ili amniocenteza (od 16.-og tjedna trudnoće) (Slika 2). Kod biopsije korionskih resica od 5 do 20 mg resica se aspirira u medicinsku špricu koja sadrži medij za kultivaciju uz dodatak antikoagulansa heparina. Nakon pažljivog čišćenja od mogućih primjesa majčinog tkiva pod invertnim mikroskopom, resice se usitnjavaju i

uspostavlja se (dugotrajna ili kratkotrajna) kultura stanica. S druge strane, amniocentezom se aspirira od 18 do 20 ml plodove vode iz čega se također uspostavlja kultura stanica. U oba slučaja, kada u kulturama izraste dovoljan broj stanica, prekida se njihov rast i izrade se preparati koji se bojaju uz pomoć Giemsa-boje (G-pruganje). Preparati se analiziraju pod mikroskopom, metafaze se slikaju, a kromosomi se onda slažu u kariogram uz pomoć softverskih programa.

Stopu detekcije kromosomskog mozaicizma određuju uglavnom četiri faktora: vrsta i količina dobivenog fetalnog tkiva, broj analiziranih metafaza (Hook i Warburton, 1983.), osjetljivost metode koja je korištena i negativna selekcija *in vitro*, što može rezultirati gubitkom abnormalnih staničnih linija (Held *i sur.*, 1992.; Procter *i sur.*, 1984.).

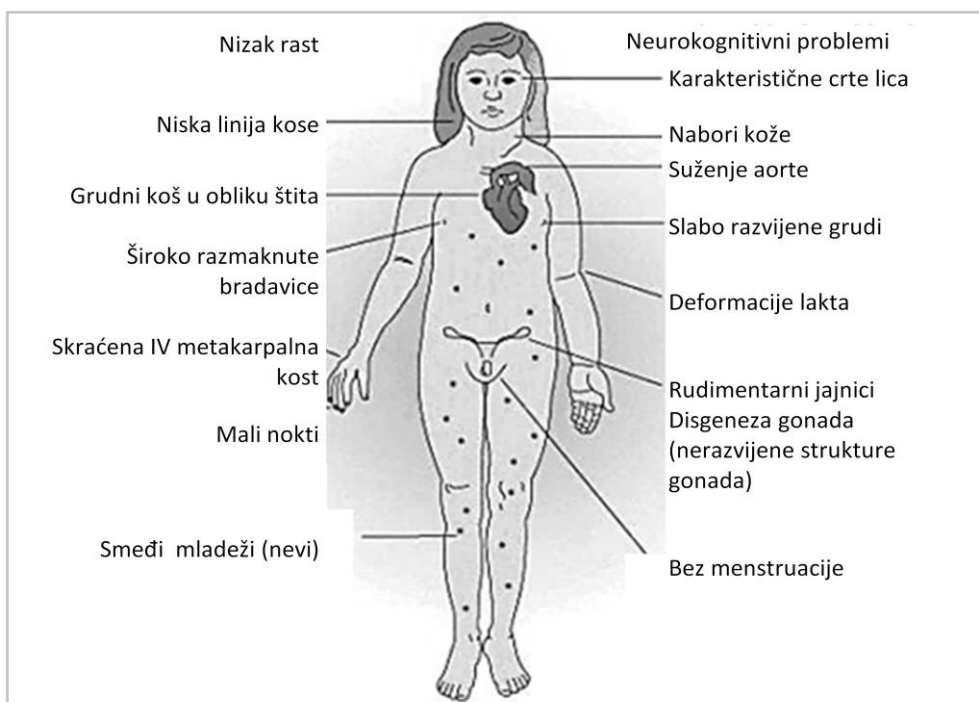
U zadnjih 30-ak godina puno se saznalo o mehanizmu razvoja bolesti TS-a, a između ostaloga i da se dio mozaičnih oblika ne može detektirati klasičnim citogenetičkim metodama (Oliveira *i sur.*, 2009.). Kariotipizacija ne mora uvijek otkriti prisutnost strukturno abnormalnih kromosoma, posebice ako su prisutni u vrlo malom broju ili ako su aberacije vrlo male (insercije, delecije, duplikacije ili translokacije kratkih sekvenci manjih od 5 Mb) (Hultén *i sur.*, 2003.). Stoga se, uz citogenetičke metode, upotrebljavaju i one molekularne, među kojima je i lančana reakcija polimerazom (PCR, od eng. *Polymerase Chain Reaction*). Upravo su novija molekularna istraživanja identificirala neke gene koji bi mogli biti uključeni u nastanak kliničkih osobitosti Turnerova sindroma (Sybert i Mccauley, 2004.).



Slika 2 Shematski prikaz uzimanja uzoraka za kariotipizaciju (prilagođeno; preuzeto s www.poliklinika-ginecej.hr, 2015.)

1.2. Kliničke osobitosti Turnerovog sindroma

Pacijentice pokazuju vrlo različite fenotipske osobitosti kod kojih je često jedina zajednička osobitost nizak rast (Slika 3). Većina pacijentica je normalne inteligencije. Glavna osobitost je nedostatak ovarijske funkcije (Santos *i sur.*, 2010.). Dolazi do degeneracije jajnika i zamjene ovarijskog tkiva vezivnim tračcima. U većine ne dolazi do menarhe, pa su sterilne. Unatoč njihovim nediferenciranim gonadama, imaju jasne vanjske i unutarnje ženske spolne organe. Maternica je, ipak, često manja i njen razvoj ovisi o stimulaciji hormonima. Prepoznatljivi simptomi su malena težina i dužina pri porođaju, mikrognatija, epikantus, ptoza jednog ili oba gornja očna kapka, uz loše formirane i nisko postavljene uške. Vrat je kao u sfinge, kratak uz kožne nabore na lateralnoj strani, koji se protežu od uha do ramena (lat. *pterygium colli*). Kosa završava na vratu nisko s ravnom linijom, koža je često bogata pigmentiranim nevusima. Na šakama i stopalima novorođenčadi vide se pseudolinfatički edemi, zglobovi su hiperelastični, a postoji izrazita deformacija lakta prema vani (lat. *cubitus valgus*). Grudni koš je bačvast, u obliku štita, sa široko razmaknutim bradavicama. Česte su i urođene srčane greške zbog kojih su pacijentice izloženije komplikacijama kao što su koronarne bolesti, disekcija aorte pa čak i smrt uslijed cerebrovaskularnih bolesti (Mavinkurve i O’Gorman, 2017.). Uz ove, primijećene su i urođene anomalije bubrega (oko 40%) (Chang *i sur.*, 2000.), uglavnom tzv. potkovast bubreg (lat. *ren arcuatus*). Mogući su i problemi sa sluhom, hipotireoza i osteoporoza. Budući da bolest utječe na velik broj organskih sustava, povećana je smrtnost pacijentica svih životnih dobi (Santos *i sur.*, 2010.).



Slika 3 Kliničko-fenotipska obilježja kod Turnerovog sindroma (prilagođeno; preuzeto iz Speicher *i sur.*, 2010).

1.3. Citogenetičke osobitosti

Otpriblike polovina djevojčica s Turnerovim sindromom ima monosomiju X-kromosoma (45,X). Ostale većinom imaju staničnu liniju 45,X u mozaiku sa staničnim linijama s dva ili više X-kromosoma ili sa strukturno promijenjenim drugim X-kromosomom (izokromosom dugog kraka, dicentrični kromosomi, delecija kratkog kraka ili prstenasti kromosom (Sybert i Mccauley, 2004.). Upravo se na strukturne anomalije X-kromosoma odnosi oko 30% slučajeva, bilo u homogenim kariotipovima, bilo u mozaicima koji uključuju staničnu liniju 45,X (Oliveira *i sur.*, 2009.). Približno 6-11% pacijentica ima strukturno promijenjen Y-kromosom ili mozaični oblik koji uključuje barem jednu staničnu liniju s Y-kromosomom (Patsalis *i sur.*,1998,; Fernandes, 2013.).

Mogući kariotipovi prikazani su u Tablici 1 (preuzeta iz istraživačkog rada Sybert i Mccauley, 2004.; modificirana) iz koje je vidljivo da su upravo najčešće strukturne abnormalnosti: izokromosom, odnosno duplikacija dugog kraka jednog od X-kromosoma 46,X,i(Xq) (7-8%); mozaični oblici sa staničnim linijama 46,XX i 47,XXX (zajedno 16%) te delecije 46,X,del(Xp) i 46,X,del(Xq) (ukupno 4%). Oko 7% pacijentica, ima mozaični oblik sa staničnim linijama s normalnim ili strukturno abnormalnim Y-kromosomom (Sybert i Mccauley, 2004.).

Na X-kromosomu nalaze se geni koji kontroliraju ovarijsku funkciju i rast. Smatra se da su za normalan razvitak u ranom embrijskom razdoblju potrebne obje aktivne kopije tih gena. U slučaju nedostatka drugog X-kromosoma (ili njegovih dijelova) dolazi do haploinsuficijencije skupine gena X-kromosoma, a time i do poremećaja u ranom razvoju embrija (Stipoljev, 2007.).

Tablica 1 Prikaz citogenetičkih i kliničkih osobitosti pacijentica s Turnerovim sindromom i različitim kariotipovima. Tablica je napravljena na temelju podataka analize pacijentica iz klinike u Seattle-u (SAD). Svi brojevi su izraženi kao postotci, osim visine (cm) (preuzeto i prilagođeno iz Sybert i Mccauley, 2004.).

| Kariotip | Broj pacijentica (%) | Mentalna retardacija (%) | Srčane greške (%) | Anomalije bubrega (%) | Edem (%) | Menzes (%) | Visina (cm) |
|----------------------------------|----------------------|--------------------------|-------------------|-----------------------|----------|------------|-------------|
| Svi | 100 | 11 | 53 | 39 | 36 | 22 | 148±7,1 |
| 45,X | 45 | 8 | 61 | 46 | 65 | 10 | 147,3±6,0 |
| 46,i(Xq) | 7 | 18 | 50 | 36 | 13 | 18 | 145,6±4,7 |
| 45,X/46,i(Xq) | 8 | 9 | 29 | 26 | 0 | 15 | 143,4±7,9 |
| 45,X/46,+r | 6 | 33 | 64 | 22 | 11 | 12 | 145,7±4,9 |
| 45,X/46,+mar | 1 | 80 | 50 | 33 | 25 | 0 | / |
| 45,X/46,XY ili 46,X,Yvar/Ydel | 7 | 0 | 64 | 44 | 9 | 0 | 148,8±5,9 |
| 45,X/46,XX/47,XXX | 3 | 0 | 10 | 25 | 6 | 56 | 144,9±7,7 |
| 45,X/47,XXX 45,X/46,XX | 13 | 8 | 40 | 39 | 15 | 40 | 149,7±7,5 |
| 46,X,Xp (delecije kratkog kraka) | 2 | 8 | 0 | 0 | 8 | 86 | 153±5,0 |
| 46,X,Xq (delecije dugog kraka) | 2 | 0 | NP | 50 | 0 | 71 | 163±16,6 |
| Drugi | 6 | 22 | 61 | 20 | 7 | 30 | 149,9±7,4 |

Pojašnjenja kratica korištenih u tablici: *i* – izokromosom, *p* – kratki krak kromosoma, *q* – dugi krak kromosoma, *r* – prstenasti kromosom, *del* – delecija, *var* – varijante, *mar* – marker kromosom

1.3.1. Inaktivacija X-kromosoma i pseudoautosomne regije

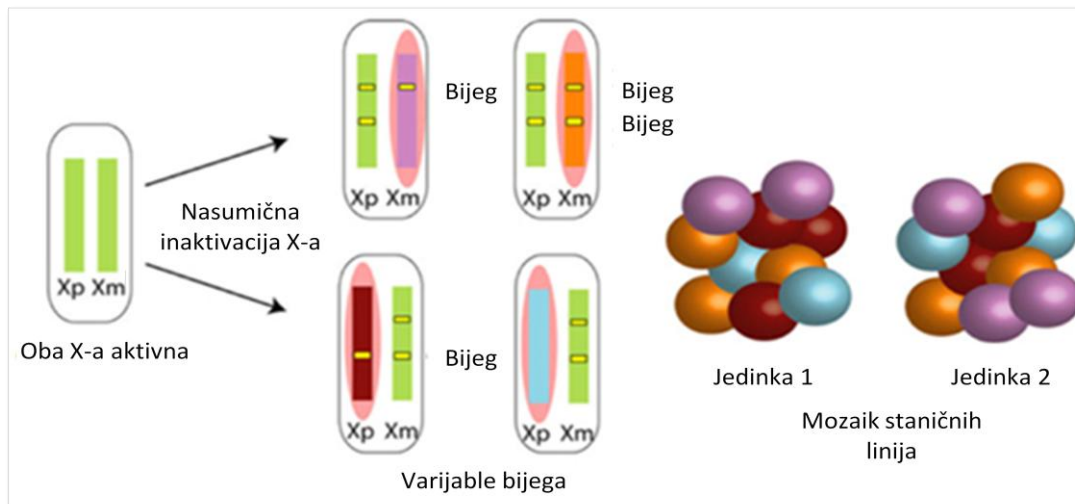
Svaka osoba s normalnim kariotipom ima dva spolna kromosoma. Žene imaju spolni komplement XX, a muškarci XY. Za vrijeme embrijskog razvoja ženskih plodova, u svakoj se stanici događa nasumična i trajna inaktivacija jednog od X-kromosoma neovisno o njegovom podrijetlu. Inaktivirani X-kromosom se heterokromatinizira i pretvori u tzv. Barrovo tjelešce. Ovaj događaj osigurava postojanje samo jedne funkcionalne kopije gena.

Za inaktivaciju X-kromosoma odgovorna je regija centra inaktivacije X-a, *XIC* (od eng. *X-inactivation center*) koja se nalazi u regiji Xq13.2. Unutar te regije nalazi se gen *XIST* (od eng. *X-inactive specific transcript*; X-inaktivni specifični transkript) koji je naziv dobio zbog svoje specifične ekspresije s inaktivnih X-kromosoma. Ovaj transkript ima četiri jedinstvena svojstva koja mu služe pri utišavanju X-kromosoma:

1. Gen *XIST* kodira 17 kb dugu funkcionalnu nekodirajuću molekulu RNA (Costa, 2008.),

2. RNA *XIST* je eksprimirana jedino u stanicama koje sadrže dva ili više X-kromosoma i ne eksprimira se u normalnim muškim stanicama (Slika 4) (Budući da aktivni X-kromosom ima poseban uzorak metilacije, stanica ga prepoznaje i eksprimira RNA *XIST* sa svih prekobrojnih X-kromosoma),
3. RNA *XIST* ostaje isključivo u jezgri i može 'omotati' kromosom s kojeg je eksprimirana,
4. RNA *XIST* se eksprimira s inaktivnog X-kromosoma (Ahn i Lee, 2008.).

Istraživanja su pokazala da je sama RNA *XIST* dovoljna za inaktivaciju (Wutz i Jaenisch, 2000.) te da ona regrutira razne utišavajuće proteinske komplekse kako bi označili budući inaktivni X-kromosom. Povećana ekspresija gena *XIST* (Slika 4) predstavlja ključni inicijacijski događaj u inaktivaciji X-kromosoma i to je centralna uloga ove nekodirajuće RNA (Ahn i Lee, 2008.).



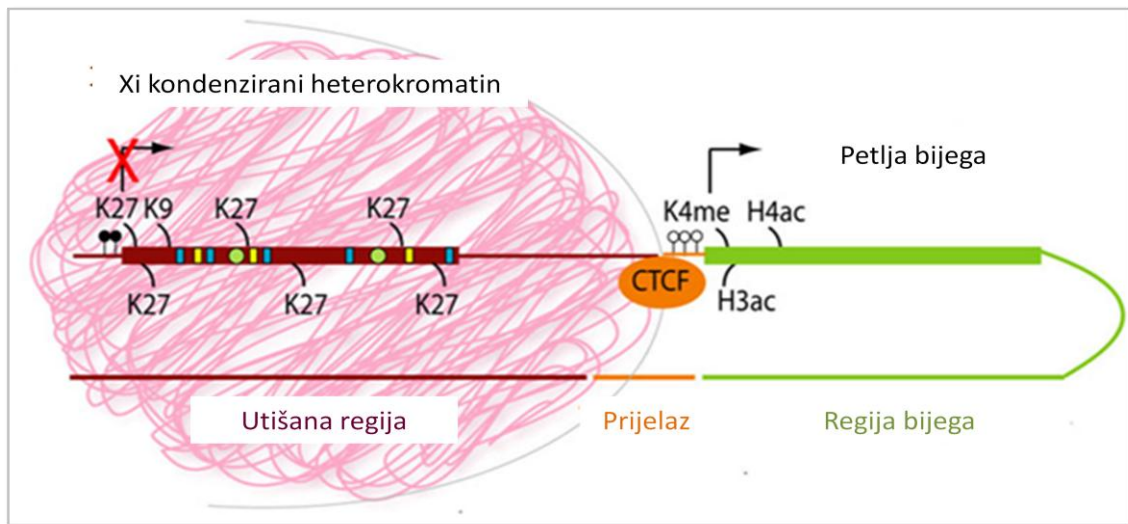
Slika 4 Inaktivacija X-kromosoma i uzorci bijega od inaktivacije. Prije diferencijacije, očev X- (*Xp*) i majčin X- (*Xm*) kromosom su aktivni. Kako se stanice diferenciraju, nasumično se inaktivira jedan X-kromosom. Proces započinje tako da se oko budućeg inaktivnog X-a (*Xi*) omota RNA *XIST* (rozi oblak). Drugi X ostane aktivan (*Xa*) (zeleni kromosom). Zbog nasumičnosti procesa, inaktivira se ili *Xp* ili *Xm* po stanici, što rezultira mozaičnim uzorkom inaktivacije prema roditeljskom podrijetlu kod žena. Neki geni izbjegavaju X-inaktivaciju, odnosno eksprimirani su i sa *Xi* i *Xa* (žute linije) u svim stanicama (prilagođeno; preuzeto iz Berletch *i sur.*, 2011.).

Nakon gena *XIST* otkriven je i njegov 'antisense' partner – *TSIX* ('*XIST*' unatrag) (Lee *i sur.*, 1999.). To je 40 kb duga nekodirajuća RNA koja je komplementarna sekvenci *XIST* jer se transkribira u suprotnom smjeru od RNA *XIST*. I RNA *TSIX* djeluje na kromosom s kojega je eksprimirana.

Nadalje, postoji inverzna veza (Slika 5) između ekspresije *XIST* i *TSIX*. Kada se reducira transkripcija *TSIX* na jednom X-kromosomu, poveća se ekspresija *XIST* na tom istom kromosomu i on se inaktivira (Sado *i sur.*, 2001.). Suprotno tome, prevelika ekspresija *TSIX*

sprječava povećanje ekspresije *XIST* i blokira inaktivaciju tog istog X-kromosoma (Luikenhuis *i sur.*, 2001.; Stavropoulos *i sur.*, 2001.). Dakle, ekspresija *TSIX* potrebna je za antagonizaciju gena *XIST* na X-kromosomu koji će biti aktivan (Ahn i Lee, 2008.).

Međutim, postoje regije koje izbjegavaju X-inaktivaciju i većina njih se nalazi u pseudoautosomnim regijama (skraćeno: *PAR*). *PAR* označava regiju u kojoj se većinom nalaze geni karakteristični za oba spolna kromosoma (regija homologije). Posljedično, i muškarci i žene imaju dvije funkcionalne kopije ovih gena i mnogi od njih esencijalni su za normalan razvoj ploda (Li *i sur.*, 2008.). Zasad su poznate dvije regije *PAR* (Slika 6).

