

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Michaela Michalová

Heterochromatinové varianty lidského karyotypu

Heterochromatin variants of the human karyotype

Bakalářská práce

Vedoucí práce: MUDr. Antonín Šípek

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně na základě konzultace se svým vedoucím práce a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu, které byly řádně citovány. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 23. 8. 2017

Podpis:

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat zejména svému školiteli MUDr. Antonínu Šípkovi za pomoc a cenné rady při psaní této bakalářské práce a také RNDr. Marii Kočové, CSc. za pomoc s výběrem tématu bakalářské práce.

Abstrakt

Chromozomy jsou buněčné struktury složené z chromatinu, z nichž jeden druh je konstitutivní heterochromatin, který neobsahuje žádné kódující sekvence a je transkripčně neaktivní. Heterochromatinové úseky jsou tvořené vysoce repetitivními sekvencemi satelitních DNA, díky kterým dochází k variabilitě. Největší oblasti heterochromatinu nalezneme na dlouhých ramenech chromozomů 1, 9, 16 a Y, ale na variabilitě se podílí i heterochromatin na krátkých ramenech akrocentrických chromozomů 13 – 15, 21 a 22. Tato bakalářská práce na základě dostupných vědeckých článků shrnuje poznatky o heterochromatinových variantách, jejich výskytu, četnosti, možnostech zkoumání a také klinickém významu v současné době. Poukazuje především na možnou spojitost s reprodukčními poruchami a na protichůdné výsledky jednotlivých pozorování. Současné poznatky ukazují na význam nových laboratorních metod (molekulárně cytogenetických), které lze využít k upřesnění a podrobnějšímu třídění nálezů, které byly kdysi za použití méně přesných pruhovacích metod označeny jako neškodné varianty. Ze shrnutí tedy vyplývá, že by měl být kladen důraz na studii klinického významu heterochromatinových variant, které, přestože jsou považovány za normální varianty bez klinického významu, mohou mít vliv například na průběh meiózy a tím způsobit asymetrické párování homologních chromozomů.

Klíčová slova:

lidský karyotyp, chromozomy, heterochromatin, heterochromatinové varianty, reprodukční poruchy, neplodnost

Abstract

Chromosomes are cell structures consist of chromatin, out of which one kind is a constitutive heterochromatin, which contains non-coding sequences only and is transcriptionally inactive. Heterochromatin blocks consist of highly repetitive sequences of satellite DNAs, which allows the parts to be variable. The largest areas of heterochromatin can be found at long arms of chromosomes 1, 9, 16 and Y, but heterochromatin areas also affect the variability of the short arms of acrocentric chromosomes 13 – 15, 21 and 22. This bachelor thesis based on a number of scientific essays summarizes findings about heterochromatic variants, their occurrence, frequency, possibilities of examining as well as their clinical significance in today's world. It mainly highlights their possible connection with reproductive failures and contradictory results of individual observations. Contemporary results show the importance of new laboratory methods (molecularly cytogenetic), which can be used in specifying and more detailed sorting of findings, which were previously tagged as harmless variants according to less accurate banding methods. The summarization implies that emphasis should be put on the study of clinical meaning of heterochromatic variations. These can influence the progress of meiosis and thus trigger asymmetric pairing of homologous chromosomes, even though they are considered to be normal variants with no clinical significance.

Key words:

human karyotype, chromosomes, heterochromatin, heterochromatin variations, reproductive failure, infertility

Seznam použitých zkratk

bp	páry bází	base pair
C - banding	C – pruhování	constitutive heterochromatin banding
CGH	komparativní genomová hybridizace	comparative genomic hybridization
CBG	C – pruhy produkované hydroxidem barnatým a Giemsovým roztokem	
DNA	deoxyribonukleová kyselina	deoxyribonucleic acid
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	fluorescence <i>in situ</i> hybridization
G - banding	G – pruhování	Giemsa banding
GTG	G pruhy produkované Trypsinem a Giemsovým roztokem	
ISCI	intracytoplazmatická injekce spermií	intracytoplasmatic sperm injection
ISCN	mezinárodní systém cytogenetické nomenklatury	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace	<i>in vitro</i> fertilization
NOR	barvení koloidním stříbrem	Nucleolar organizer regions
Q - banding	Q – pruhování	Quinacrine banding
R - banding	R – pruhování	Reverse banding
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina	Ribosomal ribonucleic acid
T - banding	T – pruhování	Telomere banding

Obsah

Abstrakt	IV
Seznam použitých zkratk	VI
Obsah	VII
1 Úvod	1
2. Heterochromatinové varianty	4
2.1 Terminologie.....	5
2.2 Varianty dlouhých ramen chromozomů 1, 9, 16 a Y.....	6
2.2.1 Chromozom 1 a 16.....	6
2.2.2 Chromozom 9.....	8
2.2.3 Chromozom Y.....	11
2.3 Varianty akrocentrických chromozomů 13, 14, 15, 21 a 22.....	12
3. Způsoby zkoumání heterochromatinových variant	14
3.1 Klasické metody.....	15
3.1.1 G – pruhování (Giemsa banding).....	15
3.1.2 Q – pruhování (Quinacrine banding).....	15
3.1.3 R – pruhování (Reverse banding).....	16
3.1.4 C – pruhování (Constitutive chromosome banding).....	17
3.1.5 T – pruhování (Telomere banding).....	17
3.1.6 G-11 pruhování (Giemsa at ph 11).....	17
3.1.7 NOR barvení (Silver Staining for Nuclear Organizer Regions).....	18
3.2 Molekulárně – cytogenetické metody.....	18
3.2.1 FISH - fluorescence <i>in situ</i> hybridizace).....	18
3.2.2 CGH – comparative genomic hybridization.....	18
4 Klinický význam heterochromatinových oblastí	20
4.1 Poruchy reprodukce.....	20
5 Závěr	23
6 Seznam literatury	24

1 Úvod

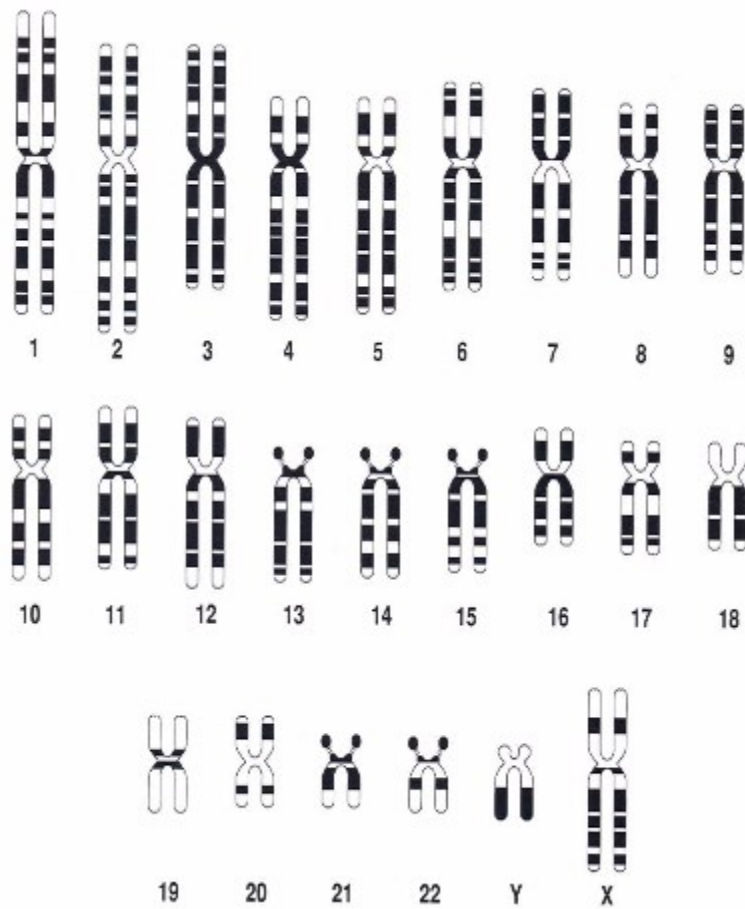
Lidský karyotyp je složen ze 46 chromozomů tvořících 23 párů, z čehož 22 párů chromozomů je nepohlavních (autozomy), které tvoří homologní páry, a jeden pár je pohlavní (gonozomy). Autozomy se označují arabskými číslicemi od 1 do 22 podle délky od nejdelšího po nejkratší, přičemž chromozom 21 tvoří výjimku, neboť je kratší než chromozom 22. Gonozomy se označují písmeny X a Y a tvoří pár XX – žena nebo XY – muž. Vše je znázorněno v ideogramu lidského karyotypu, viz obrázek č. 1. Lidské chromozomy se rozdělují podle morfologie do skupin označovaných písmeny A až G (Shaffer *et al.* 2016) viz tabulka č. 1.

