

Základy klinické cytogenetiky – chromosomy

Hanáková M.



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



SHRNUTÍ PŘEDNÁŠKY

- **chromosomy**
- **metody přípravy chromosomových preparátů, hodnocení chromosomů, metody molekulární cytogenetiky**
- **vrozené chromosomové aberace**
- **onkocytogenetika**



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

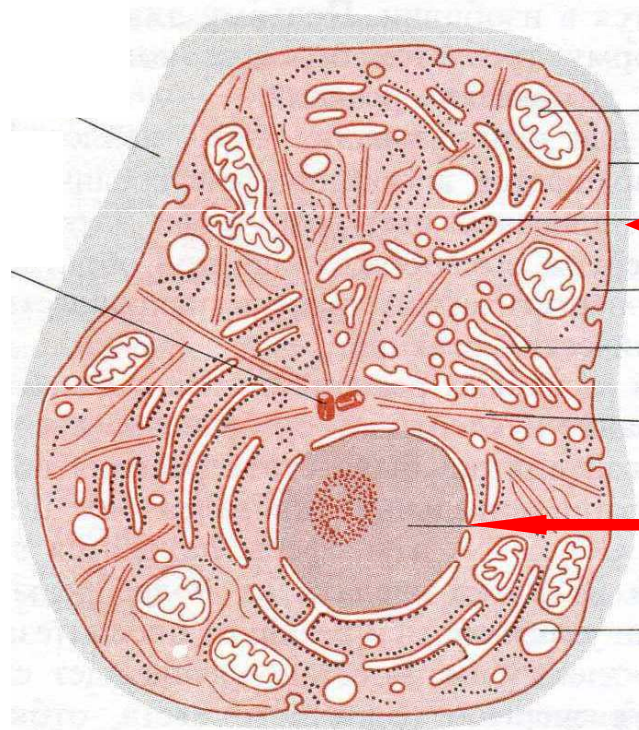


DEFINICE A HISTORIE

- **klinická cytogenetika** se zabývá analýzou **chromosomů** (jejich počtem a morfologií) a vztahem mezi nálezy chromosomových aberací a fenotypovými projevy.
- **vznik moderní lidské cytogenetiky** se datuje od roku 1956, kdy byly vyvinuty efektivní metodiky chromosomální analýzy a bylo stanoveno, že normální počet lidských chromosomů je **46**.



SCHEMA ŽIVOČIŠNÉ BUŇKY



cytoplasma s organelami

buněčné jádro

DEFINICE KLINICKÉ CYTOGENETIKY

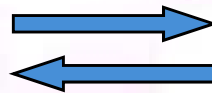
- **klinická cytogenetika**

zabývá se **analýzou chromosomů**

- počtem
- morfologií
- vztahem mezi nálezy chromosomových změn a fenotypovými projevy



DNA rozptýlená v buněčném jádře

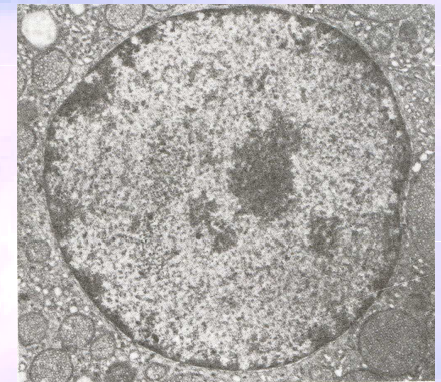


chromosomy = spiralizované molekuly DNA
počet chromosomů člověka = 46

JADERNÝ MATERIÁL

pojmy **chromatin** a **chromosomy** - týkají se téhož jaderného materiálu, odlišnost ve stupni spiralizace v závislosti na fázi buněčného cyklu

- **chromatin** – komplex DNA s chromosomovými proteiny (pojem používaný pro **interfázi**, kdy se většina chromatinu nachází v rozvolněném stavu)
- **chromosom** – chromatin spiralizovaný **v mitóze** (mitóza proces dělení buňky, při kterém dochází k rozdělení genetického materiálu mezi 2 dceřinné buňky)