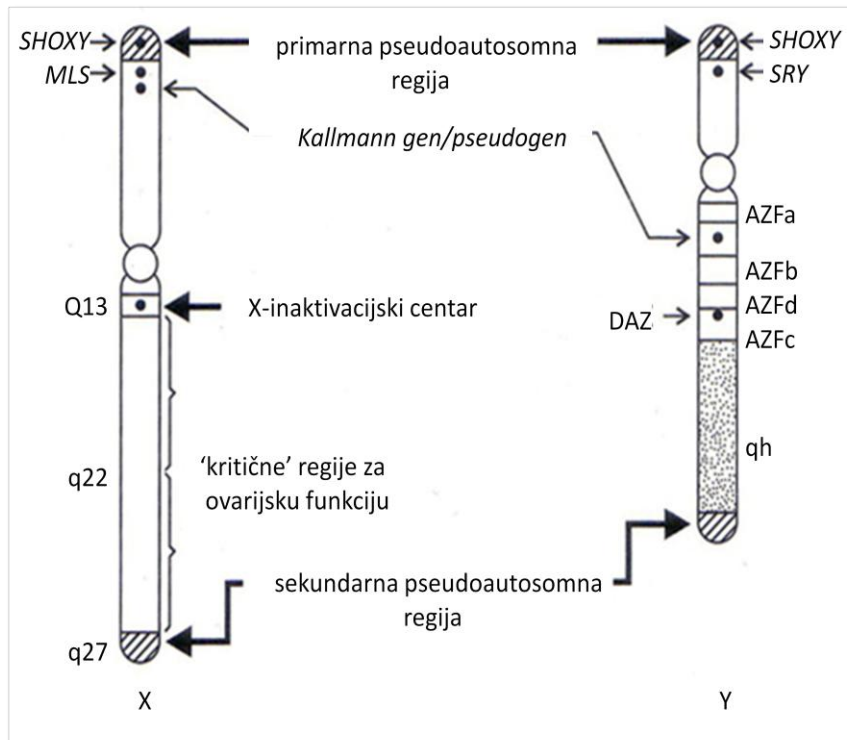


Slika 5 Molekularne karakteristike bijega i inaktiviranih X-vezanih gena. Model prikazuje utišane regije X-kromosoma omotane nekodirajućom RNA *XIST* (rozi oblak). Nukleosomi na području inaktiviranog X-kromosoma sadrže histone s modifikacijama za represiju transkripcije i kondenzaciju kromatina kao što su: H3K27me3, H3K9me3 i macroH2A (zeleni krugovi). Nadalje, CpG-otoci na 5'-kraju inaktiviranih gena su metilirani (crni krugovi). Utišani kromatin sadrži i specifične motive DNA (npr. LINE-1 i motive bogate AT-ovima) (žuti i plavi kvadratići, tim redosljedom) koji omogućuju vezanje RNA *XIST* i vezanje specifičnih proteina kao što je SATB1. Suprotno tome, geni koji izbjegavaju inaktivaciju X-kromosoma nisu omotani *XIST*-om, sadrže nukleosome s modifikacijama vezanim za aktivnu transkripciju kao što su acetilacija H3, H4 i H3K4me3, i njihovi CpG-otoci su nemetilirani (bijeli krugovi). Kromatin između inaktiviranih gena i gena koji izbjegavaju inaktivaciju je vjerojatno povezan s kromatinskim izolatorom CTCF koji sprječava širenje heterokromatina u regiju bijega ili, obrnuto, širenje eukromatina u utišanu regiju (prilagođeno; preuzeto iz Berletch *i sur.*, 2011.; Filipkova *i sur.*, 2005.)

Regija *PARI* je veća i pokriva 2,6 Mb na krajevima kratkih krakova X- i Y-kromosoma (Li *i sur.*, 2008.). Sadrži barem 24 gena od kojih ni jedan ne podliježe X-inaktivaciji. Delecija regije *PARI* tijekom mejoze spermatogeneze rezultira nesposobnošću sparivanja spolnih kromosoma što posljedično vodi do sterilnosti kod muškaraca. Jedan od gena iz regije *PARI* s poznatom funkcijom je *SHOX* (od eng. *Short Stature Homeobox-Containing*) (Helena Mangs i Morris, 2007.). Gen *SHOX* je jedan od glavnih gena za rast kod ljudi. U slučaju nastanka delecije ili duplikacije unutar gena dolazi do haploinsuficijencije *SHOX* što rezultira

idiopatskim niskim rastom ili Léry-Weill dishondroosteozom, te se povezuje s niskim rastom i koštanim abnormalnostima kod pacijentica s TS-om (Fukami *i sur.*, 2016.).

Regija *PAR2* se nalazi na krajevima dugog kraka X- i Y-kromosoma. Puno je manja te pokriva oko 320 kb (Sävendahl *i sur.*, 2000.). Pokazuje puno manju frekvenciju sparivanja i homologne rekombinacije od regije *PAR1*.



Slika 6 Shematski prikaz značajnih regija X- i Y-kromosoma. Vidljive su pseudoautosomne regije (*PAR1* i *PAR2*), te lokacije regija i gena za koje se smatra da su djelomično odgovorni za nastanak fenotipskih obilježja Turnerovog sindroma. Istraživanja su pokazala da gubitak ili mutacije u genu *SHOX* uzrokuju nizak rast (prilagođeno; preuzeto iz Gardner *i sur.*, 2011.).

Nadalje, otprilike 99% ljudskih embrija s kariotipom 45,X bit će pobačeno već u vrlo ranom razdoblju embrijskog razvoja (Hook i Warburton, 1983.; Trolle *i sur.*, 2016.).

Smatra se da su visoka smrtnost i karakteristična fenotipska obilježja Turnerovog sindroma rezultat haploinsuficijencije jednog ili više gena koji su zajednički za X- i Y- kromosom (Slika 6), odnosno jednog ili više gena pseudoautosomne regije koji ne podliježu inaktivaciji (Ferguson-Smith, 1965.; Burgoyne, 1989.; Fisher *i sur.*, 1983.; Oliveira *i sur.*, 2009.).

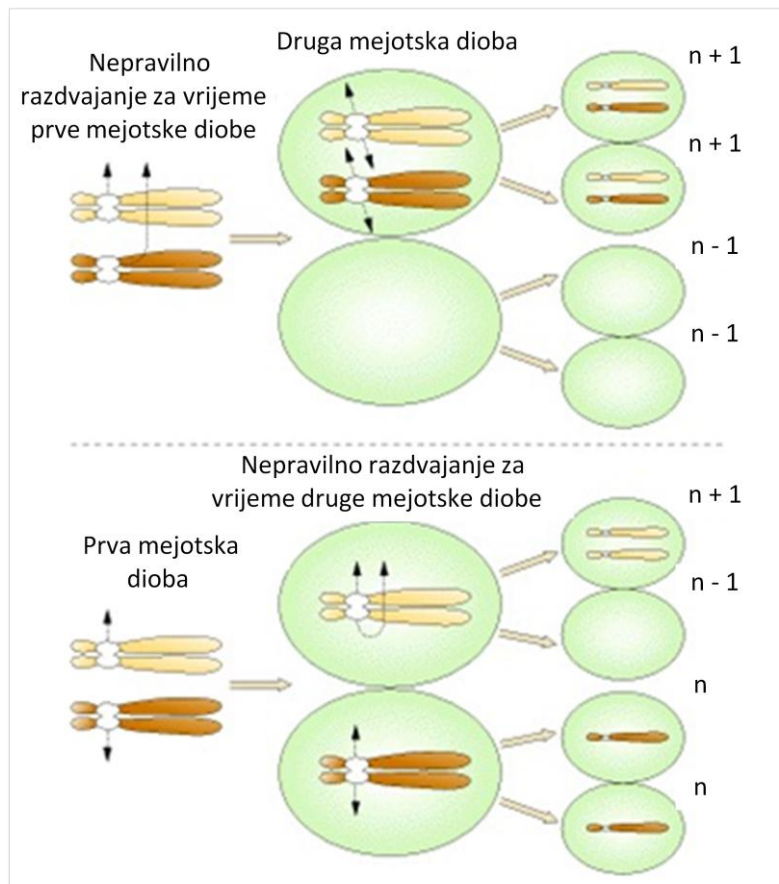
Oba kraka X-kromosoma, sadrže gene neophodne za normalnu ovarijsku funkciju, pa već sama prisutnost aneuploidije vjerojatno može dovesti do redukcije u broju i stopi preživljenja oocita (Sybert i Mccauley, 2004.).

Također, poznati su i slučajevi translokacija između X-kromosoma i autosoma. Procjenjuje se da pogađaju 1 od 30 000 živorođene djece. Kod ovakvih tipova recipročnih

translokacija funkcionalno balansirano stanje ovisi o položaju mjesta loma u odnosu na regiju *XIC* (Sharp, 2002.) te hoće li se inaktivirati normalan X-kromosom ili onaj koji je uključen u recipročnu translokaciju.

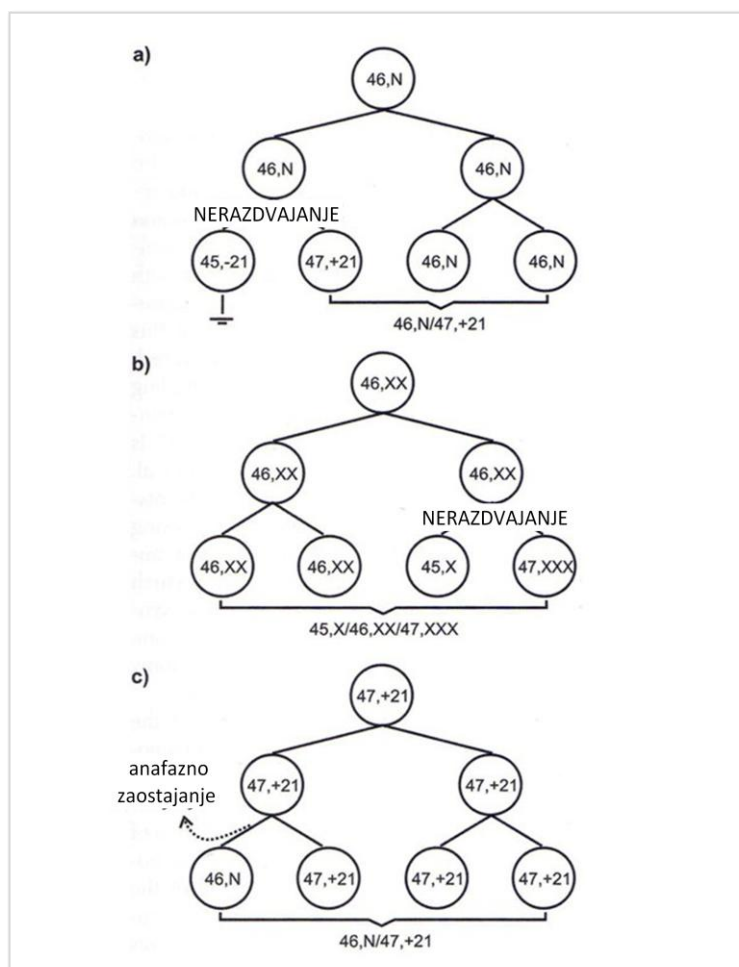
1.3.2. Mehanizam nastanka Turnerovog sindroma

Turnerov sindrom, kao i neke druge bolesti izazvane promjenom broja kromosoma, nastaju kao posljedica kromosomskog nerazdvajanja (nepravilnog razdvajanja) koje se može dogoditi nasumično tijekom mejoze ili mitoze. Pogreška se može dogoditi u prvoj ili drugoj mejotskoj diobi tijekom oogeneze ili spermatogeneze, čime nastaju aneuploidne gamete (Slika 7).



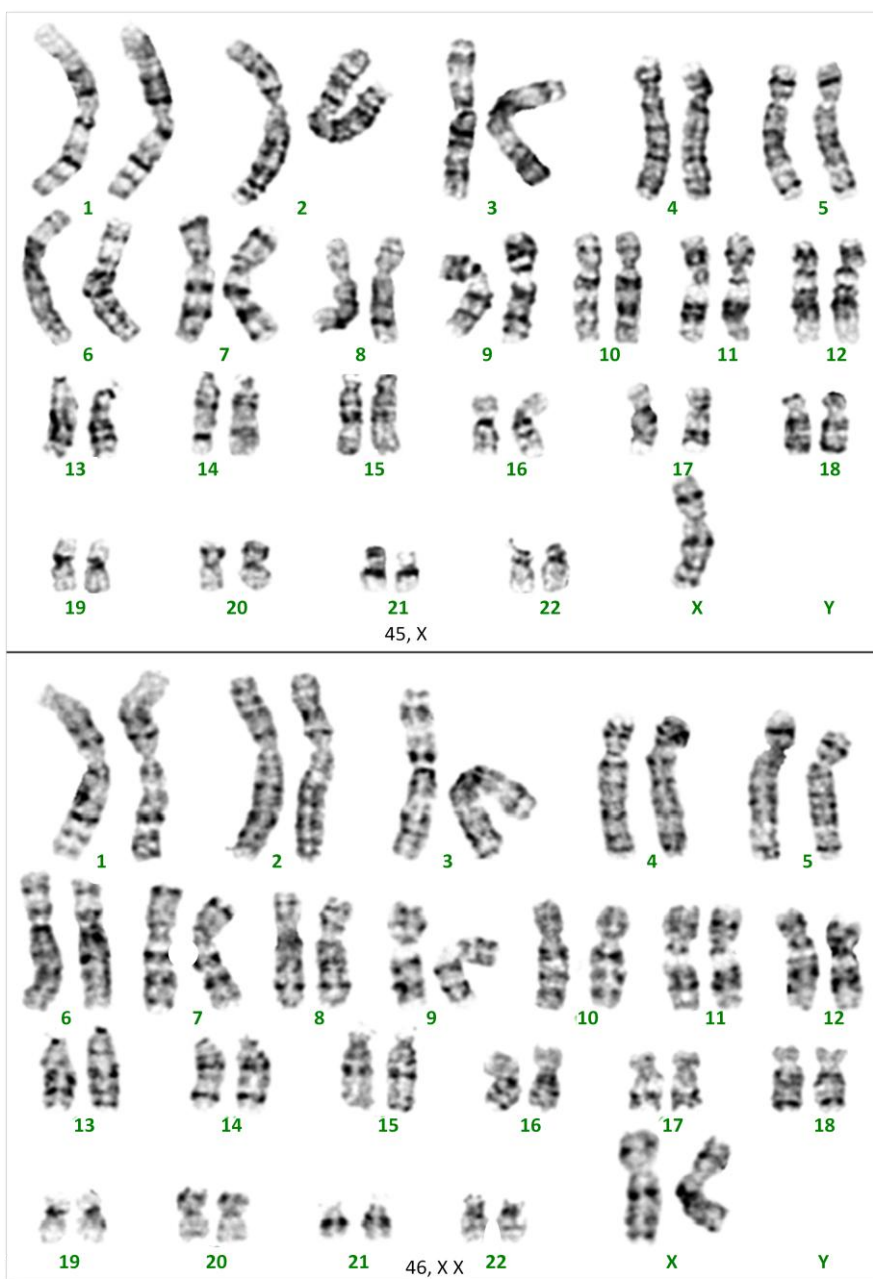
Slika 7 Prikaz normalnog i nepravilnog razdvajanja kromosoma i sestrinskih kromatida za vrijeme mejoze koje može dovesti do Turnerova sindroma (preuzeto i prilagođeno iz Griffiths, 2000.).

Mitotsko nerazdvajanje događa se uglavnom u ranoj postzigotnoj fazi, a može se dogoditi i u prvoj diobi zigote (Slika 8) čime često nastaje više staničnih linija s različitim brojem kromosoma. Ovisno o tome je li se nepravilno razdvajanje dogodilo tijekom prve diobe zigote ili tijekom kasnijih dioba zametka, novonastale stanične linije mogu biti sve aneuploidne ili predstavljati kombinaciju aneuploidnih i euploidnih linija (Slika 9) (Pavlica, 2012.). Aneuploidne stanice nastavit će se dalje dijeliti stvarajući tkiva s promijenjenim brojem kromosoma, tzv. mozaični oblik ili miksoplodiju.



Slika 8 Shematski prikaz nastajanja mozaičnog oblika. A) Postzigotsko kromosomsko nerazdvajanje kod početno normalnog ploda. Jedna stanična linija (monosomija 21. kromosoma) je kasnije izgubljena te je kariotip 46,N/47,+21. B) Postzigotsko kromosomsko nerazdvajanje kod početno normalnog 46,XX ploda koje je rezultiralo mozaičnim oblikom i kariotipom 45,X/46,XX/47,XXX. C) Postzigotsko anafazno zaostajanje kod početno abnormalnog ploda 47,+21 koje vodi do 'ispravljene' ili 'špašene' normalne stanične linije 46,N (preuzeto iz Gardner *i sur.*, 2011.).

Jedan od mehanizama nastanka aneuploidije je i anafazno zaostajanje (Slika 8), odnosno zaostajanje jednog ili više kromosoma pri prijelazu iz metafazne ravnine na stanični pol zbog greške diobenog vretena. Ovako zaostali kromosom ili kromosomi su izgubljeni za jezgru novonastale stanice čime nastaje poremećaj broja kromosoma.



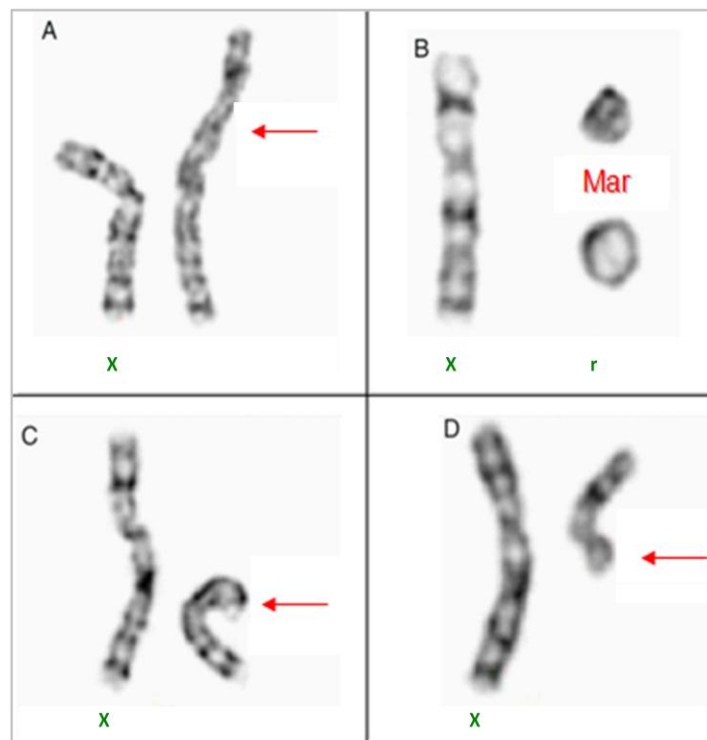
Slika 9 Kariotip 45,X/46,XX – mozaični oblik Turnerovog sindroma (ljubaznošću dr.sc. Feodore Stipoljev, izv.prof.).

Osim numeričkih promjena, mogu nastati i strukturne aberacije kromosoma (Slika 10) uzrokovane lomovima i prespajanjem odlomljenih krajeva koji mogu promijeniti položaj, okrenuti se na kromosomu, premjestiti se na neki drugi kromosom ili se izgubiti tijekom stanične diobe. Prisutnost strukturno abnormalnog spolnog kromosoma u najvećem broju slučajeva posljedica je mejotskih grešaka očevog podrijetla (Uematsu *i sur.*, 2002.). Strukturno abnormalni spolni kromosomi imaju tendenciju inaktivacije i često se gube tijekom daljnjih mitotskih dioba ostavljajući staničnu liniju s 45,X mehanizmom anafaznog zaostajanja (gdje je taj X koji je ostao u najvećem broju slučajeva majčinog podrijetla) ili

mehanizmom nerazdvajanja ako je prisutna još barem jedna stanična linija s poremećajem broja X-kromosoma (npr 47,XXX) (Zhong i Layman, 2012.).

Delecije (del) predstavljaju gubitak kromosomskog segmenta te uzrokuju parcijalnu monosomiju deletiranih lokusa. Izgubiti se može terminalni ili unutarnji dio kromosoma.