Tabulka č. 1: Rozdělení chromozomů do skupin A – G podle morfologie.

skupina	chromozomy	popis chromozomů
A	1, 2, 3	velké metacentrické
B	4, 5	velké submetacentrické
C	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 a X	střední metacentrické nebo submetacentrické
D	13, 14, 15	střední akrocentrické se satelity
E	16, 17, 18	krátké metacentrické nebo submetacentrické
F	19, 20	krátké metacentrické
G	21, 22 a Y	krátké akrocentrické se satelity, Y satelity nenese

Chromozomy jsou tvořené chromatinem neboli jadernou hmotou, která je tvořena jednou molekulou DNA a komplexem proteinů (histonů) potřebných na její svinutí. Chromatin se rozděluje do dvou strukturně a funkčně rozdílných oblastí – euchromatinu a heterochromatinu (Bhasin 2005). Využitím metody G-pruhování můžeme ve světelném mikroskopu rozeznávat světle zbarvené euchromatinové a podstatně tmavší heterochromatinové pruhy (Gardner and Sutherland 2004) viz Obrázek č. 1. Euchromatin je ta část lidského genomu, která je transkripčně nejaktivnější a bohatá na geny. Heterochromatin je transkripčně neaktivní oblast jaderné hmoty, která se dále dělí na fakultativní a konstitutivní heterochromatin. Fakultativní heterochromatin se podobá euchromatinu, neboť jeho aktivita se střídá s umlčováním během různých fází vývoje (Plath *et al.*, 2002). Konstitutivní heterochromatin neobsahuje žádné kódující sekvence, je složen z vysoce repetitivních sekvencí satelitní DNA, které dávají prostor variabilitě. Tyto sekvence nacházíme nejčastěji na dlouhých ramenech chromozomů 1, 9, 16 a Y, která jsou tvořena např. α , β a III-satelitní DNA (Gardner & Sutherland, 2004, Bhasin, 2005), a na krátkých ramenech chromozomů skupin D (chromozomy 13 – 15) a G (chromozomy 21, 22 a Y) – akrocentrické chromozomy, tvořené především β , I, II, III a IV-satelitní DNA (Hong *et al.* 2011). Vzhledem k tomu, že satelitní DNA neobsahují kódující sekvence, byly heterochromatinové varianty dříve považované za klinicky naprosto

nevýznamné (Brothman et al., 2006, Gardner & Sutherland, 2004). V současné době je klinický význam heterochromatinových variant zkoumán ve spojitosti s různými lidskými patologiemi a jejich signifikance je neustále diskutována.



Obrázek 1: Ideogram lidského karyotypu (Gelehrter T. D. a kol. 1998).

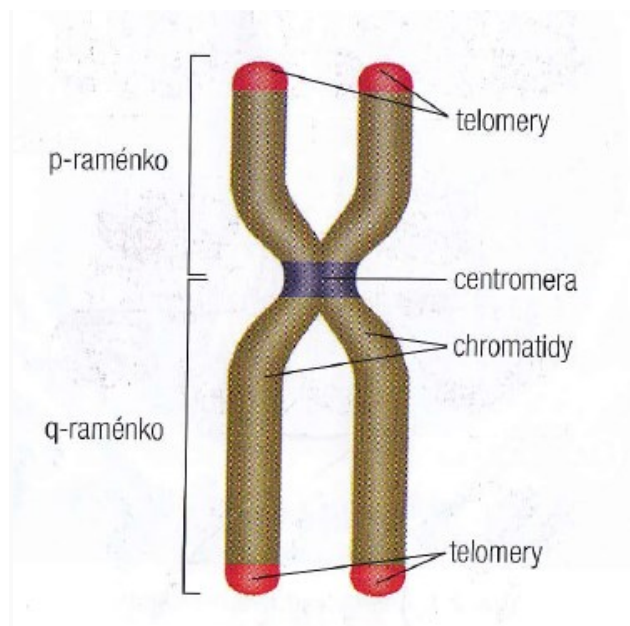
Cíle této práce jsou:

- obecně představit heterochromatinové varianty
- popsat často se vyskytující heterochromatinové varianty
- uvést metody zkoumání heterochromatinových variant
- zhodnotit jejich klinický význam dle provedených studií

2 Heterochromatinové varianty

Heterochromatinové varianty (dále také jen varianty) neboli heteromorfizmy jsou změny ve stavbě chromozomu, které jsou ovšem podle ISCN 2016 (Shaffer *et al.* 2016) považovány za klinicky nevýznamné. Heterochromatinové varianty jsou ve většině případů zděděné od jednoho z rodičů (A. Jr. Šípek, R. Mihalová, Celbová, and Panczak 2012), ale mohou vznikat také *de novo* (Rao *et al.* 2006).

Chromozomy jsou lineární útvary, které jsou primární konstrikcí – centromerou rozděleny na krátká (p) a dlouhá (q) ramena (obrázek č. 2.). K variabilitě dochází především díky zkrácení nebo prodloužení jednotlivých ramen, ale dochází také k inverzím, které tvoří významnou skupinu variant především chromozomu 9. Nejčastěji nalezneme varianty v paracentrické oblasti q ramen chromozomů s velkým blokem konstitutivního heterochromatinu, což jsou chromozomy 1, 9, 16, dále v distálních oblastech chromozomu Y a na krátkých ramenech akrocentrických chromozomů skupiny D (13 – 15) a G (21, 22) (Hong *et al.* 2011).



Obrázek č. 2: Základní schéma a popis eukaryotického chromozomu (Kočárek 2008).

Heterochromatin je tvořen mnohonásobně se opakujícími sekvencemi satelitní DNA, která je charakteristická pro určité oblasti chromozomu (tabulka č. 2).

Tabulka č. 2: Druhy satelitní DNA a jejich výskyt v lidském genomu (Wyandt and Tonk 2012).

název	typ velikost	oblast výskytu
α-satelitní DNA	monomer 171bp	centromerická oblast všech lidských chromozomů
β-satelitní DNA	monomer 68bp	centromerická oblast chromozomů 1, 9, 13, 14, 15, 21, 22 a Y
γ-satelitní DNA	monomer 220bp	pericentrická oblast chromozomů 8, X a Y
I-satelitní DNA	monomer 25-48bp	pericentrická oblast chromozomů 3, 4, 13, 14, 15, 21, 22 a Y
II-satelitní DNA	monomer 5bp	heterochromatinová oblast 1q a 16q pericentrická oblast chromozomů 2 a 10
III-satelitní DNA	monomer 5bp	oblasti 13p, 14p, 15p a 22p heterochromatin v oblastech 1q, 9q a Yq

2.1 Terminologie

K variabilitě může docházet na různých částech chromozomu. Pokud se nachází na heterochromatinových oblastech chromozomu, označujeme jednotlivé varianty písmenem h, varianty na stopce se označují písmeny stk a na satelitech písmenem s. Před právě zmíněná písmena se zapisuje označení ramene, na kterém k variabilitě dochází. Pokud jde o délkové varianty, obsahuje zápis také označení prodloužení (+) nebo zkrácení (-) segmentu (Shaffer *et al.* 2016).

Př. 16qh+ prodloužení heterochromatinové oblasti na dlouhém rameni chromozomu 16

15ps+,pstk+ zvětšené satelity na prodloužených stopkách chromozomu 15

K inverzím dochází díky dvěma zlomům na jednom chromozomu a přetočením segmentu mezi těmito zlomy o 180°. Pokud se na daném segmentu nachází centromera, nazýváme tyto inverze pericentrické, pokud dojde k inverzi na segmentu, který nezahrnuje centromeru, pak tyto inverze nazýváme paracentrické. Při inverzích nedochází ke ztrátě genetické informace, ale pouze k jejímu přeskupení, proto většina inverzí nezpůsobuje žádné abnormality (Posam and Sabnis 2016).

Př. inv(9)(p12q13) inverze chromozomu 9 mezi 12. segmentem krátkého a 13. segmentem dlouhého ramene

2.2 Varianty dlouhých ramen chromozomů 1, 9, 16 a Y

2.2.1 Chromozomy 1 a 16

Heterochromatinové varianty chromozomů 1 a 16, považované za klinicky nevýznamné, jsou délkové varianty dlouhých ramen, kde se nachází největší množství heterochromatinu. U chromozomu 16 je to konkrétně proximální oblast jeho q ramene (Barber *et al.* 2012). Na těchto chromozomech může docházet k variantám jak s nadbytkem heterochromatinu (1qh+, 16qh+), tak s jeho úbytkem (1qh-, 16qh-). Může také docházet k inverzím, na chromozomu 1 je to například inverze inv(1)(p13q21).