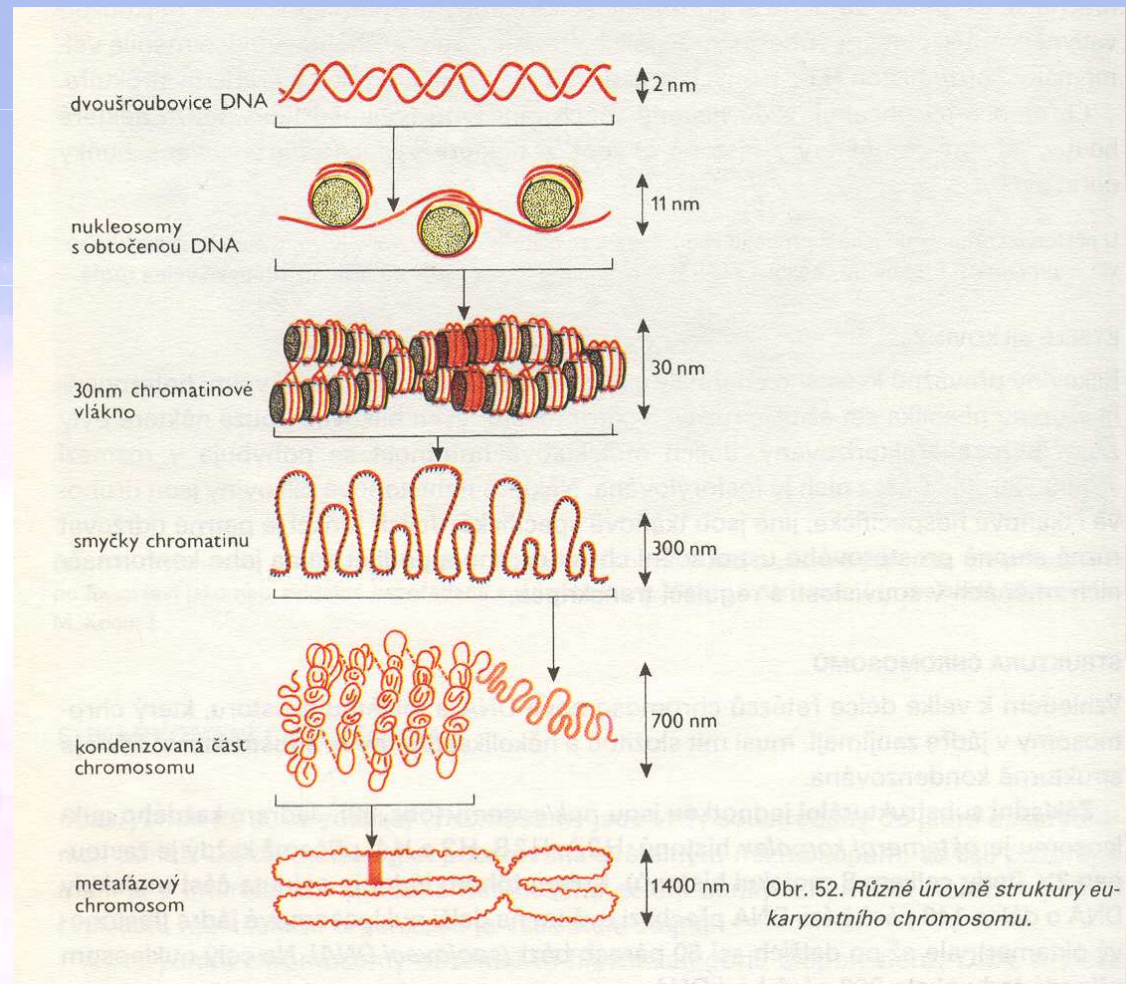


CHROMATIN A CHROMOSOMY

BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU

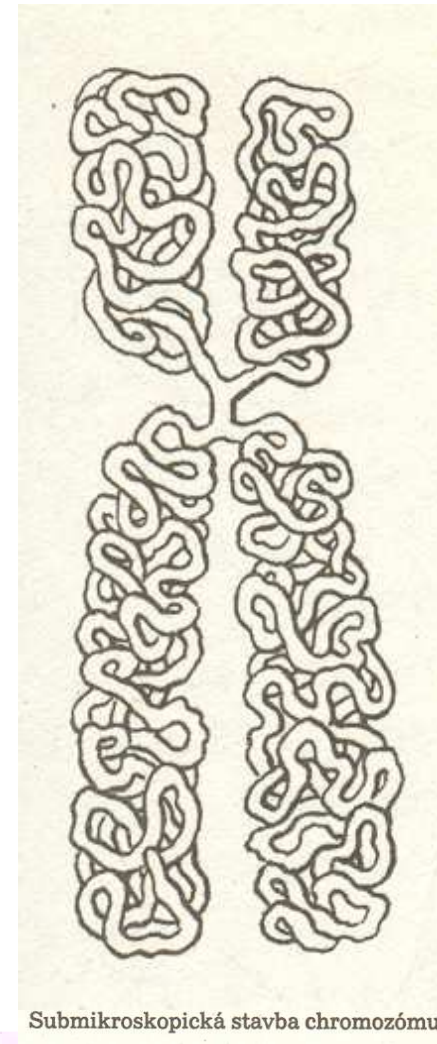
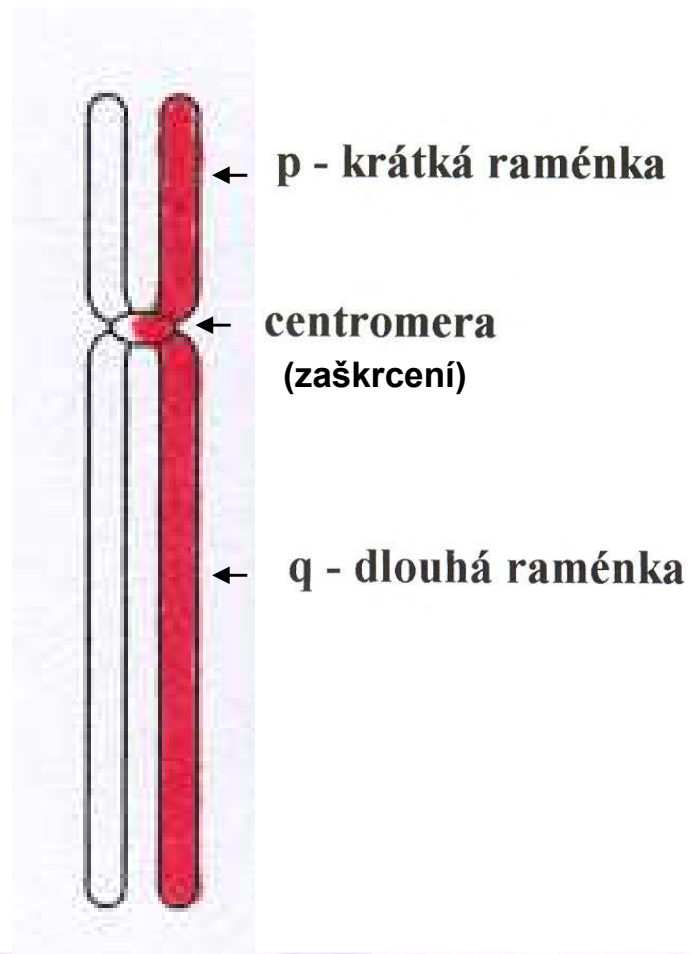
kondenzace chromatinu, vznik chromosomů

během buněčného cyklu se chromatin nachází v různých fázích spiralizace (v interfázi nízký stupeň spiralizace, během mitózy postupná kondenzace, maximální v metafázi mitózy)