U slučaju terminalne delecije oba kraka oblikuje se prstenasti ili ring (r) kromosom, koji ima centromeru. Približno 10% pacijentica koje imaju značajan zaostatak u razvoju imaju prstenasti X-kromosom. Kod njega često nedostaje *XIST*, pa su geni koji bi inače bili utišani eksprimirani, čime nastaje funkcionalna disomija prstenastog kromosoma (Cassidy i Allanson, 2010). Autori Ross i suradnici (2000.) zaključuju da je gubitak gena koji se nalaze u regiji Xp22.3 povezan s neurokognitivnim poteškoćama karakterističnima za TS. Također, recesivni poremećaji povezani s X-kromosomom, od kojih oboljevaju muška djeca, se mogu ustanoviti i kod djevojčica s Turnevim sindromom, jer se zbog nedostatka drugog X-kromosoma ne mogu funkcionalno uravnotežiti učinci abnormalnih gena (Cassidy i Allanson, 2010). Zanimljivo je i istraživanje iz 2001. (Boucher *i sur.*, 2001.) prema kojem gubitak gena *SRY* na Y-kromosomu (na primjer 46,X,del(Yp)) dovodi do fenotipa Turnerova sindroma, čak i bez prisutnosti stanične linije 45,X (Cassidy i Allanson, 2010).

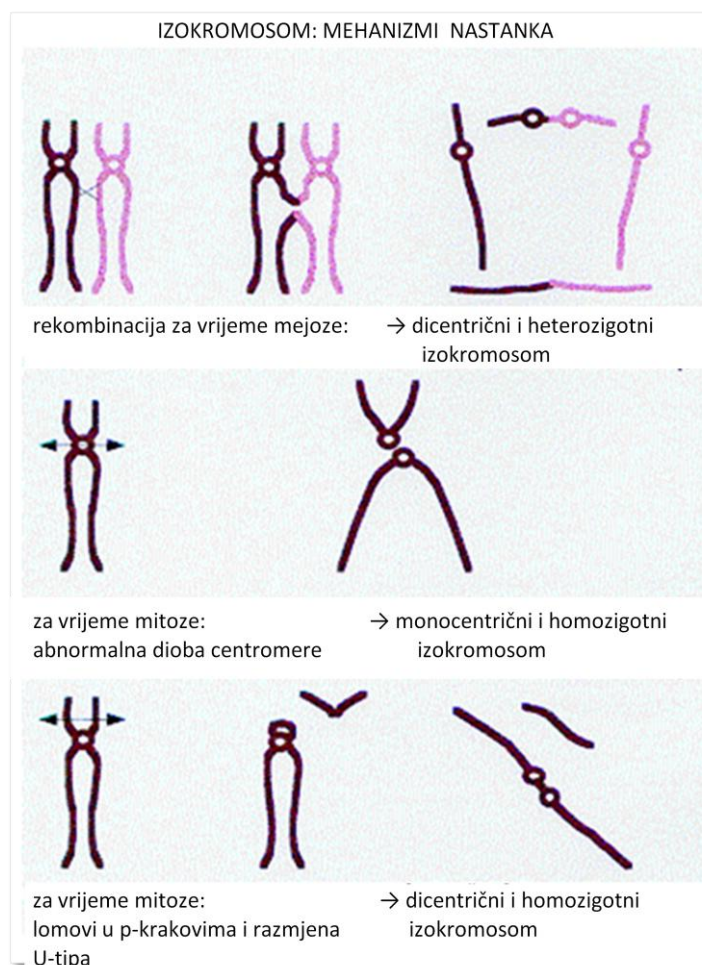


Slika 10 Primjeri strukturnih aberacija X-kromosoma. A) Izokromosom dugog kraka X-kromosoma (crvena strelica). B) Marker kromosom definiran kao prstenasti kromosom (oznaka Mar). C) Delecija kratkog kraka X-kromosoma (crvena strelica). D) Delecija dugog kraka X-kromosoma (crvena strelica) (prilagođeno; preuzeto od Ibarra-Ramírez i Martínez-de-Villarreal, 2016).

Izokromosom (i) je tip strukturne aberacije koju može uzrokovati poprečna dioba centromere za vrijeme mitoze čime nastaje metacentrični kromosom (Slika 11) s genetičkim materijalom dvaju p ili dvaju q krakova. Za gene koji su se nalazili na izgubljenom kraku time nastane monosomija, a za gene udvostručenog kraka trisomija. Izokromosom je opisan i na X-kromosomu i na Y-kromosomu i obje se forme pojavljuju kod TS-a. Izokromosom dugog kraka X-kromosoma, X(i(Xq)) (Slika 12), je najčešća strukturna aberacija koja se može pronaći kod slučajeva s TS-om, bilo u homogenom kariotipu 46,X,i(Xq) ili u mozaičnom obliku sa staničnim linijama kariotipa 45,X (najčešće 45,X/46,X,i(Xq)) (Oliveira *i sur.*, 2009.), s tim da se mozaični oblik 45,X/46,X,i(Xq) pojavljuje češće nego čisti kariotip 46,X,i(Xq) (Zhong i Layman, 2012.).

Osim poprečnom diobom izokromosom može nastati i prilikom složene razmjene genetskog materijala koja može rezultirati acentričnim ili dicentričnim produktima. Zbog haploinsuficijencije gena s izgubljenih p-krakova, kod većine pacijentica kariotipa 46,X,i(Xq) dolazi do zatajenja jajnika (gonade se gotovo uopće ne razvijaju), niskog rasta te pojave drugih fenotipskih obilježja tipičnih za TS.

Izokromosom Y-kromosoma se pojavljuje u manje od 5% slučajeva TS-a i može doći u mozaiku sa staničnim linijama koje sadrže barem jedan, potpuni ili djelomični, Y-kromosom (Beiguelman, 1982.; Lippe, 1991.; Oliveira *i sur.*, 2009.).



Slika 11 Prikaz nekih od mehanizama nastanka izokromosoma. Ukoliko se pogreška dogodi u prvoj mejotskoj diobi, udvostručeni materijal će biti heterozigotan (gornji prikaz). Umjesto uzdužne, može se dogoditi poprečna dioba centromere, odnosno tzv. 'centralna fizija' nakon koje kao da se kromosom podijeli na dvostruki p i dvostruki q krak. Ne dolazi do gubitka genomskog materijala jer se svaka od dvije polovice kromosoma tretira kao funkcionalna cjelina (srednji prikaz). Osim ovoga, može doći do dvostrukog poprečnog loma na p-krakovima te U-tipa izmjene genomskog materijala gdje se kromatida jednog kraka kromosoma 'omota' kako bi se pridružila drugoj kromatidi (donji prikaz) (prilagođeno; preuzeto od Huret *i sur.*, 2000.).

Neka od ranijih istraživanja Turnerova sindroma su pretpostavljala da mehanizam osnove bolesti leži u drugoj mejotskoj diobi kod žena jer ona (posebno kod starijih majki) započinje s velikom vremenskom odgodom u odnosu na prvu mejotsku diobu. Ipak, tijekom vremena, različita istraživanja su pokazala da se učestalost Turnerovog sindroma ne povećava sa starošću majke. Nadalje, upotrebom molekularnih metoda dokazano je da, u oko 75% slučajeva, X-kromosom koji nedostaje potječe upravo od oca. I stanične linije s Y-kromosomom potječu od oca, pa su ova istraživanja pokazala da zapravo mejotska pogreška kod oca češće vodi nastajanju gameta s abnormalnim brojem spolnih kromosoma.



Slika 12 Slika metafaznih kromosoma s dva izokromosoma Xq-kromosoma (crvene strelice) (ljubaznošću dr.sc. Feodore Stipoljev, izv.prof.).

Za $i(Xq)$ kod $45,X/46,Xi(Xq)$ utvrđeno je da je jednaka vjerojatnost da potječe od majke ili od oca. Proces nastajanja izokromosoma može započeti u premejotskoj gameti, za vrijeme podjele stanica u mejozi ili u postzigotskoj diobi stanica normalnog ploda ili ploda s trisomijom (Gardner *i sur.*, 2011.).

1.3.3. Prisutnost Y-sekvence kod pacijentica s Turnerovim sindromom

Detekcija prisutnosti sekvenci karakterističnih za Y-kromosom kod pacijentica s Turnerovim sindromom je potrebna kako bi se spriječio nastanak gonadoblastoma (Ramos, 2007.). Posebno je važno obratiti pažnju kod pacijentica s naznakama hiperandrogenizma, jer je moguće da terapijska primjena hormona rasta (somatotropina) zbog niskog rasta kod njih može dovesti do razvoja gonadoblastoma ili drugih tumora koji luče androgen (Rosen *i sur.*, 1988.; Oliveira *i sur.*, 2009.).

Gonadoblastom (GB) je tumor miješanih nediferenciranih stanica koje služe za razvoj gonada, a koji ima potencijal napredovanja prema invazivnom tipu germinativnog tumora (od eng. *Germ Cell Cancer*; GCC), posebno prema disgerminomu (u 60% slučajeva), dok može biti i komponenta drugih tumora kao što su embrijski karcinom, teratom, embrijski sinusni tumor i koriokarcinom (Scully, 1970.; Looijenga *i sur.*, 2003.; Saenger, 1993., Spoor *i sur.*, 2017.).

Zbog povećanog rizika od nastanka malignog tumora iz gonadoblastoma koji se kreće od 7 do 30% (Ranke *i sur.*, 2001.), preporuča se kirurško odstranjivanje disgenetičnih gonada

kod pacijentica s mozaičnim oblikom TS-a kada je dokazana prisutnost Y-kromosoma (Coyle *i sur.*, 2016.).

1.4. Dosadašnja istraživanja

Citogenetički utvrđeni mozaični oblici TS-a sa staničnim linijama koje imaju normalni ili abnormalni Y-kromosom pojavljuju se u 6-11% slučajeva (Patsalis *i sur.*, 1998.; Fernandes, 2013.). Pretpostavlja se da je postojanje kriptičnog mozaicizma za sekvence Y-kromosoma puno češće. Prema dostupnoj literaturi, uz pomoć PCR metode se kod 5-10% slučajeva kod kojih se citogenetičkom analizom nađe samo monosomija X-kromosoma, otkrije prisutnost Y-sekvenci (Semerci *i sur.*, 2007.). Precizna detekcija Y-kromosoma ili njegovih fragmenata, osim što je klinički važna zbog veće šanse za razvoj tumora tijekom života, omogućava i bolje razumijevanje svojstava vezanih za pojedine regije spolnih kromosoma (Fernandes, 2013.).

Uz sekvencu gena *SRY* (od eng. *Sex determining region Y*), sekvenca za gen *DYZ3* (od eng. *Human Y-chromosome specific repeated DNA family located in centromeric region*) je druga najčešća sekvenca koja se upotrebljava u studijama TS-a (Hook i Warburton, 1983.). Općenito, *SRY* je gen koji se najčešće koristi zbog svoje pozicije i važne uloge u kaskadi spolne diferencijacije (Harley *i sur.*, 2002.).

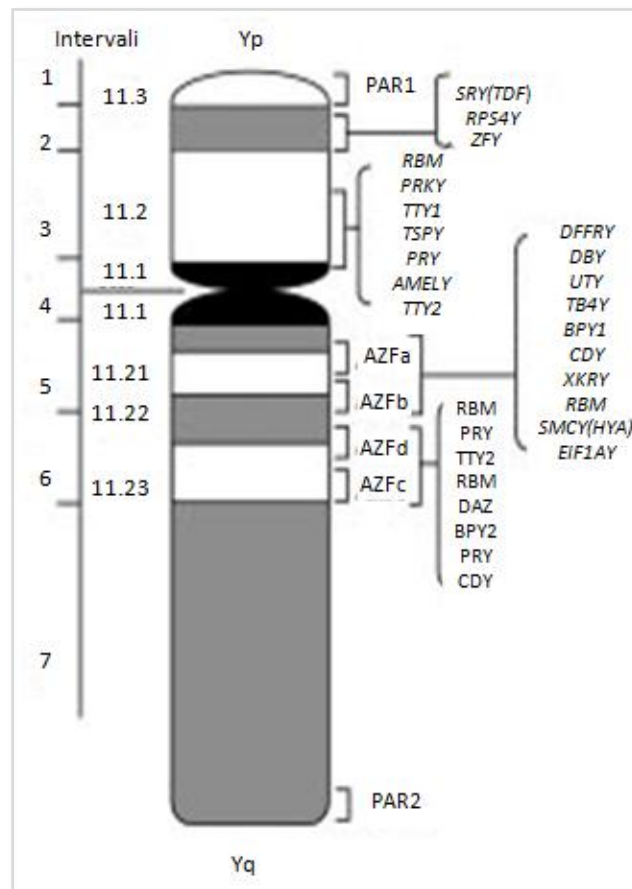
Ipak, uz identifikaciju novih gena na Y-kromosomu i, do sada nepotvrđenu, sumnju da postoji određeni gen povezan s razvojem gonadoblastoma, različite regije se povezuju s nastankom ovog tumora (Tsuchiya *i sur.*, 1995.). Najnovija istraživanja ukazuju da bi gen *TSPY* mogao biti kandidatni gen (Page, 1987.; Spoor *i sur.*, 2017.).

Međutim, literaturni podatci koji opisuju molekularno analizirane pobačene plodove prvog tromjesečja kod kojih se citogenetičkom analizom dokazalo da se radi o Turnerovom sindromu vrlo su oskudni. Autorica Fernandes u radu iz 2013. godine prva objavljuje rezultate o otkrivanju prisutnosti dijelova Y-kromosoma (*SRY* i *TSPY*) kod pobačenih plodova s kariotipom 45,X te poziva na daljnja istraživanja. Pretpostavlja mogućnost da je prisutnost dijelova Y-kromosoma uz monosomiju X-kromosoma otegotni faktor razvoja ploda i da pridonosi težini fenotipa kao i mogućnosti gubitka ploda.

1.4.1. Sekvence Y-kromosoma povezane s Turnerovim sindromom

Y-kromosom sadrži više od 59 milijuna bp i čini gotovo 2% ukupne DNA u ljudskim stanicama. Sadrži pseudoautosomne, eukromatinske i heterokromatinske regije koje su bogate ponavljajućim sekvencama te 220 gena (104 kodirajuća gena, 111 pseudogena i pet nekategoriziranih gena) (Slika 13). Ova 104 kodirajuća gena kodiraju približno 48 proteina/proteinskih porodica. Bilo da su kodirajući ili nekodirajući, većina gena je neophodna za normalan razvoj muških spolnih obilježja ili funkcionalnu spermatogenezu.

Kroz evoluciju, Y je postao najmanji kromosom koji ujedno sadrži i najmanje gena, ali njegovi se geni pojavljuju u najvećem broju kopija što se posebno odnosi na gene vezane za spermatogenezu (Li *i sur.*, 2008.).



Slika 13 Genska mapa ljudskog Y-kromosoma. Y je podijeljen na sedam intervala. Faktori azoospermije (AZF; eng. *Azoospermia factor*) su podijeljeni na regije AZFa, AZFb, AZFc i AZFd koje su u 5 i 6 intervalu. *PAR1* i *PAR2* označavaju pseudoautosomne regije (prilagođeno; preuzeto iz Ma *i sur.*, 2000.).

Na krajevima Y-kromosoma nalaze se pseudoautosomne regije *PAR1* (2,6 Mb) i *PAR2* (320 pb). Između njih se nalazi regija s genima karakterističnima za Y-kromosom koja nije uključena u rekombinaciju između gonosoma (Skaletsky *i sur.*, 2003.). Poznata je pod nazivima: nerekombinirajući Y (od eng. *Non-recombining Y*; *NR1*), nerekombinirajuća regija Y (od eng. *Non-recombining portion Y*; *NRPY*) te karakteristično muški Y (od eng. *Male-specific Y*; *MSY*) (Jobling i Tyler-Smith, 2003.). Regija obuhvaća više od 95% od ukupnog Y-kromosoma, a sastoji se od eukromatina i dijelova heterokromatina bogatog ponavljajućim slijedovima.

Unutar područja *MSY* nalazi se regija faktora azoospermije (čak 16 od 48 genskih produkata kodirajućih gena Y-kromosoma pripada regiji ovog faktora). Položaj regije faktora azoospermije na Y-kromosomu (od eng. *Azoospermia factor*; *AZF*) prikazuje Slika 13. Otkriveno je da su mikrodelecije unutar ove regije glavni uzrok muške neplodnosti i u

ovisnosti o tome koje točno područje zahvaćaju mogu uzrokovati posljedice u rasponu od teratozoospermije do azospermije (Li *i sur.*, 2008.).

1.4.1.1. Gen SRY

Gen *SRY* (od eng. *Sex determining region Y*) duljine 3,8 kb, ne sadrži introne (Su i Lau, 1993.). Jedan je od glavnih gena odgovornih za razvoj muških spolnih obilježja kod ljudi. Kodira transkripcijski faktor gena okidača razvoja testisa i ima ključnu ulogu u spolnoj diferencijaciji i razvoju kod muškaraca. Nalazi se u distalnoj regiji kratkog kraka Y-kromosoma (Sinclair *i sur.*, 1990.) (Yp11.2). Ekspresija gena *SRY* pokreće mrežu genskih aktivnosti koje transformiraju nediferenciranu gonadu u testis (El-Eshmawy *i sur.*, 2013.).

1.4.1.2. Geni DYZI i DYZ3

Dugi krak Y-kromosoma je bogat raznim vrstama ponavljajuće DNA. *DYZI* i *DYZ3* (od eng. *Human Y-chromosome specific repeated DNA family*) su dvije regije Y-kromosoma unutar kojih se nalaze specifične ponavljajuće sekvence DNA (alfa-satelitna DNA). *DYZI* se nalazi na dugom kraku Y-kromosoma (Yq12). Kod zdravih muškaraca se pojavljuje u 3000 do 4300 kopija. Kod pacijenata s rakom prostate (RP, od rak prostate), pacijenticama s uzastopnim pobačajima (UP, od uzastopni pobačaji) ili kod muškaraca koji su bili izloženi prirodnom pozadinskom zračenju (PPZ, od prirodno pozadinsko zračenje), otkriveno je da je broj kopija *DYZI* značajno fluktuirao. Broj kopija gena bio je u korelaciji s genskim anomalijama (smanjen kod UP i značajno smanjen kod RP, te visoko varijabilan kod PPZ) pa je zaključeno da *DYZI* ima ključnu ulogu u slaganju i održavanju strukturne cjelovitosti Y-kromosoma (Pathak *i sur.*, 2006.).

DYZ3 se nalazi u centromernoj regiji (Yp11.1-q11.1) i dijeli 95% homologije s genom *DXZ3* X-kromosoma (Pathak *i sur.*, 2006.). Često se koristi za procjenu broja kopija Y-kromosoma.

Kotzot i suradnici (2002.) opisuju pacijenticu s mozaičnim oblikom TS i staničnom linijom sa strukturno promijenjenim Y-kromosomom na kojem je bio prisutan *SRY*, dok su *DYZI* i *DYZ3* bili deletirani. Fenotipske osobitosti TS-a su prisutne: nizak rast, vanjsko žensko spolovilo, bilatelarno tračci gonada, unilateralno gonadoblastom i kariotip 46,X,del(Y)(q11)/45,X što pokazuje široki raspon fenotipa kod mozaičnih oblika unatoč prisutnosti dominirajuće *SRY* pozitivne stanične linije unutar različitih tkiva.

1.4.1.3. Gen TSPY

Gen *TSPY* (od eng. *Testis-specific protein, Y-encoded*) kodira protein koji se nalazi samo u testisima i vjerojatno je uključen u spermatogenezu. Citogenetička i molekularna

istraživanja su potvrdila da se *TSPY* nalazi u kromosomskoj regiji Yp11.2. Autori Hildenbrand i suradnici (1999.) su istraživali tkiva gonade s GB pomoću imunohistokemije i otkrili veliku razinu ekspresije proteina *TSPY*. Smatra se kandidatnim genom za *GBY* lokus (od eng. *Gonadoblastoma locus on Y chromosome*) i možda je direktno povezan s nastankom gonadoblastoma i *GBY* regijom unutar Y-kromosoma (Page, 1987.; Salo *i sur.*, 1995.) jer se eksprimira u visokim razinama u GCNIS-u (od eng. *Germ cell neoplasia in situ; in situ* neoplazija germinativnih stanica) i GB-u, što ukazuje na njegovu onkogenu funkciju. Uključen je i u regulaciju staničnog ciklusa, a protein *TSPY* se nalazi u spermatogoniji koja se normalno razvija (Oram *i sur.*, 2006.; Cools *i sur.*, 2011.; Li *i sur.*, 2007.). Kod većine tumorskih stanica, nakon invazivnog rasta, gubi se ekspresija *TSPY*. Međutim, prisutnost *TSPY* u predinvazivnoj fazi korelira s identifikacijom malignih germinativnih stanica naspram kasnosazrijevajućih germinativnih stanica (Kaprova-Pleskacova *i sur.*, 2014.). Bolesnici s Turnerovim sindromom mogu imati povećani rizik od gonadalnog GCC-a, koji je vjerojatno povezan sa skrivenom prisutnošću (mozaikom) regije *GBY* (Bianco *i sur.*, 2006.; Freriks *i sur.*, 2013.).