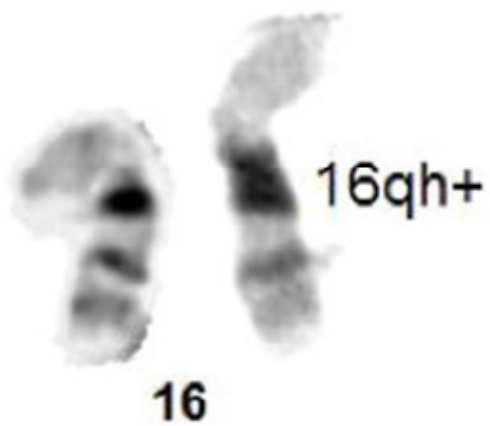
Délkové varianty chromozomů 1 a 16 se vyskytují samostatně, ale setkáváme se s nimi také v kombinaci s jinou variantou. Ve studii Christofolini *et al.* (2012) zaměřené na neplodné muže byla varianta 1qh+ pozorována pouze v asociaci s jinými variantami, přičemž ve dvou případech to bylo s variantou 16qh+. Frekvence výskytu jednotlivých variant u pacientů s reprodukčními poruchami v různých studiích je znázorněna v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Frekvence výskytu délkových variant chromozomů 1 a 16 u lidí s reprodukčními problémy.

studie	výskyt (%)	
	1qh+	16qh+
Caglayan, Ozyazgan, Demiryilmaz & Dundar (2010)	0,36	1,45
Guo <i>et al.</i> (2012)	1,52	6,06
Šípek <i>et al.</i> (2014)	2,51	1,45
Sahin <i>et al.</i> (2008)	2,27	0,91
Hong <i>et al.</i> (2011)	1,41	0,48



Obrázek č. 3: Délková varianta chromozomu 1 – 1qh+ (Wilson *et al.* 2017).

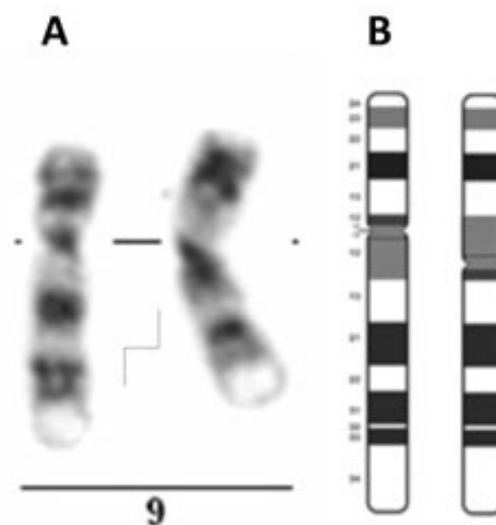


Obrázek č. 4: Délková varianta chromozomu 16 – 16qh+ (Wilson *et al.* 2017).

2.2.2 Chromozom 9

Chromozom 9 je bohatý na intrachromozomální a interchromozomální duplikace, je strukturně vysoce polymorfní a obsahuje největší oblast heterochromatinu, proto nejčastěji se vyskytujícími heterochromatinovými variantami na neakrocentrických chromozomech jsou právě varianty chromozomu 9 (Joseph-George *et al.* 2011). Přibližně 1,5 % populace nese některou z 24 doposud známých variant. Tyto varianty jsou převážně zděděné od jednoho z rodičů a dle provedených výzkumů se vyskytují většinou více u žen. Menší procento variant se vyskytuje také současně a to buď na jednom chromozomu, nebo na homologních párech. Nejčastěji se vyskytující varianty jsou pericentrické inverze, které zaujímají zhruba polovinu všech heterochromatinových variant chromozomu 9. V pořadí druhé jsou délkové varianty dlouhých ramen 9qh (20 – 25 %) a třetí délkové varianty krátkých ramen 9ph (10 – 15 %) (Kosyakova *et al.* 2013).

K inverzím dochází na chromozomu 9 nejčastěji na pericentrickém heterochromatinu a přilehlých oblastech. Podle ICSN 2016 je nejčastější pericentrická inverze (dále jen inv(9)) označována jako inv(9)(p12q13), ovšem ve starších studiích lze najít variabilní popis daného zlomu například inv(9)(p11q13) nebo inv(9)(p11q12). Na základě molekulárně cytogenetického přístupu (Kosyakova *et al.* 2013) lze ovšem tyto varianty rozřadit i dále, do různých typů inverze, dle pořadí různých FISH signálů, viz tabulka č. 4. V běžné populaci se inv(9) vyskytuje přibližně u 1 – 3 % lidí (Purandare *et al.* 2011; A. Jr. Šípek, R. Mihalová, Celbová, and Panczak 2012; Christofolini *et al.* 2012). Mezi další inverze chromozomu 9 patří takzvaná „dlouhá“ inverze - inv(9)(p12q21).



Obrázek č. 5: Pericentrická inverze chromozomu 9 – inv(9)(p12q13) (A. Jr. Šípek, R. Mihalová, Panczak, Celbová, *et al.* 2012).

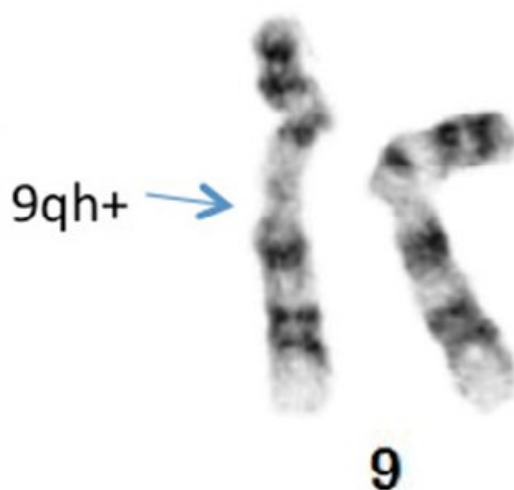
Tabulka č. 4: Nomenklatura 24 heterochromatinových variant chromozomu 9 navržená na základě ISCN (2009) (Kosyakova *et al.* 2013).

Variant	ISCN description	Previously reported as [Ref]
Found in the present study		
inv(9)(var1)	inv(9)(p12q21.11)	- inv(var1) [6]
inv(9)(var2)	inv(9)(p13.1q21.11)	- inv(var2) [6]
inv(9)(var2a)	inv(9)(p13.1q21.11)	- n.a.
inv(9)(het)	inv(9)(p11.1q12)	- n.a.
9qh+	9qh+ or amp(9)(q12)	- 9qh+ [28] - 9qh+ [6]
9qh+(var1)	amp(9)(q13q21.11)	- 9q21 amplification variant [9,10]
9qh-	9qh- or del(9)(q12)	- 9qh- [6]
9ph+	9ph+ or dup/trp(9)(p11.2~12)	- 9ph+ [6] - 9p12 duplication variant [9]
9ph++ (type 1)	9ph++ amp(9)(p11.2~12)	- 9p12 amplification variant [8,9]
9ph++ (type 1)		- In [7] two subtypes distinguished - 9p12 amplification variant [10]
9ph-	9ph- del(p11.2~12)	- 9qh- [29,30]
dic(9)(var1)	dic(9)(pter->q21.11:p13.1->qter)	- 9qh+ and inv (var5) [6]
dic(9)(var2)	dic(9)(pter->q12::p11.2->qter)	- n.a.
dic(9)(var3)	dic(9)(pter->q11::p11.1->qter)	- inversion type A [4]
dup(9)(var1)	der(9)(pter->q21.11;q12->qter)	- inversion type I or type III [2] - 9qh+ and inv (var3) [6] - extra signal(s) in var 9q12 [9] - 9q12 insertion variant [10]
dup(9)(var2)	der(9)(pter->q12::q21.11->q12::q21.11->q21.11::q12->qter)	- 9qh+ and inv (var4) [6]
9cenh+	9cenh+	- n.a.
9cenh-	9cenh-	- n.a.
Found in other studies		
inv dup(9)(var1)	der(9)(pter->q13~21.11::q13~21.11->p1?11.1::q13~21.11->qter)	- inversion type II [2] originally - reported only once [31]
dic(9)(var4)	inv(9)(p10q12)	- inversion type A [3] - inversion type D [4]
dic(9)(var5)	der(9)(pter->p10::q12->q11~12::q12->q11~12::q10->qter)	- inversion type C [3] - inversion type C [4]
inv(9)(het)(var1)	inv(9)(q11~12q12~13)	- inversion type B [3] - inversion type B [4]
del(9q)(var1)	del(9)(q13q21.11)	- 9q21 deletion variant [9,10] - also postulated to exist by [2]
trip(9)(var1)	der(9)(pter->q21.11;q12->q21.11::q12->qter)	- 9q12 euchromatic variant (EV) triplication - variant [9]

K délkovým variantám chromozomu 9 dochází častěji na dlouhém rameni, konkrétně varianty 9qh+, a jsou proto také častěji studovány. Podíl délkových variant chromozomu 9 dle Kosyakova *et al.* (2013) je přibližně 87 % prodloužení q ramene – 9qh+ a 13 % zkrácení ramene q – 9qh-, což podporují i další studie. U běžné populace se výskyt délkových variant v jednotlivých studiích liší, viz tabulka č. 5.