1.4.1.4. Gen DDX3Y

Za gen *DDX3Y* (od eng. *DEAD-box helicase 3, Y-linked*) se smatra da je glavni faktor azoospermije a (od eng. *Azoospermia Factor a; AZFa*). Nalazi se u kromosomskoj regiji Yq11.221. Funkcionalnost ovog gena potrebna je za plodnost kod muškaraca. Pronađeno je da je u muškaraca sa sindromom Sertolijevih stanica, SCOS-om (od eng. *Sertoli-Cell-Only-Syndrome*), ovaj gen deletiran (Foresta *i sur.*, 2000.). Ditton i suradnici (2004.) su pronašli izrazitu transkripciju i *DDX3Y* i njegovog homologa na X-kromosomu kod svih tkiva koja su testirali, a najviše u tkivima testisa. Ipak, translacija *DDX3Y* je otkrivena samo kod stanica muškog podrijetla, dok je protein *DDX3X* eksprimiran u svim analiziranim tkivima. Zaključili su da ova dva homologa, iako strukturalno slične RNA helikaze, imaju različite uloge. Predlažu da je gen *DDX3Y* najvjerojatniji uzrok teške testikularne patologije koja se uočava kod muškaraca s delecijama regije *AZFa*.

1.4.1.5. Gen HSFY

Gen *HSFY* (od eng. *Heat shock transcription factor, Y-linked 1*) se nalazi u regiji *AZFb* (od eng. *Azoospermia Factor b; AZFb*) Y-kromosoma, Yq11.222. Nalazi se unutar specifično muške regije (od eng. *male-specific region; MSY; karakteristično muška regija*) koja nije uključena u rekombinaciju između X- i Y-kromosoma. Nije pronađen homolog *HSFY* (Skaletsky *i sur.*, 2003.). Delecijom ovog gena nastaje teža muška neplodnost. Pripada obitelji

proteina HSF (od eng. *Heat Shock Factor*; faktor toplinskog šoka) za koju se pokazalo da je uključena u spermatogenezu i kod životinja i kod ljudi (Tessari *i sur.*, 2004.).

1.4.1.6. Gen PABY

Gen *PABY* (od eng. *Pseudoautosomal boundary region, Y-linked*) je regija koja se nalazi distalno na Yp11.3. Istraživanja su pokazala da neke pacijentice s TS-om imaju sekvencu za ovaj gen (Bashamboo *i sur.*, 2005.; Semerci *i sur.*, 2007.).

1.4.1.7. Gen AMXY

Gen *AMXY* (od eng. *Amelogenin, X- and Y-linked*) je gen koji je prisutan i na X- i na Y-kromosomu u jednoj kopiji. Na X-kromosomu se nalazi u kromosomskoj regiji Xp22.2 dok se na Y-kromosomu nalazi u Yp11.2. Gen kodira protein amelogenin koji čini 90% organskog sadržaja zubne cakline (Gibson *i sur.*, 2001.). Koristi se kao dodatna genska kontrola u istraživanjima spolnih kromosoma (Fernandes, 2013.).

2. CILJ I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je utvrditi potencijalnu prisutnost lokusa mapiranih na Y-kromosomu kod pobačenih plodova s Turnerovim sindromom i kod kontrolne skupine s urednim kariotipom.

Hipoteza istraživanja je da su rani prekidi trudnoće kod kariotipa specifičnog za Turnerov sindrom izazvani razvojnim mehanizmima u kojima ulogu imaju sekvence Y-kromosoma ugrađene u genom kariotipa 45,X.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci

U istraživanju je kao kontrolna skupina korištena skupina od 14 uzoraka spontanih pobačaja, sedam s normalnim ženskim i sedam s normalnim muškim kariotipom. Ispitivanu skupinu činila su 23 uzorka spontano pobačenih plodova kod kojih je citogenetički dokazan Turnerov sindrom. Svih 14 kontrolnih uzoraka bili su nativni uzorci korionskih resica.

Ispitivana skupina obuhvatila je 23 uzorka spontano pobačenih plodova prvog i drugog tromjesečja trudnoće. Za neke od ispitivanih uzoraka bilo je dostupno više vrsta tkiva pa je DNA izolirana iz ukupno 30 tkiva. Kod plodova koji su imali dostupno više tkiva za izolaciju DNA odabrani su oni uzorci iz kojih je dobivena DNA veće koncentracije i bolje kvalitete. Ukupno je tako istraživanje provedeno na uzorcima 23 ploda i to dva uzorka kože ploda, 20 uzoraka posteljinih tkiva (tri kulture tkiva posteljice i 17 nativnih izolata korionskih resica), te jednom uzorku kulture stanica plodove vode.

Kontrolni uzorci su primljeni iz bolnice KB Sv. Duh bez identifikacijskih oznaka spola. Uzorci na kojima se provodilo istraživanje imali su određen kariotip Turnerovog sindroma.

3.2. Citogenetička analiza uzoraka

Citogenetička analiza svih kontrolnih i ispitivanih uzoraka (ukupno 37 uzoraka) provela se u Odjelu za laboratorijsku citogenetiku Klinike za ginekologiju i porodništvo Kliničke bolnice „Sveti Duh“. Kariotipizacijom su utvrđeni uzorci koji imaju uredan muški i ženski kariotip te predstavljaju kontrolnu skupinu (ukupno 14), kao i oni koji imaju kariotip koji odgovara Turnerovom sindromu pa su ti uzorci odabrani za ispitivanu skupinu (ukupno 23).

Kultura stanica plodove vode

Uzorak 20 ml plodove vode koji se dobio nakon amniocenteze kultivirao se u bočicama s hranjivim medijem AmniomedPlus u inkubatoru na 37°C i 5% CO₂. Uz pomoć invertnog mikroskopa pratio se rast kolonija, a kada su kolonije postigle svoju zrelost, prekinuo se rast dodavanjem tri kapi 4% kolhicina. U bočice se zatim dodao prethodno zagrijani 0.25% tripsin, te su se strugalicom odstranile stanice i kolonije s dna bočice. Suspenzija se prebacila u epruvete pa centrifugirala 10 minuta na 1000 okr/min kako bi se odvojio supernatant do taloga. Dodano je 4-5 ml hipotonične otopine 0.75M KCl-a nakon čega su stanice kratko inkubirane. Zatim se dodalo 2 ml fiksativa (metanol 3:1 ledena octena kiselina) te ponovno centrifugiralo otopinu kako bi se odvojio supernatant do taloga. Talog se ispirao još tri puta u fiksativu i jedan put u čistoj ledenoj octenoj kiselini, te se zatim stavljao na 2-3 mokra i hladna predmetna stakla na vodenoj kupelji zagrijanoj na 35°C. Za kulturu kože ploda

postupak je isti samo se uzorak prethodno fizički usitni i nasađuje u tri primarne stanične kulture.

Kultura stanica korionskih resica

Uzorak korionskih resica se aspirirao u medicinsku špricu s medijem RPMI (RPMI, od eng. *Roswell Park Memorial Insititute Medium*) uz dodatak antikoagulansa heparina. Za odgovarajuću analizu potrebno je 5–20 mg korionskih resica. Pod invertnim mikroskopom uzorak je pažljivo očišćen od mogućih primjesa majčinog tkiva. Za potrebe kromosomske analize uspostavljena su dva tipa kulture stanica: kratkotrajna kultura i dugotrajna kultura stanica.

Za kratkotrajnu kulturu resice su očišćene i stavljene u epruvete s hranjivim medijem (AmniomedPlus) i inkubirane na 37°C i 5% CO₂ tijekom 5 sati, pa zatim stavljene u frižider na +4°C preko noći. Ujutro su epruvete ponovno prenesene u inkubator i inkubirane narednih pet sati. Dodatkom 80 µl 4% kolhicina zaustavljen je rast stanica nakon čega je uslijedilo centrifugiranje tijekom 5 minuta na 1000 okr/min kako bi se odvojio supernatant od resica. Uklonio se supernatant i dodalo se 4 ml 1%-og Na-citrata i ostavilo na sobnoj temperaturi. Nakon toga se centrifugiranjem ponovno odvojilo supernatant od taloga te se 2 puta ispiralo u fiksativu (metanol 2:1 ledena octena kiselina). Zadnji put se dodalo 60%-tne octene kiseline i zatim stavilo talog na 3 mokra i hladna predmetna stakla na vodenoj kupelji zagrijanoj na 35°C.

Kod dugotrajne kulture očišćene resice se tretiraju u 2 ml toplog 0.25% tripsina tijekom 90 minuta u inkubatoru kako bi se odvojio površinski sloj citotrofoblasta. Uzorak se centrifugira tijekom 5 minuta na 1000 okr/min. Daljnji postupak je isti kao kod kultivacije stanica plodove vode.

Izrada kariograma/kariotipa

Uzorci na staklima obojeni su Giemsa-om. Stakla se tretiraju 0.25 %-tnim tripsinom 2-15 s, isperu Ringer-ovom otopinom, tretiraju Giemsa-om 6 min., isperu fosfatnim puferom i na kraju destiliranom vodom. Nakon bojenja stakla se osuše i analiziraju pod mikroskopom.

Za svaki uzorak analizira se najmanje 20 metafaza koje trebaju prikazivati isti kariotip. Metafaze su slikane, a zatim složene uz pomoć softverskog programa CytoVision.

3.3. Izolacija DNA, provjera koncentracije i kvalitete i statistička analiza

Iz uzoraka tkiva i stanica pobačenih plodova zamrznutih na -20°C u Odjelu za laboratorijsku citogenetiku Klinike za ginekologiju i porodništvo Kliničke bolnice „Sveti Duh“, izolirala se DNA (od eng. *Deoxyribonucleic acid*) u Laboratoriju za molekularnu biologiju, PMF Zagreb uz pomoć seta kemikalija za izolaciju DNA (DNeasy® Blood &

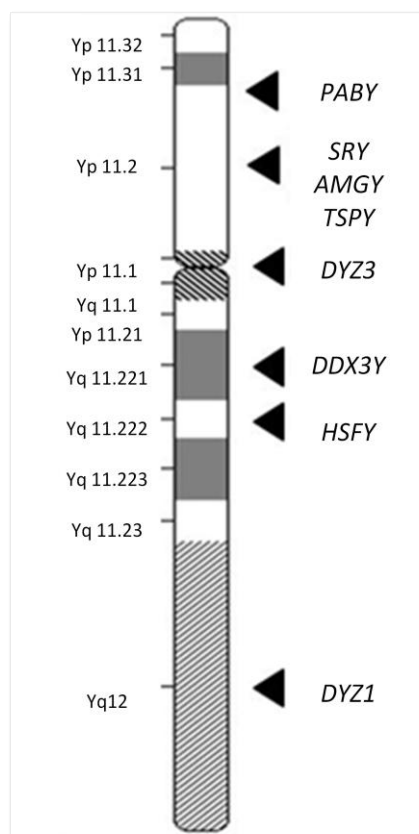
Tissue Kit; Qiagen). Uzorci su centrifugirani (prvi puta 2 minute na 7500 rpm, a drugi puta 2 minute na 10500 rpm) kako bi se odvojio supernatant od taloga te im je nakon toga dodano 180 μ l pufera ATL. Zatim je dodano 20 μ l proteinaze K i uzorci su dobro promiješani (pomoću vorteksa) i inkubirani na 56°C do potpune lize uz povremeno miješanje. Nakon toga uzorcima je dodano zasebno prvo 200 μ l pufera AL, a potom 200 μ l 100%-tnog etanola. Odmah nakon dodavanja svakog od ova dva reagensa, uzorci su dobro promiješani. Dobivene otopine pročišćene su od neželjenih materijala centrifugiranjem kroz kolonice iz DNeasy kompleta. Jednom se centrifugiralo bez dodatka ikakvog reagensa (1 minuta na 8000 rpm), zatim se jednom kolonice ispralo s 500 μ l pufera AW1 (1 minuta na 8000 rpm) i jednom s 500 μ l pufera AW2 (3 minute na 14000 rpm) kako bi na kolonicama ostala vezana što čišća DNA. Prilikom posljednjeg centrifugiranja (1 minutu na 8000 rpm) na kolonice je dodano 100 μ l elucijskog pufera AE (inkubacija 1 minutu na sobnoj temperaturi). Ovaj zadnji korak ponovljen je dva puta kako bi dobili dva eluata za svaki uzorak od kojih je drugi eluat služio kao rezerva u slučaju zagađenja ili gubitka prvog eluata.

Budući da je za daljnje testove istraživanja ključna količina i čistoća izolirane DNA svi su izolati spektrofotometrijski analizirani (NanoVue Plus™ Spectrophotometer; Biochrom). Za svaki uzorak napravljena su tri mjerenja čistoće i koncentracije, te je uzeta srednja vrijednost. Mjerenje je standardizirano elucijskim puferom (AE) iz seta za izolaciju DNA.

Uz pomoć programa Microsoft Office Excel 2007 izračunate su srednje vrijednosti i standardne devijacije spektrofotometrijski dobivenih podataka o kvaliteti (omjer A260/A280, omjer A260/A230) i koncentraciji (μ g/ml) izolirane DNA svih kontrolnih i ispitivanih uzoraka. U programu IBM SPSS Statistics v22 izračunati su Pearsonovi koeficijenti korelacije i p-vrijednosti za podatke o kvaliteti i koncentraciji DNA u odnosu na godinu uzorkovanja za sve uzorke. Istim programom izrađen je i grafički prikaz korelacije koncentracije DNA s godinama uzorkovanja.

3.4. Lančana reakcija polimerazom

Pregledom dostupne literature odabralo se osam sekvenci za utvrđivanje prisutnosti osam gena karakterističnih za Y-kromosom. Odabrani geni za ovo istraživanje bili su: *SRY*, *DYZ3*, *DYZ1*, *TSPY*, *DDX3Y*, *HSFY*, *PABY* i *AMXY* (*AMGX* i *AMGY*) (Slika 14).



Slika 14 Ideogram Y-kromosoma za gene *PABY*, *SRY*, *AMGY* (*AMXY*), *TSPY*, *DYZ3*, *DDX3Y*, *HSFY*, *DYZ1* koji su korišteni za analizu uzoraka.

Za *SRY* koristila su se dva različita para početnica kako bi dobili dva produkta različite duljine (93 pb i 270 pb) zbog dodatne kontrole metode.

Početnice za gen *AMXY* odabrane su tako da umnažaju fragment duljine 432 bp na X-kromosomu i fragment istoga gena duljine 250 pb na Y-kromosomu. Time je ovaj test ujedno i interna kontrola kvalitete uzorka. Reakcija koja umnaža gen za amelogenin nužno će dati produkt veličine 432 bp ako je prisutan X-kromosom, tj. onaj duljine 250 pb ako je prisutan Y-kromosom. U slučaju urednog ženskog kariotipa ili Turnerovog sindroma koji nema Y-sekvencu, umnožit će se jedan produkt veličine 432 pb, a u slučaju urednog muškog kariotipa ili Turnerovog sindroma koji ima sekvencu Y-kromosoma za amelogenin, umnožit će se 2 produkta: jedan duljine 432 pb, drugi duljine 250 pb.

Kao što je vidljivo na Slici 14, odabrani geni raspoređeni su duž cijelog Y-kromosoma. U Tablici 2 navedeni su puni nazivi gena i duljine sekvenci njihovih PCR-produkata.

Odabrane sekvence početnica koje umnažaju gene specifične za Y-kromosom analizirane su lančanom reakcijom polimerazom (PCR) uz pomoć instrumenata za PCR (ProFlex™ 3x32-well PCR System i Veriti Dx Thermal Cycler; Thermo Fisher Scientific). Početnice (10 μM) i očekivane veličine PCR produkata su prikazane u Tablici 2.

Ukupan volumen smjese za PCR reakciju bio je 25 μ l s izoliranom DNA (1 μ l), nizvodnim (od eng. *forward*) i uzvodnim (od eng. *reverse*) početnicama (po 0.5 μ l svake početnice), DNA polimerazom (0,125 μ l HotStarTaq DNA), puferom (2,5 μ l 10x Gold Buffer), otopinom MgCl₂ (1,5 μ l 25 Mm) i mješavinom nukleotida dNTP Mix (0.5 μ l 10mM; Qiagen). Za negativnu kontrolu korištena je voda pročišćena od DNA (1 μ l).

Osnova reakcija umnažanja određenih dijelova DNA u instrumentima za PCR za sve uzorke bila je sljedeća:

- početna aktivacija HotStarTaq DNA polimeraze na 95°C u trajanju od 10 min,
- početna denaturacija na 94°C ili 95°C (uvjeti prema potrebi za umnažanje određene sekvence)
- ciklus denaturacije, hibridizacije i elongacije (uvjeti i broj ponavljanja prema potrebi za umnažanje određene sekvence)
- završna elongacija na 72°C 10 minuta.

Svi setovi početnica i uvjeti reakcija su validirani na staničnim linijama poznatih kariotipova s utvrđenom prisutnošću Y- i/ili X-kromosoma. Nakon PCR reakcije produkti su pohranjeni na +4°C ili odmah upotrijebljeni za gel elektroforezu. Svi optimizirani protokoli za PCR reakcije prikazani su u Tablici 3.