Tabulka č. 5: Výskyt délkových variant chromozomu 9.

studie	výskyt (%)	
	9qh+	9qh-
Šípek <i>et al.</i> (2014)	3	0,6
Wilson <i>et al.</i> (2017)	8,66	-
Dong <i>et al.</i> (2013)	5,55	1,59



Obrázek č. 6: Délková varianta chromozomu 9 – 9qh+ (Wilson *et al.* 2017).

Může také dojít k přesunu heterochromatinu z dlouhého na krátké rameno chromozomu 9 a tuto variantu označujeme jako 9ph nebo může heterochromatin zasahovat obě ramena zároveň a tuto variantu označujeme jako 9phqh (A. Jr. Šípek, Mihalová, Celbová, Suttrová, *et al.* 2012).

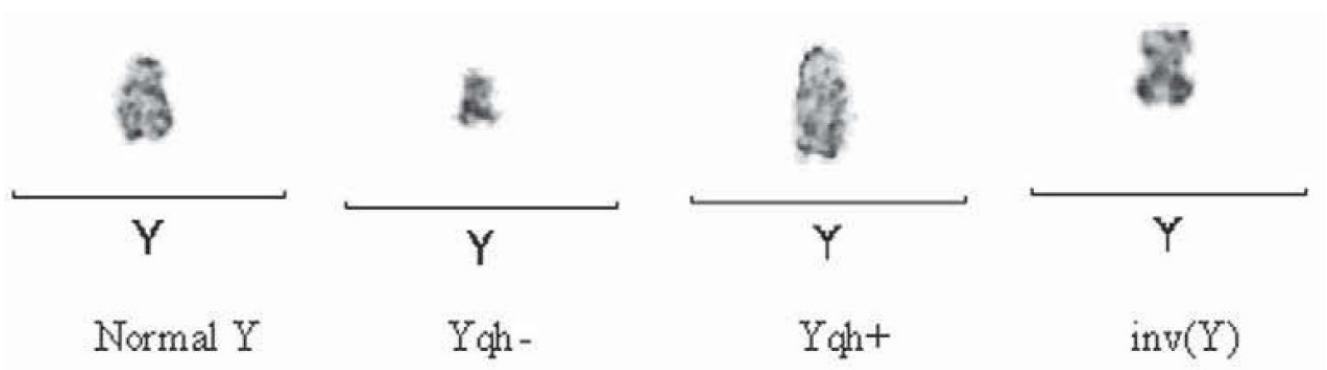
2.2.3 Chromozom Y

Chromozom Y je z velké části složen z euchromatinu, ovšem v distální části dlouhého ramene se nachází heterochromatinová oblast, díky které dochází k variabilitě (Posam and Sabnis 2016). Délková varianta chromozomu Y se označuje jako Yqh+ ve chvíli, kdy je chromozom Y větší než chromozom 18 a jako Yqh-, kdy je chromozom Y menší než akrocentrické chromozomy supiny G (Hsu *et al.* 1987).

Výskyt varianty Yqh+ se u neplodných mužů v jednotlivých studiích velmi liší. Například ve studii De la Fuente-Cortés *et al.* (2009) to bylo 13,29 %, u Minocherhomji *et al.* (2009) dokonce 26,84 %, nižší výskyt byl zjištěn ve studii Hong *et al.* (2011) – 7,84 %, ovšem ve studiích jako Caglayan, Ozyazgan, Demiryilmaz & Dundar (2010) – 1,82 % nebo Turan *et al.* (2015) – 0,43 % byl výskyt této varianty o hodně nižší, nedá se proto dle dostupných studií s přesností určit výskyt této varianty u neplodných mužů, natož v běžné populaci.

Výskyt varianty Yqh- lze dle výsledků studií prohlásit za všeobecně nižší než u varianty Yqh+, ovšem přesné procento také není lehké určit. Například v práci Hong *et al.* (2011) je to 0,35 %, ovšem v práci Minocherhomji *et al.* (2009) je to o procento více tedy 1,35 %. Ve studii Christofolini *et al.* (2012) byla tato varianta pozorována pouze v jednom případě.

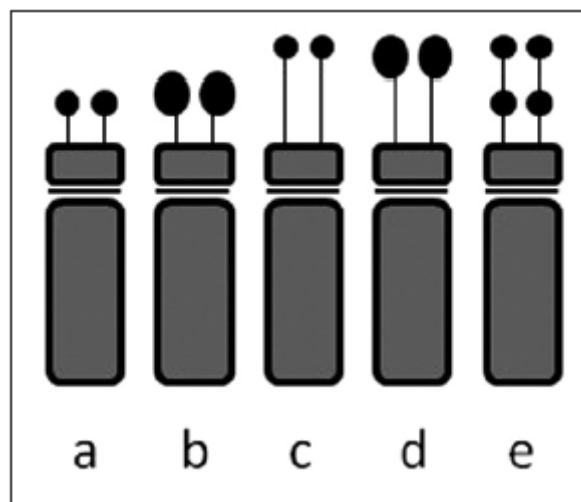
Nejnižší výskyt byl pozorován u varianty inv(Y), kdy v práci Minocherhomji *et al.* (2009) zjistili incidenci 1,01%, Purandare *et al.* (2011) 0,91 % a Hong *et al.* (2011) pouhých 0,15 %.



Obrázek č. 7: Heterochromatinové varianty chromozomu Y (Madon *et al.* 2005).

2.3 Varianty akrocentrických chromozomů 13, 14, 15, 21 a 22

Akrocentrické chromozomy patří do skupin chromozomů D (chromozomy 13, 14 a 15) a skupiny G (chromozomy 21 a 22). Jejich variabilita se týká jejich p ramen, která jsou oproti jiným chromozomům extrémně krátká a nesou specifické struktury odděleny sekundární konstrikcí. Těmito strukturami jsou satelity obsahující heterochromatin tvořený vysoce repetitivními sekvencemi satelitní DNA, které jsou k chromozomu připojeny stopkou (stalk) obsahující geny pro 18S a 28S rRNA (A. Jr. Šípek, R. Mihalová, Celbová, and Panczak 2012). Heterochromatin je tvořen I, II, nebo III. satelitní DNA (Minocherhomji *et al.* 2009). Variabilita se týká především délky, pořadí a počtu jednotlivých struktur (obrázek č. 8).



Obrázek č. 8: Variabilita satelitů na krátkých ramenou akrocentrických chromozomů – a) standard, b) zvětšené satelity ps+, c) prodloužené stopky pstk+, d) zvětšené satelity na prodloužených stopkách pstk+ps+, e) dvojité satelity pss (A. Jr. Šípek, R. Mihalová, Panczak, Celbová, *et al.* 2012).

Výskyt heterochromatinových variant akrocentrických chromozomů nelze dle dostupných prací jednoduše zhodnotit. Větší množství prací uvádí častější výskyt variant u chromozomů skupiny D (Sahin *et al.* 2008; Hong *et al.* 2011; Purandare *et al.* 2011), ale jsou zde i studie uvádějící častější výskyt variant u chromozomů skupiny G (Christofolini *et al.* 2012; Dong *et al.* 2013), přičemž rozdíl mezi oběma skupinami akrocentrických chromozomů nebývá větší než 1 %. Tyto varianty se mohou vyskytovat i společně př. 46,XY,14pstk+,22ps+. Nejméně časté jsou varianty chromozomu 13, nejčastější pak varianty chromozomů 15 a 22.



Obrázek č. 9: Varianty akrocentrických chromozomů skupiny D (Madon *et al.* 2005).



Obrázek č. 10: Varianty akrocentrických chromozomů skupiny G (Madon *et al.* 2005).