Tablica 2 Sekvence koje su se koristile za utvrđivanje prisutnosti osam gena u ovom istraživanju (*SRY* (93 pb), *SRY* (270 pb), *PABY*, *AMXY*, *TSPY*, *DDX3Y*, *HSFY*, *DYZ1* i *DYZ3*).

| Naziv početnice | Puni naziv gena početnice na engleskom jeziku | Lokacija gena početnice na Y-kromosomu | Sekvenca nizvodne i uzvodne početnice u smjeru 5'→3' | Veličina PCR produkta (pb) |
|-----------------|--|--|---|----------------------------|
| SRY (93 pb) | <i>Sex determining region Y</i> | Yp11.2 | ATAAGTATCGACCTCGTCGGAAG GCACTTCGCTGCAGAGTACCGAAG | 93 |
| SRY (270 pb) | | | CAGTGTGAAACGGGAGAAAACAGT CTCCGACGAGGTCGATACTTATA | 270 |
| PABY | <i>Pseudoautosomal boundary region, Y-linked</i> | Yp11.3 | GTACTACCTTTAGAAAACCTAGTATTTTCCC GAATTCTTAACAGGACCCATTTAGGATTAA | 970 |
| AMXY(AMGX/AMGY) | <i>Amelogenin, X- and Y-linked</i> | Xp22.2,Yp11.2 | CTGATGGTTGGCCTCAAGCCT ATGAGGAAACCAGGGTTCCA | 432(X) 250(Y) |
| DYZ3 | <i>Human Y-chromosome specific repeated DNA family located in centromeric region</i> | Yp11.1-q11.1 | ATGATAGAAACGGAAATATG AGTAGAATGCAAAGGGCTCC | 120 (172) |
| TSPY | <i>Testis-specific protein, Y-encoded</i> | Yp11.2 | CCTTTCATCCCAACCTTTATTTCCA GCAGTCATGTTTCAGCCAAACAGC | 273 |
| DDX3Y | <i>DEAD-box helicase 3, Y-linked</i> | Yq11.221 | ATCGACAAAGTAGTGGTTCC AGATTCAGTTGCCCCACCAG | 688 |
| HSFY | <i>Heat shock transcription factor, Y-linked 1</i> | Yq11.222 | TGCACTCATGGAGACAACAG AACCAGGGTTTTACTGAAA | 1450 |
| DYZ1 | <i>Human Y-chromosome specific repeated DNA family located on the q arm</i> | Yq12 | TCCACTTTATTCAGGCCTGTCC TTGAATGGAATGGGAACGAATGG | 149 (154) |

Tablica 3 Prikaz optimiziranih protokola za sve sekvence odabranih gena.

| Naziv sekvence gena | Protokol za PCR | | |
|---------------------|-----------------|--------------|--------------------------|
| | Temperatura | Trajanje | Broj ponavljanja ciklusa |
| SRY (93 pb) | 95°C | 10 min | 30 |
| | 94°C | 30 sek | |
| | 58°C | 30 sek | |
| | 72°C | 30 sek | |
| | 72°C | 10 min | |
| | 4°C | ∞ | |
| SRY(270 pb) | 95°C | 10 min | 35 |
| | 94°C | 1 min | |
| | 65°C | 1 min | |
| | 72°C | 1 min | |
| | 72°C | 10 min | |
| | 4°C | ∞ | |
| PABY | 95°C | 10 min | 35 |
| | 94°C | 1 min | |
| | 54°C | 1 min | |
| | 72°C | 1 min | |
| | 72°C | 10 min | |
| | 4°C | ∞ | |
| TSPY | 95°C | 10 min | 35 |
| | 94°C | 30 sek | |
| | 62°C | 30 sek | |
| | 72°C | 45 sek | |
| | 72°C | 10 min | |
| | 4°C | ∞ | |
| HSFY | 95°C | 10 min | 35 |
| | 94°C | 30 sek | |
| | 56°C | 30 sek | |
| | 72°C | 1 min 30 sek | |
| | 72°C | 10 min | |
| | 4°C | ∞ | |
| DDX3Y | 95°C | 10 min | 35 |
| | 94°C | 30 sek | |
| | 60°C | 30 sek | |
| | 72°C | 45 sek | |
| | 72°C | 10 min | |
| | 4°C | ∞ | |
| AMXY | 95°C | 10 min | 35 |
| | 94°C | 30 sek | |
| | 58°C | 30 sek | |
| | 72°C | 45 sek | |
| | 72°C | 10 min | |
| | 4°C | ∞ | |
| DYZ1 | 95°C | 10 min | 35 |
| | 94°C | 30 sek | |
| | 55°C | 30 sek | |
| | 72°C | 45 sek | |
| | 72°C | 10 min | |
| | 4°C | ∞ | |
| DYZ3 | 95°C | 10 min | 35 |
| | 94°C | 30 sek | |
| | 55°C | 30 sek | |
| | 72°C | 45 sek | |
| | 72°C | 10 min | |
| | 4°C | ∞ | |

3.5. Gel elektroforeza

Nakon svih testova lančanom reakcijom polimerazom učinjena je elektroforeza u 1,5% agaroznom gelu (agaroz (Glutathion-Agarose; lyophilised powder; Sigma-Aldrich) + 1xTAE pufer) na 120 V u trajanju od 30 do 55 minuta (ovisno o broju uzoraka i veličini kadice za elektroforezu) na uređaju za elektroforezu (PowerPac Basic Power Supply; BioRad).

Pri gel elektroforezi, upotrijebljeni su DNA-markeri od 100 pb (100 bp DNA Ladder; Solis Biodyne ili Mass Ruler DNA Ladder Mix; Thermo Fisher Scientific) te DNA-boje (Get Pilot, 5x; Qiagen ili 10xConcentrate CoralLoad; Qiagen,).

Za vizualizaciju na agaroznom gelu nakon elektroforeze, DNA je u mračnim uvjetima izložena otopini s etidijevim bromidom u trajanju od 20 do 50 minuta.

4. REZULTATI

4.1. Kariotipizacija

Najmanje 20 metafaza je pregledano za svaki uzorak. Sve metafaze jednog uzorka morale su predstavljati isti kariotip da analiza bude pouzdana i precizna. Uzorci s urednim ženskim (46,XX) i muškim (46,XY) kariotipom činili su kontrolnu skupinu, dok su uzorci s kariotipom 45,X i 45,X/46,XX činili ispitivanu skupinu tj. ispitanike s Turnerovim sindromom.

Uzorci pod šiframa od K1 do K14 bili su kontrolni uzorci. Sastojali su se od sedam uzoraka s normalnim muškim kariotipom (46,XY) i sedam uzoraka s normalnim ženskim kariotipom (46,XX).

Brojevima su označeni ispitivani uzorci s Turnerovim sindromom (45,X). Brojevi uzoraka su u rasponu od 1 do 30, no ukupan broj uzoraka/ispitanika je 23 jer su kod plodova koji su imali više tkiva odabrana samo ona koja su imala višu koncentraciju i bolju kvalitetu izolata DNA. Kod uzorka pod šifrom 29 utvrđena je prisutnost mozaičnog oblika Turnerova sindroma (mos45,X/46,XX) gdje je većina analiziranih stanica, njih 90%, pripadala staničnoj liniji kariotipa 45,X.

4.2. Izolacija DNA i statistička analiza

Izolacija DNA iz kontrolnih i ispitivanih uzoraka je izvedena uz pomoć DNeasy Blood & Tissue Kit-a u nekoliko navrata u razdoblju od rujna do prosinca 2016.godine. Za sve uzorke, prilikom izolacije, napravljena su dva eluata.

Iz uzorka broj 30 već je prethodno bila izolirana DNA dostupna nakon dijagnostičke obrade na Sv. Duhu te su za njega bili dostupni samo podaci prvog eluata.

U istraživanju su se dalje koristili alikvoti prvih eluata za sve uzorke. Rezultati su prikazani u Tablici 4 i Tablici 5.

Vrijednosti omjera A260/A280 kretale su se od 1,054 do 2,156 za prve eluate te su za 23 od ukupnih 37 bile u rasponu idealnih (62%). Vrijednosti omjera A260/A280 za druge eluate kretale su se od 0,881 do 2,736 te su za 19 uzoraka od ukupnih 36 bile u rasponu idealnih (53%). Srednja vrijednost ovog omjera bila je $1,757 \pm 0,24$ za prve eluate te $1,799 \pm 0,36$ za druge eluate. Izračunati su Pearsonov koeficijent korelacije i p-vrijednost između starosti uzorka (odnosno godine uzorkovanja) i omjera A260/A280 za prve eluate te su iznosili: $r(35) = 0,322$; $p = 0,052$.

Vrijednosti omjera A260/A230 kretale su se od -7,091 do 6,220 za prve eluate te su za 13 od ukupnih 37 (35%) bile u rasponu idealnih. Vrijednosti omjera A260/A230 za druge eluate kretale su se od -5,954 do 11,7 te su za 3 uzorka od ukupnih 36 (8,3%) bile u rasponu

idealnih. Srednja vrijednost ovog omjera bila je $1,685 \pm 1,82$ za prve eluate te $2,282 \pm 2,85$ za druge eluate. Izračunati su Pearsonov koeficijent korelacije i p-vrijednost između godine uzorkovanja i omjera A260/A230 za prve eluate, koja se nije statistički značajno razlikovala, te su iznosili: $r(35) = 0,133$; $p = 0,433$.

Koncentracije DNA kretale su se od $3,0 \mu\text{g/ml}$ do $1.531,0 \mu\text{g/ml}$ kod prvih eluata i od $7,0 \mu\text{g/ml}$ do $731,7 \mu\text{g/ml}$ kod drugih eluata. Srednja vrijednost bila je $146,5 \pm 305,28$ za prve eluate te $114,2 \pm 205,93$ za druge eluate. Budući da je za uspješnu PCR-reakciju potrebno od 1 ng do $1 \mu\text{g}$ po reakciji volumena $50 \mu\text{l}$ svi uzorci (100%) udovoljili su kriterijima potrebne koncentracije DNA. Izračunati su Pearsonov koeficijent korelacije i p-vrijednost između godine uzorkovanja i koncentracije izolirane DNA za prve eluate te su iznosili: $r(35) = 0,139$; $p = 0,413$. Grafički prikaz dobivenih podataka vidi se na Slici 15.

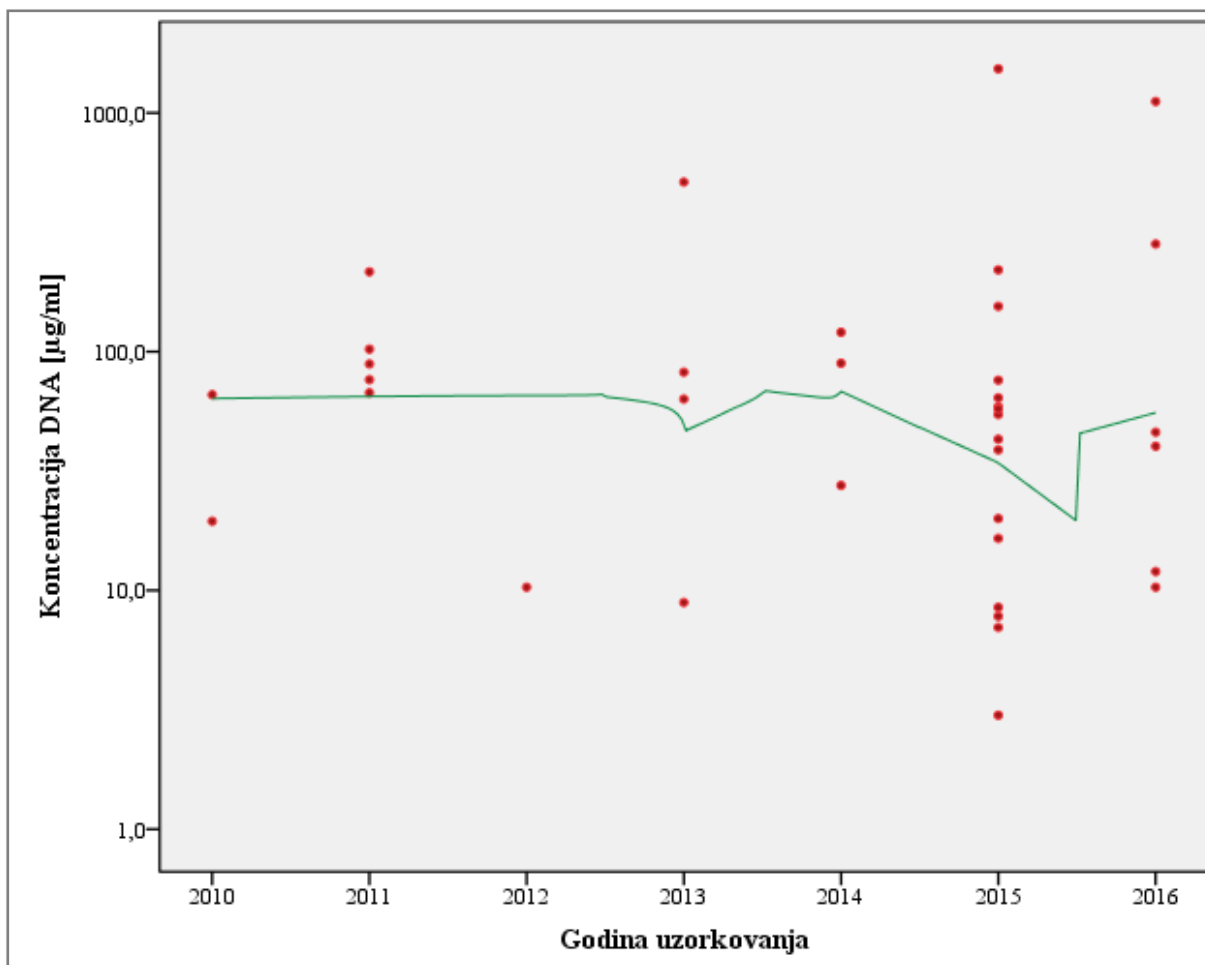
Tablica 4 Prikaz čistoće i koncentracije izolirane DNA iz kontrolnih uzoraka izmjerene pomoću spektrofotometrijskog uređaja. Šifre kontrolnih uzoraka za prve eluate su bile K1 – K14 , a za druge eluate 2K1 – 2K14.

| Vrsta uzorka | Šifra uzorka | Godina uzorkovanja | Vrsta tkiva/stanica | Vrijednosti za 1. Eluat | | | Vrijednosti za 2. eluat | | |
|------------------|--------------|--------------------|---------------------|-------------------------|-----------|---------------|-------------------------|-----------|---------------|
| | | | | A260/A280 | A260/A230 | KONC. [µg/ml] | A260/A280 | A260/A230 | KONC. [µg/ml] |
| Kontrolni uzorci | K1/2K1 | 2015. | tkivo posteljice | 1,911 | 1,955 | 43,0 | 1,888 | 2,543 | 22,0 |
| | K2/2K2 | 2015. | tkivo posteljice | 2,050 | 1,139 | 20,0 | 1,919 | 2,518 | 35,5 |
| | K3/2K3 | 2015. | tkivo posteljice | 1,866 | 1,528 | 16,5 | 2,642 | 11,7 | 7,0 |
| | K4/2K4 | 2013. | tkivo posteljice | 1,907 | 2,130 | 82,0 | 1,985 | 2,250 | 67,5 |
| | K5/2K5 | 2016. | tkivo posteljice | 1,957 | 2,629 | 46,0 | 2,105 | 2,540 | 24,0 |
| | K6/2K6 | 2012. | tkivo posteljice | 2,081 | 1,079 | 10,3 | 2,550 | 3,709 | 10,2 |
| | K7/2K7 | 2014. | tkivo posteljice | 1,913 | 2,386 | 120,5 | 1,949 | 2,338 | 76,0 |
| | K8/2K8 | 2010. | tkivo posteljice | 2,031 | 2,484 | 19,5 | 2,736 | -4,677 | 7,3 |
| | K9/2K9 | 2015. | tkivo posteljice | 1,787 | 2,477 | 54,5 | 2,000 | 2,562 | 41,0 |
| | K10/2K10 | 2015. | tkivo posteljice | 1,902 | -7,091 | 7,8 | 1,879 | 5,345 | 15,5 |
| | K11/2K11 | 2013. | tkivo posteljice | 1,421 | 1,642 | 8,9 | 1,810 | 2,478 | 57,0 |
| | K12/2K12 | 2015. | tkivo posteljice | 1,855 | 3,368 | 64,0 | 1,771 | 2,615 | 45,0 |
| | K13/1K13 | 2010. | tkivo posteljice | 1,833 | 2,870 | 66,0 | 1,615 | 2,100 | 42,0 |
| | K14/2K14 | 2016. | tkivo posteljice | 1,814 | 1,085 | 10,3 | 1,804 | 2,421 | 46,0 |

Tablica 5 Prikaz čistoće i koncentracije izolirane DNA iz ispitivanih uzoraka izmjerene pomoću spektrofotometrijskog uređaja. Šifre ispitivanih uzoraka za prve eluate su bile samo jednostavni brojevi, a za druge eluate oznaka 2/broj.

| Vrsta uzorka | Šifra uzorka | Godina uzorkovanja | Vrsta tkiva/stanica | Vrijednosti za 1. Eluat | | | Vrijednosti za 2. eluat | | |
|-------------------|--------------|--------------------|----------------------|-------------------------|-----------|---------------|-------------------------|-----------|---------------|
| | | | | A260/A280 | A260/A230 | KONC. [µg/ml] | A260/A280 | A260/A230 | KONC. [µg/ml] |
| Ispitivani uzorci | 1; 2/1 | 2016. | koža ploda | 1,814 | 2,087 | 1.116,8 | 1,830 | 2,477 | 704,2 |
| | 2; 2/2 | 2016. | tkivo posteljice | 1,826 | 1,842 | 282,3 | 1,773 | 2,750 | 67,2 |
| | 3; 2/3 | 2015. | tkivo posteljice | 1,704 | 1,536 | 1.531,0 | 1,738 | 1,631 | 731,7 |
| | 5; 2/5 | 2015. | tkivo posteljice | 1,868 | 2,137 | 154,9 | 1,718 | 3,410 | 75,0 |
| | 6; 2/6 | 2016. | tkivo posteljice | 1,822 | 1,325 | 40,2 | 1,619 | -5,954 | 10,9 |
| | 8; 2/8 | 2016. | tkivo posteljice | 1,874 | 1,561 | 12,0 | 1,727 | 3,528 | 12,1 |
| | 9; 2/9 | 2014. | tkivo posteljice | 1,830 | 1,874 | 27,5 | 1,832 | 7,034 | 28,5 |
| | 10; 2/10 | 2015. | tkivo posteljice; CC | 1,838 | 1,355 | 38,8 | 1,489 | 0,069 | 5,9 |
| | 12; 2/12 | 2015. | tkivo posteljice | 1,808 | 2,333 | 58,8 | 1,381 | 3,036 | 32,8 |
| | 13; 2/13 | 2015. | tkivo posteljice; CC | 1,054 | -1,161 | 3,0 | 0,881 | 3,012 | 9,1 |
| | 14; 2/14 | 2015. | tkivo posteljice | 1,800 | 1,813 | 220,0 | 1,639 | 2,118 | 97,7 |
| | 16; 2/16 | 2015. | tkivo posteljice; CC | 1,563 | 0,986 | 57,5 | 1,684 | 1,207 | 546,8 |
| | 17; 2/17 | 2015. | tkivo posteljice | 1,389 | 1,016 | 76,0 | 0,924 | -1,992 | 7,3 |
| | 18; 2/18 | 2015. | tkivo posteljice | 1,305 | 6,220 | 8,5 | 1,465 | -0,924 | 14,6 |
| | 19; 2/19 | 2011. | tkivo posteljice | 1,733 | 2,094 | 216,0 | 1,751 | 2,671 | 51,7 |
| | 20; 2/20 | 2011. | tkivo posteljice | 1,285 | 1,155 | 67,2 | 1,657 | 1,465 | 7,9 |
| | 21; 2/21 | 2011. | tkivo posteljice | 1,735 | 2,492 | 88,8 | 1,789 | 3,182 | 93,8 |
| | 22; 2/22 | 2011. | tkivo posteljice | 1,739 | 2,122 | 102,5 | 1,815 | 2,578 | 189,2 |
| | 23; 2/23 | 2013. | tkivo posteljice | 1,828 | 2,328 | 513,5 | 1,848 | 2,362 | 712,8 |
| | 25; 2/25 | 2013. | tkivo posteljice | 1,694 | 2,685 | 63,3 | 1,863 | 3,755 | 68,7 |
| 28; 2/28 | 2014. | koža ploda | 1,730 | 2,393 | 89,5 | 1,836 | 3,185 | 129,8 | |
| 29; 2/29 | 2011. | plodova voda | 1,292 | 1,422 | 76,3 | 1,876 | 1,100 | 17,2 | |
| 30 | 2015. | tkivo posteljice | 2,156 | 1,068 | 7,0 | | | | |

CC označava kulturu stanica (CC, od eng. Cell Culture).



Slika 15 Prikaz korelacije koncentracije DNA s godinom uzorkovanja za prve eluate. Crveni krugovi predstavljaju izmjerene vrijednosti, a zelena puna linija predstavlja LOESS (od eng. *Locally weighted scatterplot smoothing*) liniju trenda.