3 Způsoby zkoumání heterochromatinových variant

Heterochromatinové varianty můžeme zkoumat pouze v případě, že vizualizujeme jinak neviditelné chromozomy. Nejdříve se používalo „plné“ barvení (solid or conventional stained) založené na použití aceto-orceinu nebo roztoku Giemsa - Romanovského. Podle tohoto barvení bylo možné určit počet chromozomů a jejich základní stavbu, ovšem detailnější informace, jako například odchylky ve struktuře neposkytovalo, neboť zabarvilo celé chromozomy, bez rozdílu mezi euchromatinem a heterochromatinem (Gersen and Keagle 2013).



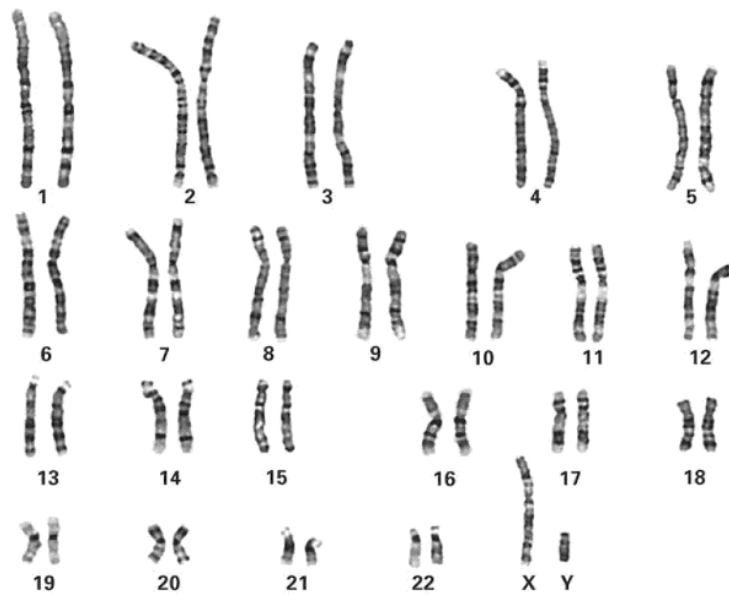
Obrázek č. 11: Chromozomy buňky muže obarvené roztokem Giemsa – Romanovského (Rooney 2001).

Giemsa – Romanovského roztok tedy neslouží k pozorování heterochromatinových variant, tvoří však součást dalších barvení, která byla objevena koncem 60. let. Pomocí těchto barvicích technik se na chromozomu zobrazí tmavé a světlé pruhy, znázorňující jednotlivé oblasti euchromatinu a heterochromatinu. Tyto techniky daly základ objevu a výzkumu heterochromatinových variant. Zbarvení jednotlivých oblastí záleží na druhu použité metody.

3.1 Klasické metody

3.1.1 G – pruhování (Giemsa banding)

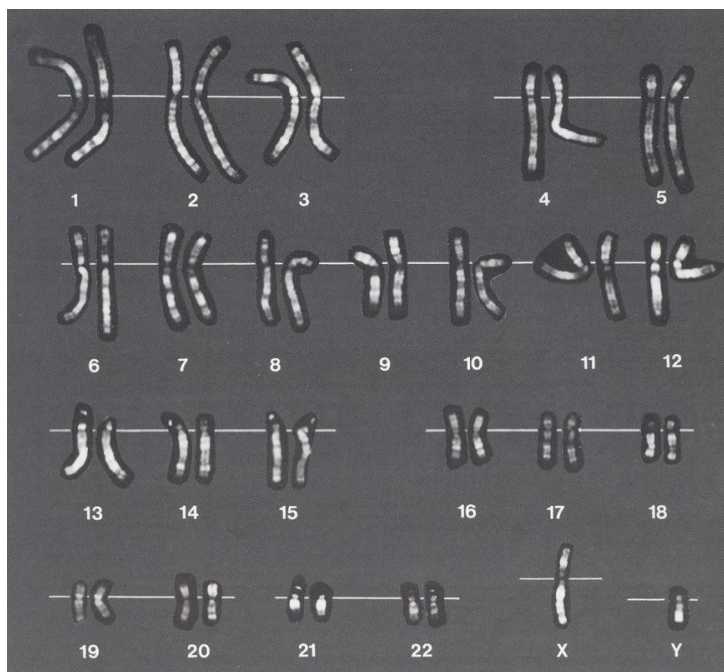
Tato barvicí metoda je velmi rozšířená a patří mezi základní barvicí metody. Jednou z těchto metod je na příklad GTG pruhování, které spočívá v působení trypsinu a následném obarvení Giemsovým roztokem. Vzniklé pruhy se označují jako G-pruhy, tmavé patří oblasti heterochromatinu, světlé euchromatinu (Gersen and Keagle 2013).



Obrázek č. 12: Lidský karyogram, G- pruhování (Shaffer *et al.* 2013).

3.1.2 Q – pruhování (Quinacrine banding)

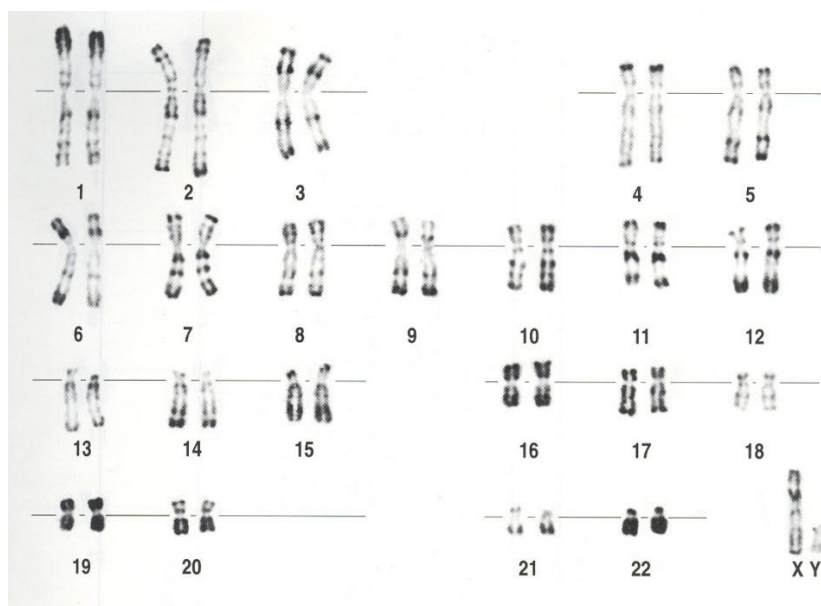
Q – pruhování je fluorescenční metoda, využívající barvivo chinakrin dichlorid, které reaguje s DNA a vytváří podél chromozomu matné (euchromatin) a jasné (heterochromatin) pruhy. Výsledný obraz se podobá G – pruhování, ale v některých chromozomech zobrazuje oblasti, které bychom pomocí G – pruhování nemohli vidět. Ovšem pro pozorování Q – pruhů je zapotřebí fluorescenční mikroskop, jehož působením obarvení časem slábne, a tak se v běžných laboratořích místo této finančně nákladné metody používá metoda FISH (Gersen and Keagle 2013).



Obrázek č. 13: Lidský karyogram, Q – pruhování (Shaffer *et al.* 2013).

3.1.3 R – pruhování (Reverse banding)

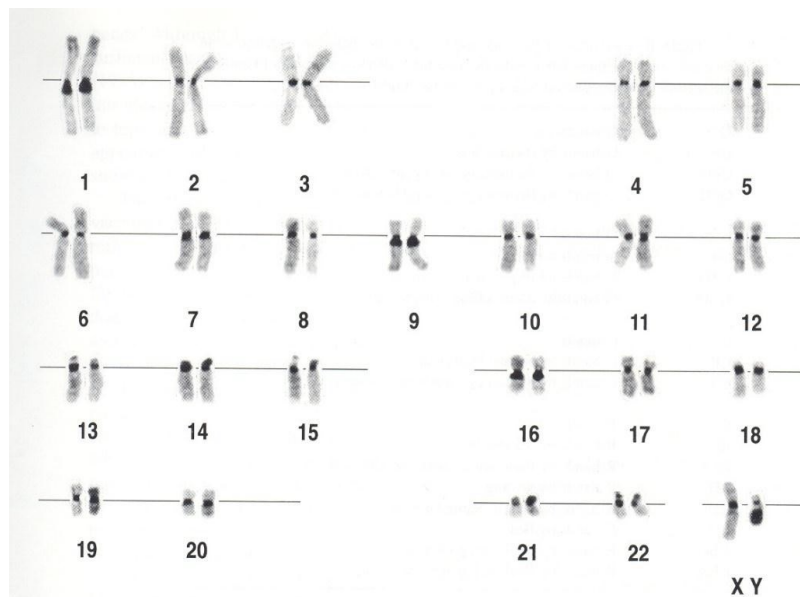
Tento druh barvení spočívá ve využití vlivu teploty a následného obarvení Giemsovým roztokem. Označení R - pruhování vychází ze slova reverze, neboť pruhy vzniklé tímto barvením jsou opačné ke G-pruhování, tmavě se barví euchromatin a světle heterochromatin. Existuje také fluorescenční druh R – pruhování, kdy výsledný obraz je opačný ke Q – pruhování, tedy jasné pruhy patří euchromatinovým a matné heterochromatinovým oblastem (Gersen and Keagle 2013).



Obrázek č. 14: Lidský karyogram, R – pruhování (Mitelman 1995).

3.1.4 C – pruhování (Constitutive chromosome banding)

Barvicí metoda zobrazující konstitutivní heterochromatin. Konkrétním druhem je například CBG – pruhování, které je založeno na denaturaci DNA působením hydroxidu barnatého a inkubaci v solném roztoku. Tím se odstraní všechny fragmenty a zůstane pouze konstitutivní heterochromatin, který se obarví Giemsovým roztokem (Gersen and Keagle 2013).



Obrázek č. 15: Lidský karyogram, C – pruhování (Shaffer *et al.* 2013).

3.1.5 T – pruhování (Telomere banding)

Jde o stejnou metodu jako je R – pruhování s tím rozdílem, že T – pruhování je zaměřeno pouze na koncové části chromozomu – telomery (Gersen and Keagle 2013).

3.1.6 G-11 pruhování (Giemsa at pH 11)

Pruhovací metoda založená na působení zásaditého prostředí (pH 11,6). Zobrazuje všechny oblasti, kde dochází k heterochromatinovým variantám modře – satelitní DNA akrocentrických chromozomů, pericentrické oblasti a také heterochromatinové oblasti chromozomů 1, 9, 16 a Y (Gersen and Keagle 2013).

3.1.7 NOR barvení (Silver Staining for Nuclear Organizer Regions)

Tento druh barvení se používá na identifikaci polymorfismů na satelitech akrocentrických chromozomů. Využívá se zde dusičnan stříbrný, který obarví geny pro rRNA.

Postupem času se ovšem tyto pruhovací techniky ukázaly jako nedostačující pro přesné zkoumání heterochromatinových variant a subvariant a pro detailnější zobrazení se začaly používat molekulárně cytogenetické metody jako například FISH (fluorescence *in situ* hybridizace) nebo CGH (komparativní genomová hybridizace).

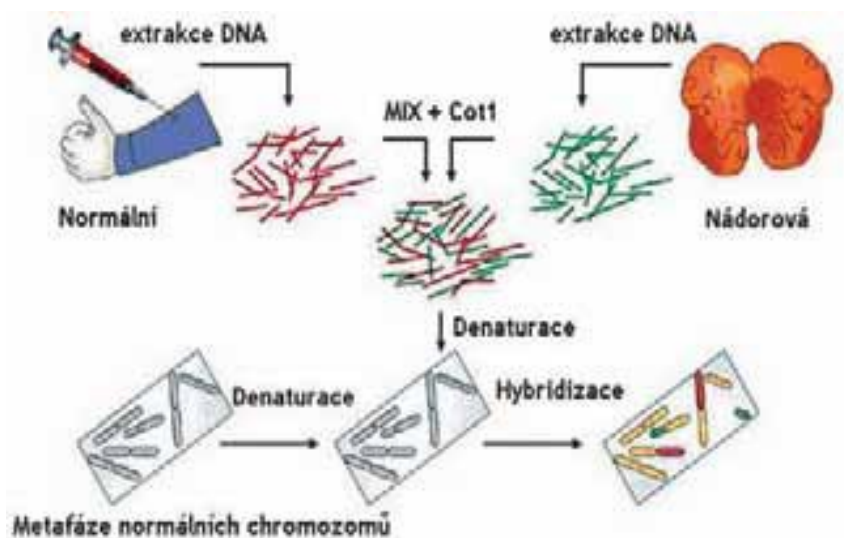
3.2. Molekulárně-cytogenetické metody

3.2.1 FISH – fluorescence *in situ* hybridization

FISH je základní metodou molekulární cytogenetiky. Jejím principem je denaturace DNA a následná hybridizace s jednořetězcovými DNA sondami, které se díky komplementaritě bází naváží k cílové sekvenci DNA. Sondy jsou konjugovány s některým z fluorochromů a tudíž můžeme díky fluorescenčnímu mikroskopu pozorovat místa, kam se sonda navázala. Výhodou této metody oproti CGH je především možnost pozorovat balancované změny. Dalšími metodami, odvozenými od FISH, jsou vícebarevná *in situ* hybridizace (multicolor *in situ* hybridizace, M – FISH) a SKY (spectral karyotyping) využívající spektrometr (Bucksch *et al.* 2012).

3.2.2 CGH – comparative genomic hybridization

Komparativní genomová hybridizace využívá principu FISH aplikovaného na celý genom v jedné reakci. Porovnává vyšetřovanou a srovnávací DNA, kdy jedna je fluorescenčně označena červeně, druhá zeleně. Obě smícháme v poměru 1:1 a denaturujeme na metafázní chromozomy. Pokud je ve vzorku obsažena amplifikace či delece, je to zachyceno posunem barvy k červené nebo zelené, jinak zůstávají chromozomy žluté. Nevýhodou této metody je možnost zkoumání pouze nebalancovaných cytogenetických změn (Dziechciarková *et al.* 2006).



Obrázek č. 16: Schéma principu komparativní genomové hybridizace (Dziechciarková *et al.* 2006).

Metoda CGH má v současné době několik modifikací. aCGH (array comparative genomic hybridization) je mikročipová metoda vzniklá spojením skleněných mikročipů a CGH. Její nevýhodou je falešně pozitivní signál, ke kterému může vést (Kosyakova *et al.* 2013). HR-CGH (high-resolution comparative genomic hybridization) metoda určená ke zkoumání změn na úrovni 3 – 5 Mb a s mírným klonálním zastoupením (Vránová *et al.* 2008). W-CGH (whole comparative genomic hybridization) je metoda určená ke zkoumání repetitivních sekvencí (Dávila-Rodríguez *et al.* 2011).

Druhou základní platformou pro chromozomové čipy je SNP-array (single nucleotide polymorphism) – metoda celogenomového screeningu submikroskopických změn, založená na principu využití polymorfismů v jednom nukleotidu v genomu jedince (Bečvářová *et al.* 2011).

4 Klinický význam heterochromatinových variant

Heterochromatinové varianty jsou neustále zkoumány vzhledem k jejich možnému vlivu na svého nositele. Od jejich objevení jsou zkoumány pro možné spojení s nemalým množstvím lidských patologií – poruchy reprodukce, neplodnost, opakované potraty (viz níže), schizofrenie (Ponnudurai *et al.* 2012), Goldenharův syndrom (Stanojević *et al.* 2000), rakovina (Islam *et al.* 1993), Walker Warburg syndrom (Baltaci *et al.* 1999), ektodermální dysplazie (Moreno Fuenmayor *et al.* 1981), vrozené vady srdce (Ramegowda *et al.* 2007) a další, ovšem žádná přímá spojitost nebyla zjištěna.

Bylo provedeno velké množství výzkumů na celém světě zabývajících se všemi možnými patologiemi, výsledky se ovšem liší. Někteří autoři uvádějí signifikantní výsledky svých výzkumů v porovnání s kontrolní skupinou (zdraví jedinci) a tedy spojitost heterochromatinových variant s lidskými patologiemi (Madon *et al.* 2005; Ramegowda *et al.* 2007; Minocherhomji *et al.* 2009). Jiní ovšem, zcela naopak, žádnou signifikanci nezjistili – (Brothman *et al.* 2006; Ahmet Okay Caglayan *et al.* 2010; Dong *et al.* 2013). Jisté ale je, že se dodnes nepotvrdil neblahý vliv heterochromatinových variant a jsou stále považované za klinicky nevýznamné.