4.3. Rezultati PCR-analize

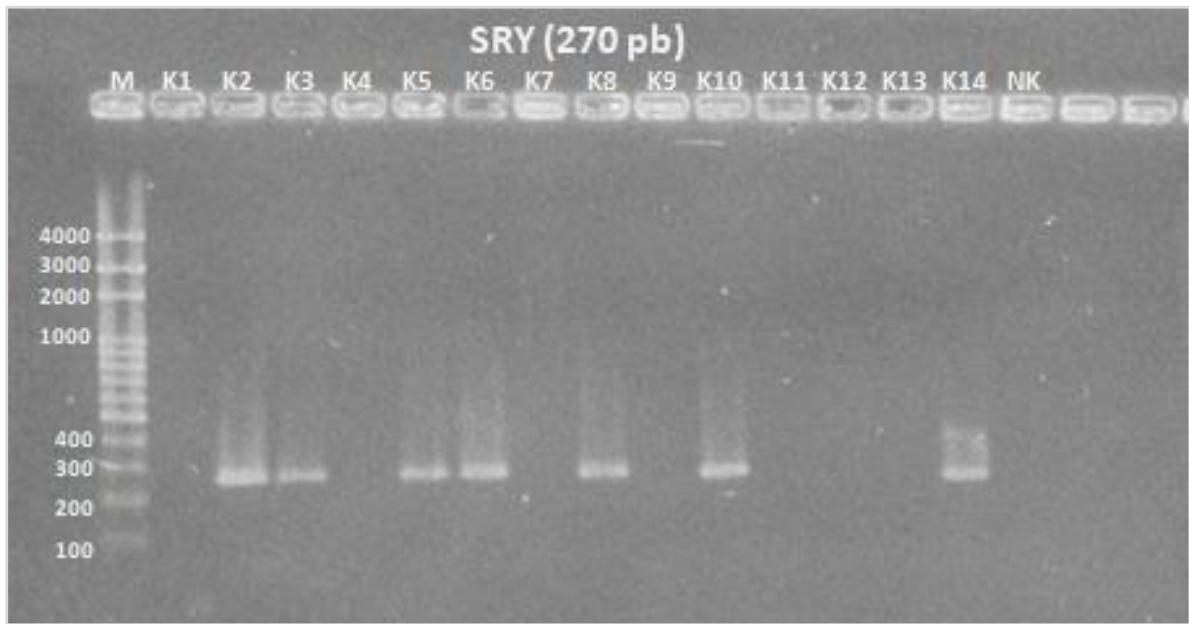
Ukupno 14 kontrolnih i 23 ispitivana uzorka su analizirana optimiziranim PCR-metodama nakon kojih je uslijedila elektroforeza u gelu. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 6.

4.3.1. Kontrolni uzorci

PCR-analiza je prvo provedena na kontrolnim uzorcima (slijepe probe) kako bi se optimizirali protokoli, provjerila pouzdanost metode i sljedivost u postupcima. Za 14 kontrolnih uzoraka ustanovljeno je da se radi o sedam muških (uzorci K2, K3, K5, K6, K8, K10 i K14) i sedam ženskih uzoraka (uzorci K1, K4, K7, K9, K11, K12 i K13). Muški uzorci su imali sekvence gena *SRY*, *PABY*, *AMXY*, *TSPY*, *DDX3Y*, *HSFY*, *DYZ1* i *DYZ3*. Ženski uzorci imali su sekvencu gena *AMXY* duljine 432 pb.

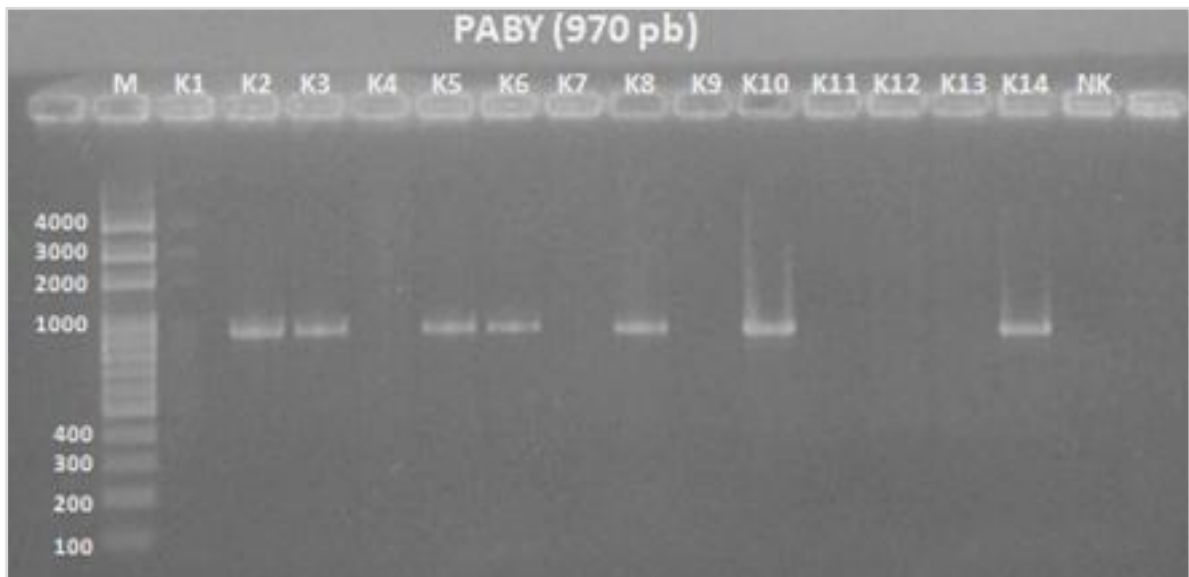
Za gen *SRY* korištene su dvije analize, jedna za umnažanje kraćeg fragmenta (93 pb) i druga za umnažanje duljeg fragmenta (270 pb). Budući da su svi muški uzorci imali obje sekvence i da su se slike elektroforetskih gelova ovih dviju sekvenci razlikovale jedino u

visini odgovarajuće vrpce, prikazan je samo gel s uzorcima kojima je umnožen dulji fragment (Slika 16).



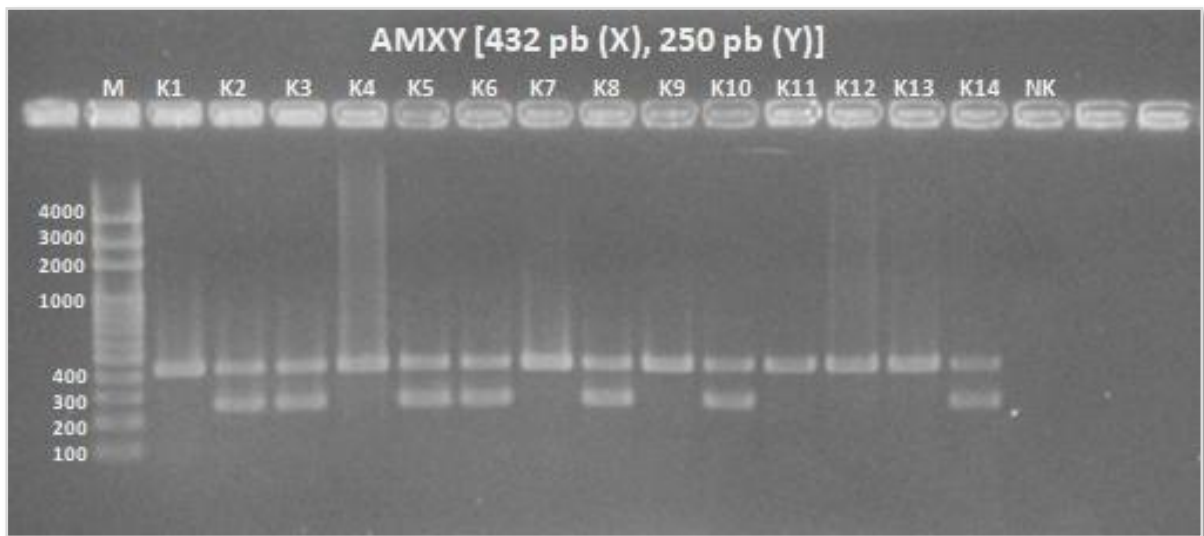
Slika 16 Slika elektroforetskog gela za dulji fragment gena *SRY* kod 14 kontrolnih uzoraka. Na slici je vidljivo da su uzorci K2, K3, K5, K6, K8, K10 i K14 dali pozitivan rezultat u obliku vidljive i specifične vrpce na odgovarajućoj visini (270 pb). Uzorak NK je negativna kontrola. M označava jažicu s markerom.

Obzirom da su svi muški uzorci imali sve sekvence gena Y-kromosoma, a gelovi za *PABY* (970 pb), *TSPY* (273 pb), *DDX3Y* (688 pb) i *HSFY* (1450 pb) se razlikuju jedino u visini odgovarajuće vrpce, na Slici 17 prikazan je samo elektroforetski gel za *PABY*.



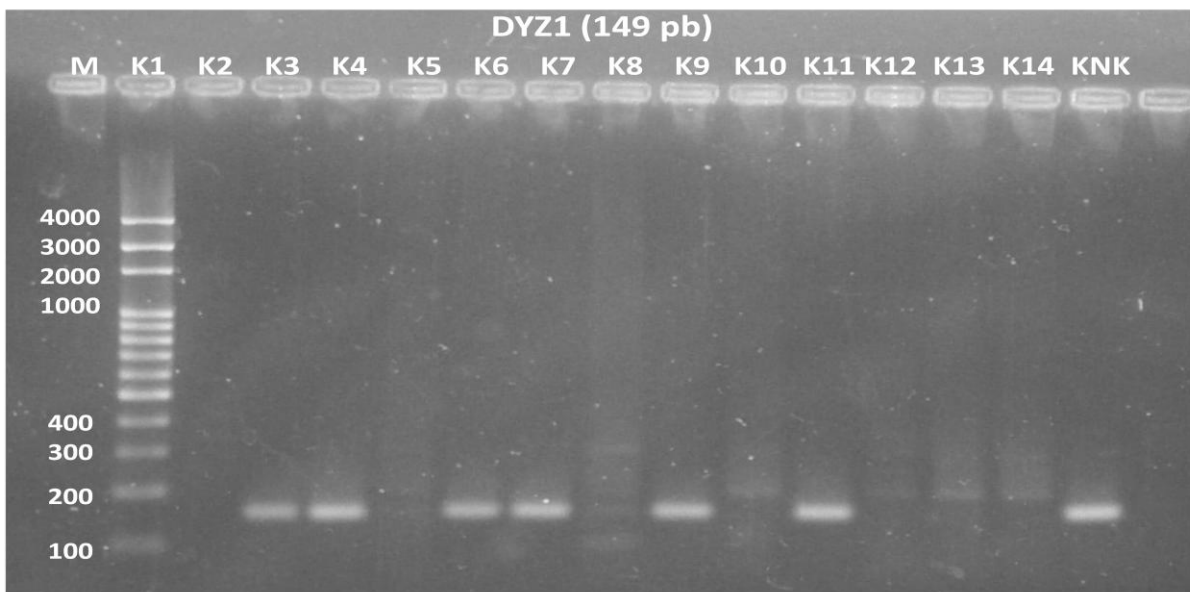
Slika 17 Slika elektroforetskog gela za fragment gena *PABY* kod 14 kontrolnih uzoraka. Na slici je vidljivo da su uzorci K2, K3, K5, K6, K8, K10 i K14 dali pozitivan rezultat u obliku vidljive i specifične vrpce na odgovarajućoj visini (970 pb). Uzorak NK je negativna kontrola. M označava jažicu s markerom.

Kod muškaraca su za sekvence za gen *AMXY* (odnosno *AMGX* i *AMGY*) bile prisutne obje vrpce na odgovarajućim visinama (Slika 18). Sukladno tome, kod ženskih uzoraka bila je prisutna samo jedna vrpca na odgovarajućoj visini.

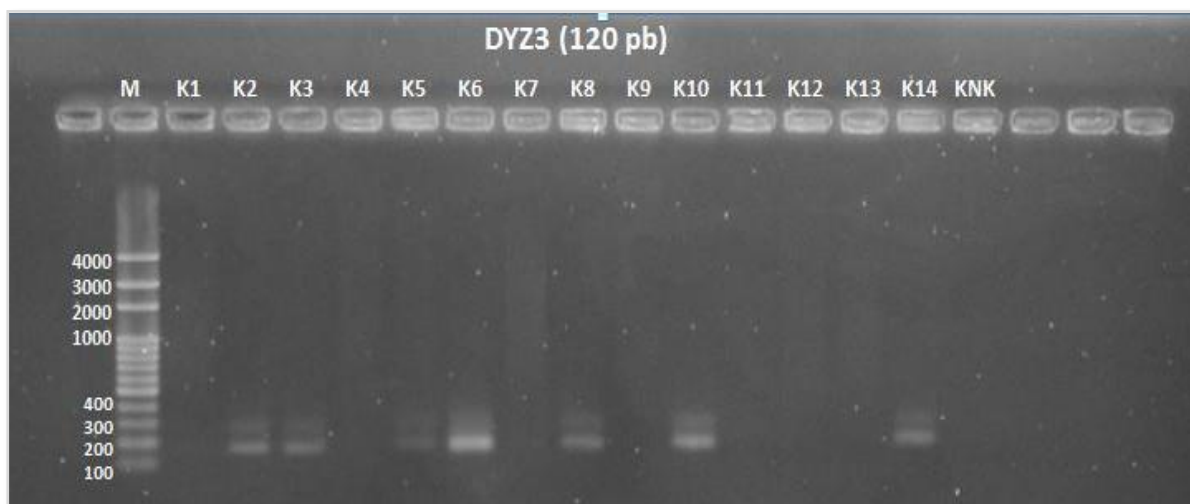


Slika 18 Slika elektroforetskog gela za fragmente gena *AMGX/AMGY* kod 14 kontrolnih uzoraka. Na slici je vidljivo da su uzorci K2, K3, K5, K6, K8, K10 i K14 dali pozitivan rezultat u obliku dvije vidljive i specifične vrpce na odgovarajućoj visini (432 pb i 250 pb što odgovara muškom spolu). Također, vidljivo je i da su uzorci K1, K4, K7, K9, K11, K12 i K13 dali pozitivan rezultat u obliku jedne vidljive i specifične vrpce na odgovarajućoj visini (432 pb što odgovara ženskom spolu). Uzorak NK je negativna kontrola. M označava jažicu s markerom.

Kod analize elektroforetskih gelova kontrolnih uzoraka primijećeno je da vrpce za sekvence gena *DYZ1* i *DYZ3* nisu na točno očekivanim visinama opisanima u literaturi (za *DYZ1* 149 pb, a za *DYZ3* 120 pb; Semerci i sur., 2007), odnosno da početnice za te gene umnažaju fragmente veće od očekivanih. Za gen *DYZ1* je dobivena vrpca malo iznad 150 pb, a za gen *DYZ3* na otprilike 170 pb (Slika 19 i Slika 20). Nakon nekoliko ponovljenih analiza i potvrde prvotnih rezultata, PCR-produkti i početnice za ova dva gena su poslani na sekvenciranje koje je kasnije potvrdilo da su umnožene odgovarajuće sekvence Y-kromosoma.



Slika 19 Slika elektroforetskog gela za sekvencu za gen *DYZ1* kod 14 kontrolnih uzoraka. Na slici je vidljivo da su uzorci K2, K3, K5, K6, K8, K10 i K14 dali pozitivan rezultat u obliku vidljive i specifične vrpce, ali da se on nalazi na visini malo višoj od očekivanih 149 pb. Uzorak KNK je negativna kontrola. M označava jažicu s markerom.



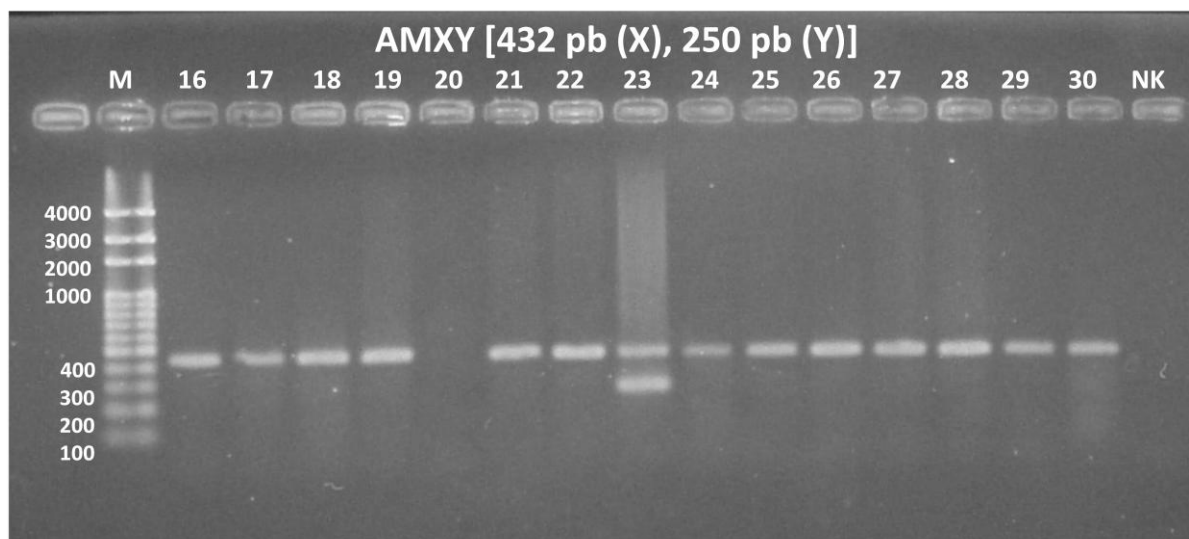
Slika 20 Slika elektroforetskog gela za sekvencu za gen *DYZ3* kod 14 kontrolnih uzoraka. Na slici je vidljivo da su uzorci K2, K3, K5, K6, K8, K10 i K14 dali pozitivan rezultat u obliku vidljive i specifične vrpce, ali da se on nalazi na visini značajno višoj od očekivanih 120 pb. Uzorak KNK je negativna kontrola. M označava jažicu s markerom.

4.3.2. Ispitivani uzorci

Kod tri od ukupno 23 ispitivana uzorka, odnosno kod njih 13%, pronađena je najmanje jedna sekvenca Y-kromosoma. Kod uzorka broj 23 utvrđena je prisutnost svih osam istraživanih sekvenci (za gen *SRY* umnoženi su fragmenti obje duljine). Uzorci 29 i 30 dali su pozitivne rezultate za dvije sekvence karakteristične za Y-kromosom (*TSPY1* i *DYZ3*).

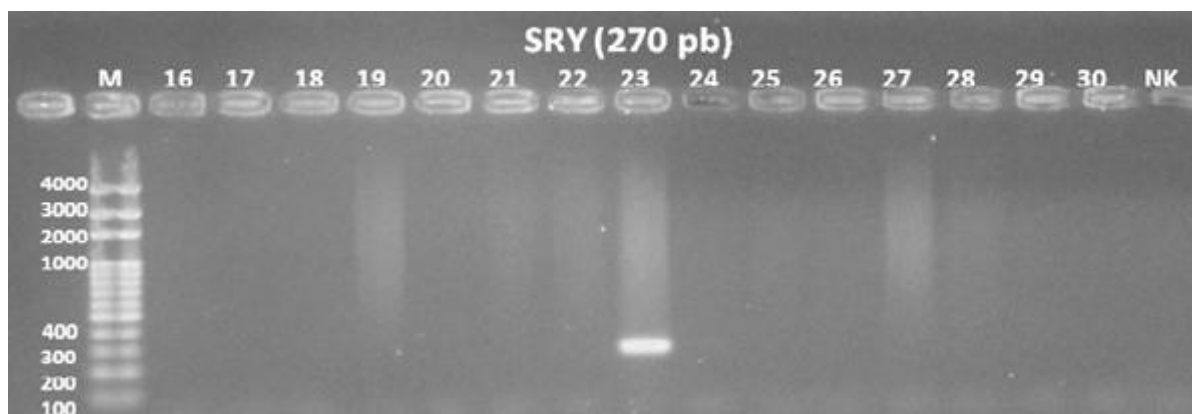
Za sekvencu gena *AMXY* (odnosno *AMGX* i *AMGY*), svi su ispitivani uzorci osim jednoga nakon PCR-analize na elektroforetskom gelu pokazali vrpcu koja odgovara sekvenci

amelogenina na X-kromosomu (432 pb), dok je jedan uzorak (uzorak 23) pokazao umnažanje oba fragmenta amelogenina: i sekvence s X-kromosoma (432 pb) i sekvence s Y-kromosoma (250 pb). Kod uzorka 20 nije uočena ni jedna vrpca (Slika 21).



Slika 21 Slika elektroforetskog gela za sekvencu gena *AMXY* kod druge polovice ispitivanih uzoraka. Na slici je vidljivo da su uzorci 16, 17, 18, 19, 21, 22, 25, 28, 29 i 30 dali pozitivan rezultat u obliku jedne vidljive i specifične vrpce na odgovarajućoj visini (432 pb). Uzorak 23 je dao pozitivan rezultat u obliku dvije vidljive i specifične vrpce na odgovarajućoj visini (432 pb i 250 pb). Uzorak 20 nije bio pozitivan ni na jednu sekvencu. Uzorak NK je negativna kontrola. M označava jažicu s markerom.

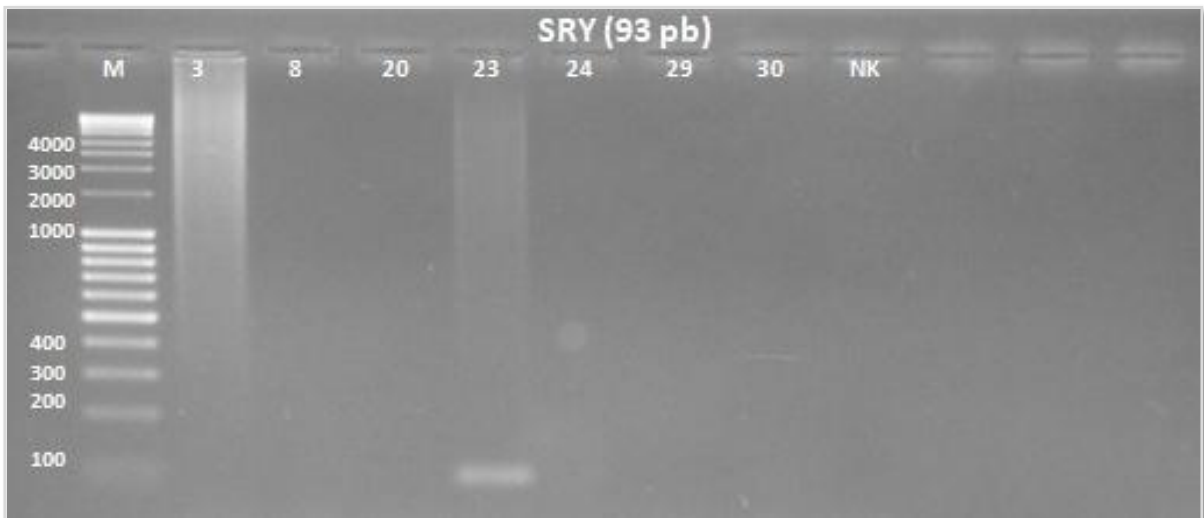
Budući da je uzorak 23 bio pozitivan na sekvence za sve gene (*SRY* – i dulji i kraći fragment, *AMXY*, *PABY*, *TSPY*, *DDX3Y*, *HSFY*, *DYZ1* i *DYZ3*), prikazan je za primjer jedan od elektroforetskih gelova na kojem je pozitivan rezultat dao samo uzorak 23 (Slika 22). Gen *SRY* je karakterističan za Y-kromosom.



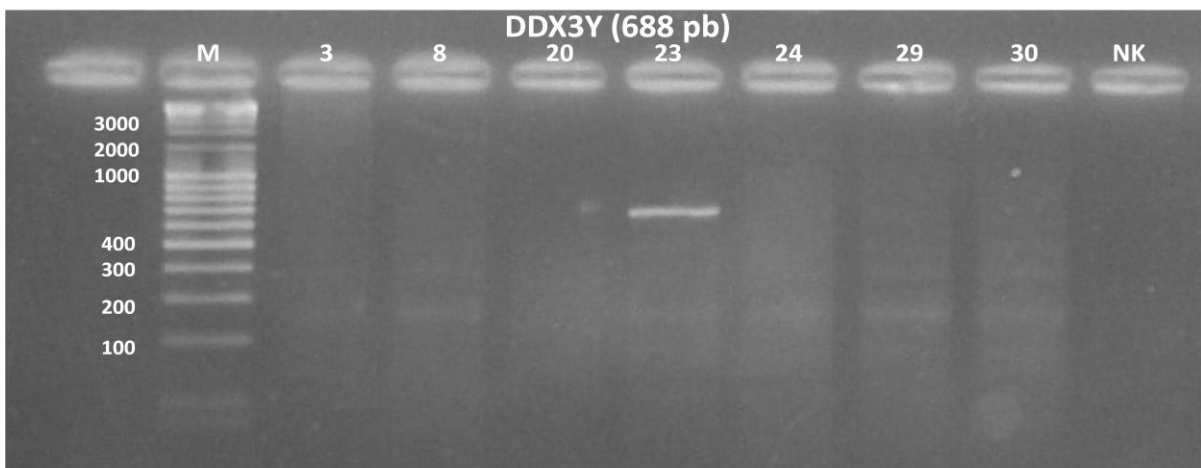
Slika 22 Slika elektroforetskog gela za dulji fragment gena *SRY* kod druge polovice ispitivanih uzoraka. Na slici je vidljivo da je uzorak 23 dao pozitivan rezultat u obliku jedne vidljive i specifične vrpce na odgovarajućoj visini (270 pb). Uzorak NK je negativna kontrola. M označava jažicu sa markerom.

Zbog provjere točnosti rezultata za uzorke s neočekivanim rezultatima, za njih je ponovljena PCR-reakcija i elektroforeza u gelu. Ponovljeno je i testiranje za uzorak pod

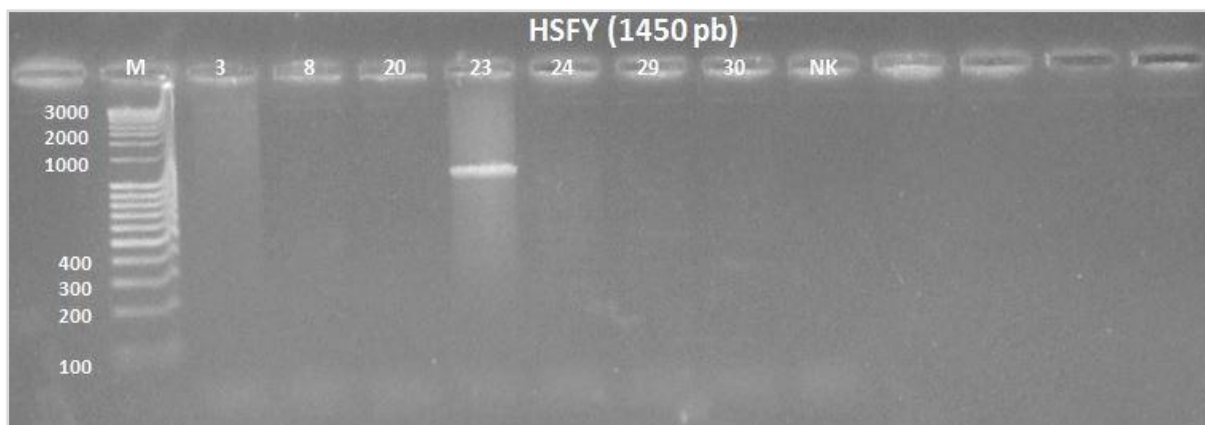
šifrom 20 jer kod njega nije uočena niti jedna vrpca ni za jednu od korištenih sekvenci. Neki od elektroforetskih gelova provjere prikazani su na Slikama 23, 24 i 25.



Slika 23 Slika elektroforetskog gela za kraći fragment gena *SRY* kod provjere ispitivanih uzoraka 3,8,20,23,29 i 30. Na slici je vidljivo da je uzorak 23 dao pozitivan rezultat u obliku jedne vidljive i specifične vrpce na odgovarajućoj visini (93 pb). Uzorak NK je negativna kontrola. M označava jažicu s markerom.



Slika 24 Slika elektroforetskog gela za fragment gena *DDX3Y* kod provjere ispitivanih uzoraka 3,8,20,23,29 i 30. Na slici je vidljivo da je uzorak 23 dao pozitivan rezultat u obliku jedne vidljive i specifične vrpce na odgovarajućoj visini (688 pb). Uzorak NK je negativna kontrola. M označava jažicu s markerom.



Slika 25 Slika elektroforetskog gela za fragment gena *HSFY* kod provjere ispitivanih uzoraka 3,8,20,23,29 i 30. Na slici je vidljivo da je uzorak 23 dao pozitivan rezultat u obliku jedne vidljive i specifične vrpce na odgovarajućoj visini (1450 pb). Uzorak NK je negativna kontrola. M označava jažicu sa markerom.

U Tablici 6 i Tablici 7 grafički su prikazani rezultati svih PCR reakcija i gel elektroforeza provedenih za utvrđivanje prisutnosti svih odabranih sekvenci Y-kromosoma za kontrolne i ispitivane uzorke. Za uzorke na kojima su testovi ponavljani, prikazani su samo rezultati potvrđeni provjerom.

Tablica 6 Prikaz rezultata analize nakon elektroforeze u gelu PCR-produkata kontrolnih uzoraka.

| Vrsta uzorka | Šifra uzorka | Kariotip | Godina uzorkovanja | Vrsta tkiva/stanica | Naziv sekvence | | | | | | | | |
|------------------|--------------|----------|--------------------|---------------------|----------------|------|------|------|------|-------|------|------|------|
| | | | | | SRY1 | SRY2 | PABY | AMXY | TSPY | DDX3Y | HSFY | DYZ1 | DYZ3 |
| Kontrolni uzorci | K1 | 46,XX | 2015. | tkivo posteljice | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | K2 | 46,XY | 2015. | tkivo posteljice | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | K3 | 46,XY | 2015. | tkivo posteljice | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | K4 | 46,XX | 2013. | tkivo posteljice | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | K5 | 46,XY | 2016. | tkivo posteljice | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | K6 | 46,XY | 2012. | tkivo posteljice | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | K7 | 46,XX | 2014. | tkivo posteljice | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | K8 | 46,XY | 2010. | tkivo posteljice | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | K9 | 46,XX | 2015. | tkivo posteljice | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | K10 | 46,XY | 2015. | tkivo posteljice | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | K11 | 46,XX | 2013. | tkivo posteljice | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | K12 | 46,XX | 2015. | tkivo posteljice | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | K13 | 46,XX | 2010. | tkivo posteljice | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | K14 | 46,XY | 2016. | tkivo posteljice | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

0 – nema umnažanja fragmenta, 1- umnožen je fragment jedne duljine, 2 – umnožena su dva fragmenta različitih duljina.

Tablica 7 Prikaz rezultata analize nakon gel elektroforeze PCR produkata ispitivanih uzoraka.

| Vrsta uzorka | Šifra uzorka | Godina uzorkovanja | Vrsta tkiva/stanica | Naziv sekvence | | | | | | | | |
|-------------------|--------------|--------------------|----------------------|----------------|------|------|------|------|-------|------|------|------|
| | | | | SRY1 | SRY2 | PABY | AMXY | TSPY | DDX3Y | HSFY | DYZ1 | DYZ3 |
| Ispitivani uzorci | 1 | 2016. | koža ploda | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 2016. | tkivo posteljice | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 3 | 2015. | tkivo posteljice | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 5 | 2015. | tkivo posteljice | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 2016. | tkivo posteljice | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 8 | 2016. | tkivo posteljice | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 9 | 2014. | tkivo posteljice | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 10 | 2015. | tkivo posteljice; CC | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 12 | 2015. | tkivo posteljice | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 13 | 2015. | tkivo posteljice; CC | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | 2015. | tkivo posteljice | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 16 | 2015. | tkivo posteljice; CC | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 17 | 2015. | tkivo posteljice | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 18 | 2015. | tkivo posteljice | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 19 | 2011. | tkivo posteljice | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 20 | 2011. | tkivo posteljice | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 21 | 2011. | tkivo posteljice | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 22 | 2011. | tkivo posteljice | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 23 | 2013. | tkivo posteljice | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | 25 | 2013. | tkivo posteljice | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 28 | 2014. | koža ploda | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 29 | 2011. | plodova voda | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | |
| 30 | 2015. | tkivo posteljice | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | |

CC označava kulturu stanica (od eng. *Cell Culture*; CC). 0 – nema umnažanja fragmenta, 1- umnožen je fragment jedne duljine, 2 – umnožena su dva fragmenta različitih duljina. Crvenom bojom su označeni rezultati pozitivni na Y-sekvence.

4.4. Sekvenciranje

Zbog uočavanja vrpce koje su bile veće od opisanih u literaturi (za sekvencu gena *DYZ1* 149 pb, a za sekvencu gena *DYZ3* 120 pb), PCR-produkti za ove dvije sekvence su pročišćeni (ChargeSwitch® PCR Clean-Up Kit, Thermo Fisher Scientific) te su zajedno s početnicama poštom poslani na sekvenciranje (Macrogen).

Nakon primitka rezultata sekvenciranja, dobivene sekvence su provjerene prema literaturi iz koje su odabrane, a zatim i ubačene u program BLAST (od eng. *Basic Local Alignment Search Tool*; alat za poravnavanje sekvenci).

Dobiveni nalazi su potvrdili da su umnoženi specifični PCR-produkti koji odgovaraju sekvencama gena *DYZ1* i *DYZ3*. Rezultati sekvenciranja prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8 Rezultati sekvenciranja PCR-produkata i početnica sekvenci gena *DYZ1* i *DYZ3*.

| Naziv gena | Umnožena sekvencija (velika slova označavaju početnice, mala sekvencu između) | Veličina PCR produkta | Mjesto na Y-kromosomu |
|-------------|---|-----------------------|-----------------------------|
| DYZ1 | TCCACTTTATTCCAGGCCTGTCCattacactacattcccttcattccaa tgaattccattccattccaatccattcccttccttctgcttgcattccattctattctcttctactgc atacaattcactCCATTTCGTTCCCATTCATTCAA | 154 pb | >chrY:5667667 7-56676830 |
| DYZ3 | ATGATAGAAACGGAAATATGttacataaaaactacacagaagcatgct gagaaaccgctttgtgatgtgtattcacctccgggagttcaacctatcatttgacagagc ggttttgaaactcttttgtagaatccaagtggatattGGAGCCCTTTGCATT CTACT | 172 pb | >chrY:1053838 1+10538552 |

5. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja pokazuju očuvanost kvalitete materijala pohranjenog zamrzivanjem kroz dulje razdoblje za izolaciju DNA i nizvodne molekularne metode koje mogu poslužiti u prenatalnim istraživanjima. Rutinska obrada tkiva i stanica korištenih u ovome istraživanju provedena je periodički kroz razdoblje od šest godina. Svježi uzorci pohranjivani su u zamrzivač na -20°C . Statistička obrada podataka povezanosti starosti izoliranog uzorka, odnosno izolirane DNA i njene kvalitete ili koncentracije pokazala je, kroz Pearsonov koeficijent korelacije između godine uzorkovanja i: omjera A260/280 [$r(35) = 0,322$], omjera A260/230 [$r(35) = 0,133$] te koncentracije DNA [$r(35) = 0,139$], da starost uzorka nema utjecaj na kvalitetu i koncentraciju izolirane DNA. Prema autorima Hinkle *i sur.* (2003.) ukoliko se ova vrijednost kreće od 0,00 do 0,30 korelacija je zanemariva. Ukoliko se vrijednosti kreću od 0,30 do 0,50 (-0,30 do -0,50) postoji mala pozitivna (negativna) korelacija. Obzirom da su se vrijednosti u ovome istraživanju kretale od 0,133 do 0,322 utvrđeno je da značajne korelacije nema.

Nadalje, izračunata je i p-vrijednost za omjere A260/A280 ($p = 0,052$) i A260/A230 ($p = 0,433$) te koncentraciju DNA ($p = 0,413$) u korelaciji s godinom uzorkovanja. Budući da su sve tri vrijednosti iznad 0,05, nije utvrđena statistički značajna korelacija.

S obzirom da je u svakom uzorku u ovome istraživanju izolirana DNA bila zadovoljavajuće koncentracije zanimljiva je razlika količine uzoraka prvog i drugog eluata koji su unutar idealnog raspona kvalitete. Prvi eluat u odnosu na drugi obuhvaća 9% uzoraka više koji ulaze u idealan raspon kvalitete (62% u odnosu na 53%). Ovome je vrlo vjerojatno doprinijelo pohranjivanje svježih uzoraka direktno u medij za kultivaciju, umjesto priprema uzoraka fiksiranjem formalinom i uklapanje u parafinske blokove budući da su istraživanja pokazala da je vjerojatnost izolacije DNA iz svježih zamrznutih uzoraka veća, odnosno čak 100%-tna, za razliku od vjerojatnosti izolacije DNA iz uzoraka tretiranih formalinom i uklopljenih u parafin (33%-77%) (Wang *i sur.*, 2013.).

Očekivano, vidljivo je da vrijednosti kvalitete i koncentracije izolirane DNA opadaju ponavljanjem postupka elucije. Što se tiče kvalitete, zabilježeno je 9% manje idealnih vrijednosti omjera A260/A280 kod drugih eluata u odnosu na prve. Kod omjera A260/A230 bilo je čak 29,7% manje idealnih uzoraka drugih eluata u odnosu na prve eluate. Srednja vrijednost koncentracije DNA za prve eluate bila je $146,5 \pm 305,28$ dok je za druge bila $114,2 \pm 205,93$.

Ukupno, rezultati analize kvalitete DNA arhivskih prenatalnih uzoraka pokazuju dostatnost i kvalitetu zadovoljavajuću za nizvodne molekularne metode.

Korištenjem PCR-metode kod kontrolne skupine uzoraka (skupine s urednim kariotipom) pronađeni su lokusi za amelogenin. Kod uzoraka muškog urednog kariotipa sekvence amelogenina detektirane su na oba spolna kromosoma odnosno, gen *AMGX* na X-kromosomu i *AMGY* na Y-kromosomu. Kod svih uzoraka s urednim muškim kariotipom potvrđena je i prisutnost svih istraživanih sekvenci Y-kromosoma. Ovakvi rezultati bili su očekivani i u skladu s literaturom (Semerci *i sur.*, 2007; Fernandes, 2013) te su pokazali da su upotrijebljene prikladne početnice koje su umnožile specifičan fragment željenih gena. Također, očekivano, ni kod jednog uzorka s urednim ženskim kariotipom nije pronađena prisutnost neke od istraživanih sekvenci Y-kromosoma što je poslužilo kao dodatna kontrola za isključenje lažno pozitivnih rezultata. Kod svih kontrolnih uzoraka ženskog urednog kariotipa utvrđena je prisutnost sekvence gena *AMGX*, duljine 432 bp.

Za 23 ispitivana uzorka je citogenetičkom analizom utvrđeno da su svi, osim jednoga, imali kariotip 45,X, dok je uzorak pod brojem 29 bio Turnerov sindrom mozaičnog oblika s normalnom staničnom linijom (mos45,X/46,XX). Na ispitivanim uzorcima citogenetičkom analizom nisu detektirani dijelovi Y-kromosoma, i oni su, zbog mogućnosti postojanja kriptičkih dijelova Y-kromosoma, odabrani za istraživanje.

Prema literaturnim podacima, uz pomoć metode PCR se kod 5-10% slučajeva kod kojih se citogenetičkom analizom nađe samo monosomija X-kromosoma, otkrije prisutnost Y-sekvenci (Semerci *i sur.*, 2007.). Svi ispitivani uzorci su provjereni na prisutnost osam sekvenci Y-kromosoma (geni raspoređeni duž cijelog Y-kromosoma) uz pomoć molekularne analize PCR-om. Kod tri od ukupno 23 uzorka (13%), s kariotipom 45,X, ili 45,X/46,XX, je pronađen jedan ili više lokusa Y-kromosoma čime je dosegnut cilj ovog istraživanja, odnosno utvrđena je prisutnost lokusa mapiranih na Y-kromosomu kod pobačenih plodova s TS-om. Kod uzorka pod brojem 23 potvrđena je prisutnost mozaičnog oblika TS s cijelim Y-kromosomom budući da je uzorak bio pozitivan na sve istraživane sekvence. Kod uzoraka 29 i 30, utvrđena je prisutnost strukturno promijenjenih Y-kromosoma jer su bili pozitivni na sekvence gena *TSPY* (Yp11.2) i *DYZ3* (Yp11.1-Yq11.1).

Dodatno, uzorak 29 imao je citogenetički utvrđen mozaični oblik 45,X/46,XX i molekularnom analizom utvrđenu prisutnost Y-sekvenci. Autori Patsalis i suradnici (1998.) u svom radu o detekciji kriptičkih sekvenci Y-kromosoma u Turnerovom sindromu molekularnim metodama također prijavljuju jedan slučaj mozaičnog oblika TS za koji je utvrđeno da je pozitivan na Y-sekvence. Autori su obradili ukupno 50 uzoraka od kojih je

24% pokazalo pozitivne rezultate, od čega je jedan slučaj (2%) mozaični oblik s prisutnim sekvencama Y-kromosoma.