4.1 Poruchy reprodukce

Nejčastěji jsou heterochromatinové varianty spojovány s reprodukčními poruchami, kterými jsou myšleny především opakované potraty, neplodnost a u mužů některá z poruch spermatogeneze (oligozoospermie, teratozoospermie, azoospermie). Dle dat získaných z jednotlivých studií vyplývá, že 15 – 20 % těhotenství končí potratem, což je poměrně vysoké procento (Posam and Sabnis 2016). Existuje mnoho příčin reprodukčních poruch, o jejichž vlivu není pochyb, například genetické nebo hormonální, ovšem tyto poruchy mohou být ovlivněny také všemi výše jmenovanými heterochromatinovými variantami.

Frekvence výskytu heterochromatinových variant je vyšší u lidí s reprodukčními poruchami (Sahin *et al.* 2008; Ahmed Okay Caglayan *et al.* 2010). Studie Kosyakova *et al.* (2013) poukazuje na výskyt reprodukčních poruch u 30 % nositelů variant chromozomu 9. Nejčastěji se vyskytující varianta u těchto lidí nelze určit, neboť ve studii Sahin *et al.* (2008) to byla inv(9), Hong *et al.* (2011) a Guo *et al.* (2012) pozorovali nejčastěji variantu Yqh+ a (Ahmed Okay Caglayan *et al.* 2010) 16qh+.

Nemalé množství studií se již zaměřilo na výzkum spojitosti heterochromatinových variant a poruch reprodukce. Z výzkumu Sahin *et al.* (2008), kde každý z mužů nesoucích heterochromatinovou variantu měl oligozoospermii nebo azoospermii, vyplývá, že tyto varianty mohou být spojeny se spermatogenezí. Codina-Pascual *et al.* (2006) popisuje ovlivnění synapse párování homologních chromozomů v průběhu meiózy. Hong *et al.* (2011) uvádí spojitost variant vzniklých v místě centromery s negativním ovlivňováním připojení kinetochorů k mikrotubulům a tedy správného rozdělení buňky. Pericentrické inverze mohou neblaze ovlivnit spermatogenezi a vést k nesprávné tvorbě gamet (Morel *et al.* 2007). Varianta Yqh+ může způsobit zastavení exprese genů spermatogeneze a snížit tak plodnost, což způsobí příliš mnoho opakování repetitivních sekvencí satelitní DNA na q rameni a je také možné, že je spojena s inhibicí transkripce genů a způsobuje umlčování genových promotorů (Minocherhomji *et al.* 2009; Posam & Sabnis 2016). Výskyt heterochromatinových variant u akrocentrických chromozomů může způsobovat nesprávnou funkci centromery a tudíž nesprávné párování homologních chromozomů a rozdělení buňky a může také souviset s umlčováním genové exprese (Christofolini *et al.* 2012; Dong *et al.* 2013). Pokud se nachází varianta na obou homologních chromozomech, může to ovlivnit crossing-over a tím dojít k tvorbě atypických gamet (Christofolini *et al.* 2012). Ve studii Guo *et al.* (2012) byly heterochromatinové varianty vyskytující se u mužů označeny za varianty mající neblahý vliv na spermatogenezi. Obecně tedy můžeme říci, že heterochromatinové varianty by mohly ovlivňovat spermatogenezi a také mitózu a meiózu a tím se podílet na poruchách plodnosti svých nositelů, ovšem neexistuje žádný přímý důkaz či vysvětlený mechanismus vlivu variant na plodnost, který by dokazoval tuto spojitost.

Přestože jsou heterochromatinové varianty v drtivé většině dědičné, ukázalo se, že neplodní jedinci nesoucí heteromorfismus a mající problémy s reprodukcí, mají zdravé příslušníky rodiny se stejným karyotypem (Dong *et al.* 2013). Z toho vyplývá, že přestože množství studií zmíněných výše naznačuje spojitost heterochromatinových variant s reprodukčními problémy, není to přímá a jediná příčina neplodnosti. Tedy neplodnost může být způsobena a ovlivněna mnoha faktory, přičemž jedním z nich jsou pravděpodobně heterochromatinové varianty, které spolu s ostatními vlivy a faktory mohou ovlivňovat fertilitu člověka.

Heterochromatinové varianty jsou také zkoumány pro jejich možný neblahý vliv na výsledek asistované reprodukce jako například IVF (*in vitro* fertilizace) nebo ICSI (intracytoplazmatická injekce spermií). Jasný výsledek opět neznáme, neboť ve výzkumu Hong *et al.* (2011) nebyl pozorován rozdíl ve výsledcích asistované reprodukce u pacientů s heterochromatinovými variantami v porovnání s pacienty s normálními chromozomy, ovšem

Guo *et al.* (2012) pozorovali muže s normozoospermií a vážnou oligozoospermií a u obou těchto skupin mužů byla pozorována nižší míra oplodnění u nositelů heteromorfizmů než u mužů s normálním genomem.

Přestože jsou heterochromatinové varianty považované za klinicky nevýznamné, neměly by být cytogenetiky ignorované, naopak na tento fenomén by se měly zaměřit detailnější výzkumy. Je potřeba využít vyspělejší molekulárně-cytogenetické metody k přesnějšímu určení variability heterochromatinových úseků a jejich vlivu na poruchy plodnosti a časté potraty. Problémem je stále relativně vysoká cena CGH-array vyšetření oproti rutinnímu vyšetření karyotypu, což snižuje možnost rutinního testování pomocí CGH-array a tudíž je nedostatek dat do výzkumu (Belangero *et al.* 2009; Campanhol *et al.* 2011; Wilson *et al.* 2017).

Závěr

Tato práce se věnuje běžně se vyskytujícím heterochromatinovým variantám lidského karyotypu a jejich vlivu na svého nositele. Přestože jsou tyto varianty stále považované za klinicky nevýznamné, tzv. normální varianty, mnoho nynějších studií prokazuje možný neblahý vliv těchto variant a to především na fertilitu člověka. Ovšem faktorů ovlivňující fertilitu člověka je velké množství (stres, životospráva) a tak je těžké zjistit, v jaké míře zde heterochromatinové varianty hrají nebo nehrají roli.

V dřívějších studiích nebyla možnost využít molekulárně-cytogenetické metody, které dokážou detailněji zobrazit podstatu heterochromatinových variant a napomoci tak jejich podrobnějšímu třídění, což vedlo k nepřesným závěrům. Ovšem tyto molekulárně-cytogenetické metody jsou velmi nákladné a běžné laboratoře si je pro rutinní diagnostiku nemohou dovolit. To vede k nedostatku studovaných dat a také je to jedním z důvodů, proč neexistuje mnoho detailních studií zabývajících se variantami jednoho konkrétního chromozomu nebo přímo konkrétní variantou a způsobu, jakým může ovlivňovat fenotyp člověka.

Výzkumy nasvědčují tomu, že heterochromatinové varianty opravdu ovlivňují fertilitu člověka, ovšem vzhledem k tomu, že zatím neznáme způsob, jakým fertilitu ovlivňují, považujeme tyto heterochromatinové varianty za normální varianty, tedy klinicky nevýznamné.