Od 23 ispitivana uzorka u ovom radu, jedino kod uzorka pod šifrom 20 nije dobiven pozitivan rezultat za sekvencu za gen *AMGX*. I nakon ponovljenog molekularnog testiranja, rezultat je ostao isti čime je isključena mogućnost pogreške. Za ovaj uzorak citogenetičkom metodom je utvrđen kariotip 45,X. Negativan rezultat testiranja PCR-om se može objasniti činjenicom da se za utvrđivanje prisutnosti X-kromosoma u ovom istraživanju koristila sekvenca za gen amelogenin duljine 432 bp. Osim količine i čistoće DNA u uzroku važna je i fragmentiranost same DNA dobivene izolacijom. Moguće je da je DNA ovog uzorka prisutna i dovoljno čista, no da je fragmenirana i ne sadržava fragmente dovoljno duge da se umnoži ovaj produkt. Isti je uzorak kasnije provjeren PCR-metodom za određivanje fragmentiranosti DNA (umanažaju se fragmenti 100, 200, 300, 400 i 600 pb gena na autosomima) i nije pokazao niti jedan umnoženi fragment.

Nakon prve analize, za uzorke čiji su rezultati ukazivali ili na prisutnost sekvenci Y-kromosoma ili na nedostatak gena *AMGX* testiranje je ponovljeno kako bi se sa sigurnošću potvrdili rezultati i eliminirao faktor ljudske pogreške. Preporučeno bi bilo sve analize ponoviti barem dva puta za potvrdu rezultata.

Završno, kod 13% slučajaja spontano pobačenih plodova prvog ili drugog tromjesečja trudnoće s kariotipom Turnerovog sindroma pronađena je prisutnost sekvenci Y-kromosoma.

6. ZAKLJUČAK

- uspješno su optimizirani testovi za analizu sekvenci Y-kromosoma
- kod svih kontrolnih uzoraka muškog urednog kariotipa umnožene su sve ispitivane sekvence Y-kromosoma
- kod svih kontrolnih uzoraka ženskog urednog kariotipa umnožena je sekvenca za amelogenin X-kromosoma, dok nije umnožena niti jedna od ispitivanih sekvenci Y-kromosoma
- u 13% uzoraka s Turnerovim sindromom utvrđena je neka od sekvenci Y-kromosoma

7. LITERATURA

- Ahn J, Lee J (2008). X Chromosome: X Inactivation. *Nat Educ* 1(1)24 at <<https://www.nature.com/scitable/topicpage/x-chromosome-x-inactivation-323>>.
- Bashamboo A, Rahman MM, Prasad A, Chandy SP, Ahmad J, Ali S (2005). Fate of SRY, PABY, DYS1, DYZ3 and DYZ1 loci in Indian patients harbouring sex chromosomal anomalies. *Mol Hum Reprod* 11: 117–127.
- Beiguelman B (Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1982). *Citogenética Humana* at <<https://www.estantevirtual.com.br/seboclepsidra/bernardo-beiguelman-citogenetica-humana-612605728>>.
- Berletch JB, Yang F, Xu J, Carrel L, Distche CM (2011). Genes that escape from X inactivation. *Hum Genet* 130: 237–245.
- Bianco B, Lipay MVN, Melaragno MI, Guedes AD, Verreschi ITN (2006). Detection of hidden Y mosaicism in Turner's syndrome: importance in the prevention of gonadoblastoma. *J Pediatr Endocrinol Metab* 19: 1113–1117.
- Bispo AVS, Buregio-Frota P, Oliveira dos Santos L, Leal GF, Duarte AR, Araújo J, i sur. (2013). Y chromosome in Turner syndrome: detection of hidden mosaicism and the report of a rare X;Y translocation case. *Reprod Fertil Dev* 26: 1176.
- Boucher CA, Sargent CA, Ogata T, Affara NA (2001). Breakpoint analysis of Turner patients with partial Xp deletions: implications for the lymphoedema gene location. *J Med Genet* 38: 591–598.
- Burgoyne PS (1989). Thumbs down for zinc finger? *Nature* 342: 860–862.
- Cassidy SB, Allanson JE (Wiley-Blackwell: 2010). *Management of genetic syndromes*.
- Chang P, Tsau YK, Tsai WY, Tsai WS, Hou JW, Hsiao PH, i sur. (2000). Renal malformations in children with Turner's syndrome. *J Formos Med Assoc* 99: 796–798.
- Cools M, Pleskacova J, Stoop H, Hoebeke P, Laecke E Van, Drop SLS, i sur. (2011). Gonadal Pathology and Tumor Risk in Relation to Clinical Characteristics in Patients with 45,X/46,XY Mosaicism. *J Clin Endocrinol Metab* 96: 1171–1180.
- Cortés-Gutiérrez EI, Herrera-Bartolo R, Dávila-Rodríguez MI, Palacios-Saucedo GC, Vargas-Villarreal J, Romero-Villarreal JB (2012). Molecular detection of cryptic Y-chromosomal material in patients with Turner syndrome. *Oncol Rep* 28: 1205–1210.
- Costa FF (2008). Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. *Gene* 410: 9–17.
- Coyle D, Kutasy B, Han Suyin K, Antao B, Lynch SA, McDermott MB, i sur. (2016). Gonadoblastoma in patients with 45,X/46,XY mosaicism: A 16-year experience. *J*

Pediatr Urol doi:10.1016/j.jpuro.2016.02.009.

- Ditton HJ, Zimmer J, Kamp C, Rajpert-De Meyts E, Vogt PH (2004). The AZFa gene DBY (DDX3Y) is widely transcribed but the protein is limited to the male germ cells by translation control. *Hum Mol Genet* **13**: 2333–2341.
- El-Eshmawy MM, Yahia S, El-Dahtory FA, Hamed S, Hadidy EHM El, Ragab M (2013). Hidden Y Chromosome Mosaicism in 48 Egyptian Patients with Turner's Syndrome. *Genet Res Int* **2013**: 463529.
- Ferguson-Smith MA (1965). Karyotype-phenotype correlations in gonadal dysgenesis and their bearing on the pathogenesis of malformations. *J Med Genet* **2**: 142–155.
- Fernandes S (2013). Y-Chromosome Detection in Turner Syndrome. *Hum Genet Embryol* **3**: .
- Filippova GN, Cheng MK, Moore JM, Truong J-P, Hu YJ, Nguyen DK, i sur. (2005). Boundaries between chromosomal domains of X inactivation and escape bind CTCF and lack CpG methylation during early development. *Dev Cell* **8**: 31–42.
- Fisher EM, Beer-Romero P, Brown LG, Ridley A, McNeil JA, Lawrence JB, i sur. (1990). Homologous ribosomal protein genes on the human X and Y chromosomes: escape from X inactivation and possible implications for Turner syndrome. *Cell* **63**: 1205–1218.
- Ford CE, Jones KW, Polani PE, Almeida JC de, Briggs JH (1959). A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet (London, England)* **1**: 711–713.
- Foresta C, Ferlin A, Moro E (2000). Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum Mol Genet* **9**: 1161–1169.
- Freriks K, Timmers HJLM, Netea-Maier RT, Beerendonk CCM, Otten BJ, Alfen-van der Velden JAEM van, i sur. (2013). Buccal cell FISH and blood PCR-Y detect high rates of X chromosomal mosaicism and Y chromosomal derivatives in patients with Turner syndrome. *Eur J Med Genet* **56**: 497–501.
- Fukami M, Seki A, Ogata T (2016). SHOX Haploinsufficiency as a Cause of Syndromic and Nonsyndromic Short Stature. *Mol Syndr* **2016** **7**: 3–11.
- Gardner RJ., Sutherland GR, Shaffer LG (Oxford University Press: 2011). *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*doi:10.1093/med/9780195375336.001.0001.
- Gibson CW, Yuan ZA, Hall B, Longenecker G, Chen E, Thyagarajan T, i sur. (2001). Amelogenin-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem* **276**: 31871–31875.
- Griffiths AJF (W.H. Freeman: 2000). *An introduction to genetic analysis*

- <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21766/>>.
- Harley VR, Clarkson MJ, Argentaro A (2002). The Molecular Action and Regulation of the Testis- Determining Factors, SRY (Sex-Determining Region on the Y Chromosome) and SOX9 [SRY-Related High-Mobility Group (HMG) Box 9]. doi:10.1210/er.2002-0025.
- Held KR, Kerber S, Kaminsky E, Singh S, Goetz P, Seemanova E, i sur. (1992). Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes? *Hum Genet* **88**: 288–294.
- Helena Mangs A, Morris BJ (2007). The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future. *Curr Genomics* **8**: 129–136.
- Hildenbrand R, Schroder W, Brude E (1999). Detection of TSPY Protein in a Unilateral Microscopic Gonadoblastoma of a Turner Mosaic Patient With a Y-Derived Marker Chromosome - Journals - NCBI. *J Pathol* 623–6at <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/10629567/>>.
- Hinkle DE, Wiersma W, Jurs SG (Houghton Mifflin: 2003). *Applied statistics for the behavioral sciences*.
- Hook EB, Warburton D (1983). The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner's syndrome: livebirth prevalence rates and evidence for diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities or mosaicism. *Hum Genet* **64**: 24–27.
- Hultén MA, Dhanjal S, Pertl B (2003). Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: Advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. *Reproduction* **126**: 279–297.
- Huret J-L, Léonard C, Savage JR (2000). Chromosomes, Chromosome Anomalies. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* **4**: .
- Ibarra-Ramírez M, Martínez-de-Villarreal LE (2016). Clinical and genetic aspects of Turner's syndrome. *Med Univ* **18**: 42–48.
- Jobling MA, Tyler-Smith C (2003). The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nature* **4**: 598–612.
- Kaprova-Pleskacova J, Stoop H, Brüggewirth H, Cools M, Wolffenbuttel KP, Drop SL, i sur. (2014). Complete androgen insensitivity syndrome: factors influencing gonadal histology including germ cell pathology. *Mod Pathol* **27**: 721–730.
- Kotzot D, Dufke A, Tzschach A, Baeckert-Sifeddine I-T, Geppert M, Holland H, i sur. (2002). Molecular breakpoint analysis and relevance of variable mosaicism in a woman with short stature, primary amenorrhea, unilateral gonadoblastoma, and a

- 46,X,del(Y)(q11)/45,X karyotype. *Am J Med Genet* **112**: 51–55.
- Lee JT, Davidow LS, Warshawsky D (1999). Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nat Genet* **21**: 400–404.
- Li Y, Tabatabai ZL, Lee T-L, Hatakeyama S, Ohyama C, Chan W-Y, i sur. (2007). The Y-encoded TSPY protein: a significant marker potentially plays a role in the pathogenesis of testicular germ cell tumors. *Hum Pathol* **38**: 1470–1481.
- Li Z, Haines CJ, Han Y (2008). “Micro-deletions” of the human Y chromosome and their relationship with male infertility. *J Genet Genomics* **35**: 193–199.
- Lippe B (1991). Turner syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* **20**: 121–152.
- Looijenga LHJ, Stoop H, Leeuw HPJC de, Gouveia Brazao CA de, Gillis AJM, Roozendaal KEP van, i sur. (2003). POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res* **63**: 2244–2250.
- Luikenhuis S, Wutz A, Jaenisch R (2001). Antisense transcription through the Xist locus mediates Tsix function in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* **21**: 8512–8520.
- Ma K, Mallidis C, Bhasin S (2000). The role of Y chromosome deletions in male infertility. *Eur J Endocrinol* **142**: 418–430.
- Mavinkurve M, O’Gorman CS (2017). Can Brain Natriuretic Peptides and Osteoprotegerin Serve As Biochemical Markers for the Detection of Aortic Pathology in Children and Adolescents with Turner Syndrome? *Front Endocrinol (Lausanne)* **8**: 142.
- Oliveira RMR De, Verreschi ITDN, Lipay MVN, Eça LP, Guedes AD, Bianco B (2009). Y chromosome in Turner syndrome: review of the literature. *Sao Paulo Med J* **127**: 373–378.
- Oram SW, Liu XX, Lee T-L, Chan W-Y, Lau Y-FC (2006). TSPY potentiates cell proliferation and tumorigenesis by promoting cell cycle progression in HeLa and NIH3T3 cells. *BMC Cancer* **6**: 154.
- Page DC (1987). Hypothesis: a Y-chromosomal gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads. *Development* **101 Suppl**: 151–155.
- Pathak D, Premi S, Srivastava J, Chandy SP, Ali S (2006). Genomic Instability of the DYZ1 Repeat in Patients with Y Chromosome Anomalies and Males Exposed to Natural Background Radiation. *DNA Res* **13**: 103–109.
- Patsalis PC, Sismani C, Hadjimarcou MI, Kitsiou-Tzeli S, Tzezou A, Hadjiathanasiou CG, i sur. (1998). Detection and incidence of cryptic Y chromosome sequences in Turner syndrome patients. *Clin Genet* **53**: 249–257.
- Pavlica M (2012). Mrežni udžbenik iz Genetike, prof. dr. sc. Mirjana Pavlica. *Mrežni*

udžbenik iz *Genet* at <<http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl10.html>>.

- Procter SE, Watt JL, Lloyd DJ, Duffty P (1984). Problems of detecting mosaicism in skin. A case of trisomy 8 mosaicism illustrating the advantages of in situ tissue culture. *Clin Genet* **25**: 273–277.
- Ramos ES (2007). Turner syndrome: counseling prior to oocyte donation. *Sao Paulo Med J* **125**: 112–114.
- Ranke MB, Saenger P, Gasparini N, Rizzo M, Ferri P, Vajro P (2001). Turner's syndrome. *Lancet (London, England)* **358**: 309–314.
- Rosen GF, Kaplan B, Lobo RA (1988). Menstrual function and hirsutism in patients with gonadal dysgenesis. *Obstet Gynecol* **71**: 677–680.
- Ross JL, Roeltgen D, Kushner H, Wei F, Zinn AR (2000). The Turner syndrome-associated neurocognitive phenotype maps to distal Xp. *Am J Hum Genet* **67**: 672–681.
- Sado T, Wang Z, Sasaki H, Li E (2001). Regulation of imprinted X-chromosome inactivation in mice by Tsix. *Development* **128**: 1275–1286.
- Saenger P (1993). Clinical review 48: The current status of diagnosis and therapeutic intervention in Turner's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **77**: 297–301.
- Salo P, Kääriäinen H, Petrovic V, Peltomäki P, Page DC, la Chapelle A de (1995). Molecular mapping of the putative gonadoblastoma locus on the Y chromosome. *Genes Chromosomes Cancer* **14**: 210–214.
- Santos V, Marçal M, Amaral D, Pina R, Lopes L, Fonseca G (2010). Turner syndrome. From child to adult... A multidisciplinary approach. *Acta Med Port* **23**: 873–882.
- Sävendahl L, Davenport ML, Stijnen T, Jansen M, Otten B, Hoorweg-Nijman J, i sur. (2000). Delayed diagnoses of Turner's syndrome: proposed guidelines for change. *J Pediatr* **137**: 455–459.
- Scully RE (1970). Gonadoblastoma. A review of 74 cases. *Cancer* **25**: 1340–1356.
- Semerci CN, Satiroglu-Tufan NL, Turan S, Bereket A, Tuysuz B, Yilmaz E, i sur. (2007). Detection of Y chromosomal material in patients with a 45,X karyotype by PCR method. *Tohoku J Exp Med* 243–249doi:10.1620/tjem.211.243.
- Sharp AJ (2002). Molecular and cytogenetic analysis of the spreading of X inactivation in X;autosome translocations. *Hum Mol Genet* **11**: 3145–3156.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, i sur. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **346**: 240–244.
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, i sur. (2003).

- The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* **423**: 825–837.
- Speicher MR, Antonarakis SE, Motulsky AG, Vogel F (2010). *Vogel and Motulsky's human genetics : problems and approaches*.
- Spoor JA, Wolter Oosterhuis J, Hersmus R, Biermann K, Wolffenbuttel KP, Cools M, i sur. (2017). Histological Assessment of Gonads in DSD: Relevance for Clinical Management. *Sex Dev* doi:10.1159/000481757.
- Stavropoulos N, Lu N, Lee JT (2001). A functional role for Tsix transcription in blocking Xist RNA accumulation but not in X-chromosome choice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10232–10237.
- Stipoljev F (Hrvatski liječnički zbor , Podružnica Rijeka : 2007). *Genetski uzroci neplodnosti* *Med Flum Med Flum* **43**: .
- Su H, Lau YF (1993). Identification of the transcriptional unit, structural organization, and promoter sequence of the human sex-determining region Y (SRY) gene, using a reverse genetic approach. *Am J Hum Genet* **52**: 24–38.
- Sybert VP, McCauley E (2004). Turner's Syndrome. *N Engl J Med* **351**: 1227–1238.
- Tessari A, Salata E, Ferlin A, Bartoloni L, Slongo ML, Foresta C (2004). Characterization of HSFY, a novel AZFb gene on the Y chromosome with a possible role in human spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* **10**: 253–258.
- Trolle C, Nielsen MM, Skakkebaek A, Lamy P, Vang S, Hedegaard J, i sur. (2016). Widespread DNA hypomethylation and differential gene expression in Turner syndrome. *Sci Rep* **6**: 34220.
- Tsuchiya K, Reijo R, Page DC, Distcheck CM (1995). Gonadoblastoma: molecular definition of the susceptibility region on the Y chromosome. *Am J Hum Genet* **57**: 1400–1407.
- Turner HH (1938). A syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and cubitus valgus. *Endocrinology* **23**: 566–574.
- Uematsu A, Yorifuji T, Muroi J, Kawai M, Mamada M, Kaji M, i sur. (2002). Parental origin of normal X chromosomes in Turner syndrome patients with various karyotypes: Implications for the mechanism leading to generation of a 45,X karyotype. *Am J Med Genet* **111**: 134–139.
- Verp MS, Simpson JL (1987). Abnormal sexual differentiation and neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet* **25**: 191–218.
- Wang J-H, Gouda-Vossos A, Dzamko N, Halliday G, Huang Y (2013). DNA extraction from fresh-frozen and formalin-fixed, paraffinembedded human brain tissue. *Neurosci Bull*

29: 649–654.

Wolff DJ, Dyke DL Van, Powell CM, Working Group of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee (2010). Laboratory guideline for Turner syndrome. *Genet Med* **12**: 52–55.

Wutz A, Jaenisch R (2000). A shift from reversible to irreversible X inactivation is triggered during ES cell differentiation. *Mol Cell* **5**: 695–705.

www.poliklinika-ginecej.hr (2015). Amniocenteza ili biopsija resica posteljice (CVS) - Ginecej. at <<http://poliklinika-ginecej.hr/amniocenteza-ili-biopsija-resica-posteljice-cvs/>>.

Zhong Q, Layman LC (2012). Genetic considerations in the patient with Turner syndrome-45,X with or without mosaicism. *Fertil Steril* **98**: 775–779.

ŽIVOTOPIS



Zovem se Nestija Juretić i rođena sam 7.12.1990. godine u Splitu gdje sam završila osnovnu i srednju školu (I gimnazija) te stekla diplomu magistre znanosti. Prve visokoškolske studije upisala sam 2009. godine pri Sveučilišnom studijskom centru za studije mora kao redovni student preddiplomskog studija Biologije i ekologije mora. Nakon stjecanja naziva prvostupnice, upisala sam redovno i diplomski studij Biologije i ekologije mora te diplomirala 2014. godine. Za vrijeme gotovo cijelog studija bila sam predsjednica

Udruge studenata Centra za studije mora – Oceanus. Po diplomiranju, iste godine, sam upisala drugi redovni diplomski studij – studij Molekularne biologije pri Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Uz volonterski rad u udruzi Oceanus, tijekom prvog studija, volontirala sam i u udrugama Sunce te Odred izviđača pomoraca Posejdon iz Splita, kao i udruzi Don Kihot – terapije pomoću konja za vrijeme studija u Zagrebu. U slobodno vrijeme pišem projekte za mlade po Erasmus+ programu i bavim se fotografiranjem, snimanjem i planinarenjem.