Seznam literatury

- Baltaci V, Örs R, Kaya M, Balci S. 1999.** A case associated with Walker Warburg syndrome phenotype and homozygous pericentric inversion 9: coincidental finding or aetiological factor? *Acta Paediatrica* **88**: 579–583.
- Barber JCK, Brasch-Andersen C, Maloney VK, et al. 2012.** A novel pseudo-dicentric variant of 16p11.2-q11.2 contains euchromatin from 16p11.2-p11.1 and resembles pathogenic duplications of proximal 16q. *Cytogenetic and Genome Research* **139**: 59–64.
- Bečvářová V, Hynek M, Putzová M, et al. 2011.** Aplikace metody SNP v prenatální diagnostice. *Česká Gynekologie* **76**: 261–267.
- Belangero SIN, Christofolini DM, Bianco B, Gava MM, Wroclawski ER, Barbosa CP. 2009.** Male infertility related to an aberrant karyotype, 46,XY,9ph,9qh+. *Fertility and Sterility* **91**: 6–8.
- Bhasin MK. 2005.** Human Population Cytogenetics: A Review *. *International Journal of Human Genetics* **5**: 83–152.
- Brothman AR, Schneider NR, Saikovich I, et al. 2006.** Cytogenetic heteromorphisms: survey results and reporting practices of giemsa-band regions that we have pondered for years. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* **130**: 947–949.
- Bucksch M, Ziegler M, Kosayakova N, et al. 2012.** A New Multicolor Fluorescence *In situ* Hybridization Probe Set Directed Against Human Heterochromatin: HCM-FISH. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **60**: 530–536.
- Caglayan AO, Ozyazgan I, Demiryilmaz F, Dundar M. 2010.** Cytogenetic Results of Patients with Infertility in Middle Anatolia, Turkey: Do Heteromorphisms Affect Fertility? *Journal of Reproduction and Infertility* **11**: 179–181.
- Caglayan AO, Ozyazgan I, Demiryilmaz F, Ozgun MT. 2010.** Are heterochromatin polymorphisms associated with recurrent miscarriage? *The journal of obstetrics and gynaecology research* **36**: 774–6.
- Campanhol C de L, Henrich JK, Couto E, Barini R. 2011.** Subfertility phenotype, chromosome polymorphism and conception failures. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* **33**: 246–251.
- Codina-Pascual M, Navarro J, Oliviver-Bonet M, et al. 2006.** Behaviour of human heterochromatic regions during the synapsis of homologous chromosomes. *Human Reproduction* **21**: 1490–1497.
- Dávila-Rodríguez MI, Cortés-Gutiérrez EI, Cerda Flores RM, et al. 2011.** Constitutive heterochromatin polymorphisms in human chromosomes identified by whole comparative genomic hybridization. *European Journal of Histochemistry* **55**: 151–155.
- Dong Y, Jiang Y, Du R, Zhang H-G, Li L-L, Liu R-Z. 2013.** Impact of chromosomal heteromorphisms on reproductive failure and analysis of 38 heteromorphic pedigrees in Northeast China. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **30**: 275–281.
- Dziechciarková M, Berkovcová J, Trojanec R, Srovnal P, Bouchalová K, Hajdúch M. 2006.** Využití laserové mikrodisekce pro přípravu komplexních vzorků a nádorové tkáně pro účely mikrogenomických analýz. *Klinická onkologie* **19**: 355–360.
- Gardner RJM, Sutherland GR. 2004.** *Chromosome abnormalities and genetic counseling*. Oxford University Press.
- Gelehrter T. D. a kol. 1998.** *Principles of Medical Genetics*. Williams & Wilkins.
- Gersen LS, Keagle BM (Eds.). 2013.** *The Principles of Clinical Cytogenetics*. Springer.
- Guo T, Qin Y, Gao X, et al. 2012.** The role of male chromosomal polymorphism played in spermatogenesis and the outcome of IVF/ICSI-ET treatment. *International Journal of Andrology* **35**: 802–809.
- Hong Y, Zhou YW, Tao J, Wang SX, Zhao XM. 2011.** Do polymorphic variants of chromosomes affect the outcome of *in vitro* fertilization and embryo transfer treatment? *Human Reproduction* **26**: 933–940.
- Hsu LY, Benn PA, Tannenbaum HL, Perlis TE, Carlson AD. 1987.** Chromosomal polymorphisms of 1, 9, 16, and Y in 4 major ethnic groups: a large prenatal study.

- American Journal of Human Genetics* **26**: 95–101.
- Christofolini DM, Mafra FA, Neto RP, et al. 2012.** Correlation between Chromosomal Variants and Male Infertility in a Population of Brazilian Infertile Men. *Reproductive System and Sexual Disorders* **1**: 1–6.
- Islam M, Köpf I, Levan A, Granberg S, Friberg LG, Levan G. 1993.** Cytogenetic findings in 111 ovarian cancer patients therapy-related chromosome aberrations and heterochromatic variants. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **65**: 35–46.
- Joseph-George AM, He Y, Marshall CR, et al. 2011.** Euchromatic 9q13-q21 duplication variants are tandem segmental amplifications of sequence reciprocal to 9q13-q21 deletions. *Journal of Medical Genetics* **48**: 317–322.
- Kočárek E. 2008.** *Genetika*. Scientia.
- Kosyakova N, Grigorian A, Liehr T, et al. 2013.** Heteromorphic variants of chromosome 9. *Molecular Cytogenetics* **6**: 1–11.
- De la Fuente-Cortés BE, Cerda-Flores RM, Dávila-Rodríguez MI, García-Vielma C, De la Rosa Alvarado RM, Cortés-Gutiérrez EI. 2009.** Chromosomal abnormalities and polymorphic variants in couples with repeated miscarriage in Mexico. *Reproductive BioMedicine Online* **18**: 543–548.
- Madon PF, Athalye AS, Parikh FR. 2005.** Polymorphic variants on chromosomes probably play a significant role in infertility. *Reproductive BioMedicine Online* **11**: 726–732.
- Minocherhomji S, Athalye AS, Madon PF, Kulkarni D, Uttamchandani SA, Parikh FR. 2009.** A case-control study identifying chromosomal polymorphic variations as forms of epigenetic alterations associated with the infertility phenotype. *Fertility and Sterility* **92**: 88–95.
- Mitelman F. 1995.** *ISCN 1995: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Karger.
- Morel F, Laudier B, Guérif F, et al. 2007.** Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization. *Human Reproduction* **22**: 136–141.
- Moreno Fuenmayor H, Roldan-Paris L, Bermúdez H. 1981.** Ectodermal dysplasia in females and inversion of chromosome 9. *Journal of Medical Genetics* **18**: 214–217.
- Plath K, Mlynarczyk-Evans S, Nusinow DA, Panning B. 2002.** Xist RNA and the mechanism of X chromosome inactivation. *Annu. Rev. Genet.* **36**: 233–78.
- Ponnudurai R, Srinivasan B, Sumitha R, et al. 2012.** Klinefelter's syndrome (mosaic) with chromosome 9 inv and schizophrenia. *Indian Journal of Psychiatry* **54**: 88–90.
- Posam P, Sabnis A. 2016.** Polymorphic variation of Y chromosome in recurrent miscarriages. *International Journal Of Recent Scientific Research* **7**: 8551–8554.
- Purandare H, Fernandes NV, Deshmukh SV, Chavan S. 2011.** Heterochromatic variations and pregnancy losses in humans. *International Journal of Human Genetics* **11**: 167–175.
- Ramegowda S, Savitha MR, Krishnamurthy B, Doddaiiah N, Subramanyam PN, Ramachandra NB. 2007.** Association Between Pericentric Inversion in Chromosome 9 and Congenital Heart Defects. *International Journal of Human Genetics* **7**: 241–248.
- Rao B V, Kerketta L, Korgaonkar S, Ghosh K. 2006.** Pericentric inversion of chromosome 9[inv(9)(p12q13)]: Its association with genetic diseases. *Indian Journal of Human Genetics* **12**: 129–132.
- Rooney D. 2001.** *Human Cytogenetics: Constitutional Analysis*. Oxford University Press.
- Sahin FI, Yilmaz Z, Yuregir OO. 2008.** Chromosome heteromorphisms: an impact on infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **25**: 191–195.
- Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. 2013.** *ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013)*. Karger.
- Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. 2016.** *ISCN 2016: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2016)*. Karger.
- Stanojević M, Stipoljev F, Koprčina B, Kurjak A. 2000.** Oculo-auriculo-vertebral (Goldenhar) spectrum associated with pericentric inversion 9: Coincidental finding or etiologic factor? *Journal of craniofacial genetics and developmental biology* **20**: 150–154.
- Šípek AJ, Mihalová R, Celbová L, Panczak A. 2012.** Cytogenetické varianty v klinické

- pediatrické praxi. *Pediatric pro praxi* **13**: 398–400.
- Šípek AJ, Mihalová R, Celbová L, Suttrová E, Panczak A. 2012.** Varianty chromosomu 9 v novorozenecké populaci a jejich klinický význam. *Neonatologické listy* **18**: 13–15.
- Šípek AJ, Mihalová R, Panczak A, Celbová L, et al. 2012.** Varianty lidských chromozomů a jejich význam z pohledu klinické genetiky. *Praktický Lékař* **92**: 205–209.
- Šípek AJ, Mihalová R, Panczak A, et al. 2014.** Heterochromatin variants in human karyotypes: A possible association with reproductive failure. *Reproductive BioMedicine Online* **29**: 245–250.
- Turan GA, Genç M, Kasap E, et al. 2015.** Chromosomal abnormalities and polymorphisms among couples with recurrent *in vitro* fertilization (IVF) failure. *International Medical Journal of Sifa University* **2**: 49–51.
- Vránová V, Mentzlová D, Oltová A, et al. 2008.** Efficacy of high-resolution comparative genomic hybridization (HR-CGH) in detection of chromosomal abnormalities in children with acute leukaemia. *Neoplasma* **55**: 23–30.
- Wilson A, Watt K, Ma S. 2017.** The incidence of long heterochromatic polymorphism variants in infants conceived through assisted reproductive technologies. *Reproductive BioMedicine Online* **35**: 219–224.
- Wyandt HE, Tonk VS. 2012.** *Human Chromosome Variation: Heteromorphism and Polymorphism*. Springer.