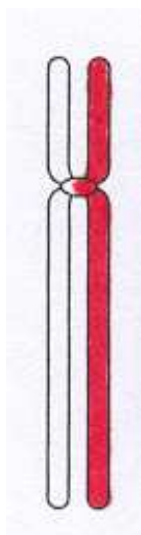
CHROMOSOM

tyčinková struktura

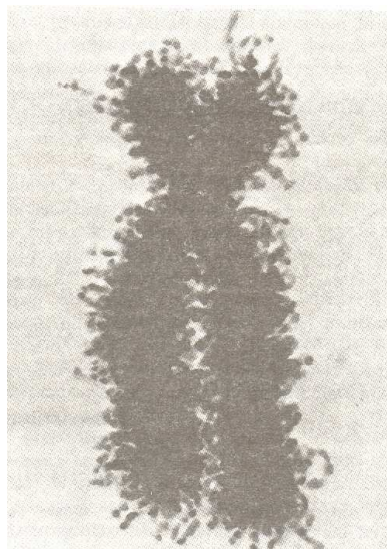


CHROMOSOMY V PRAXI

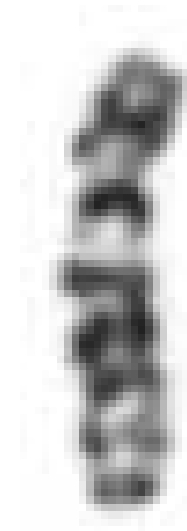
schema chromosomu



chromosom pozorovaný
v elektronovém mikroskopu



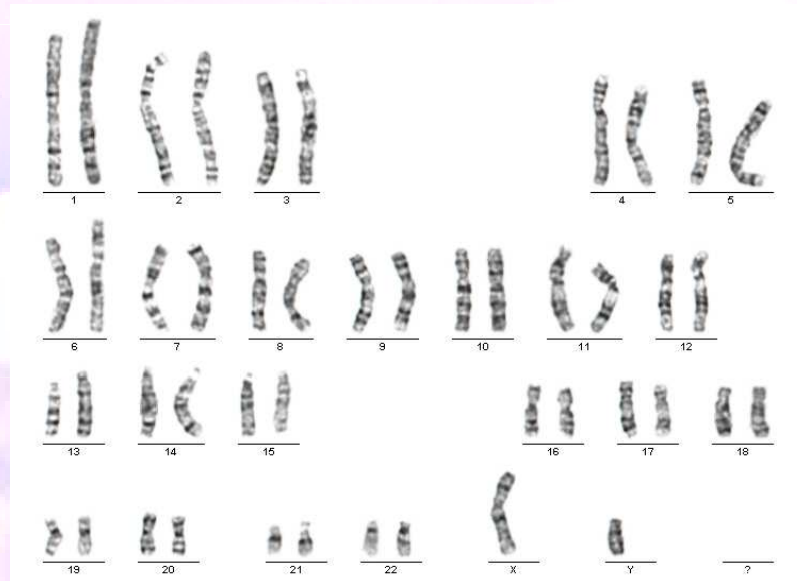
chromosom z naší laboratoře



CHROMOSOMY V PRAXI

karyotyp

- **soubor chromosomů** jedince nebo buňky s označením jejich **počtu**, **druhu pohlavních chromosomů** a případných **aberací**
- lidský karyotyp se skládá ze **46 chromosomů**, z toho **22 párů autosomů** (nepohlavních chromosomů) a **2 gonosomů** (pohlavních chromosomů)
- chromosomový pár je tvořen **homologními** chromosomy, z nichž jeden je zděděn od otce a druhý od matky, nepárové chromosomy jsou **nehomologní** (somatické diploidní buňky)



ZÁPIS KARYOTYPU

46,XX - normální ženský karyotyp

46,XY - normální mužský karyotyp

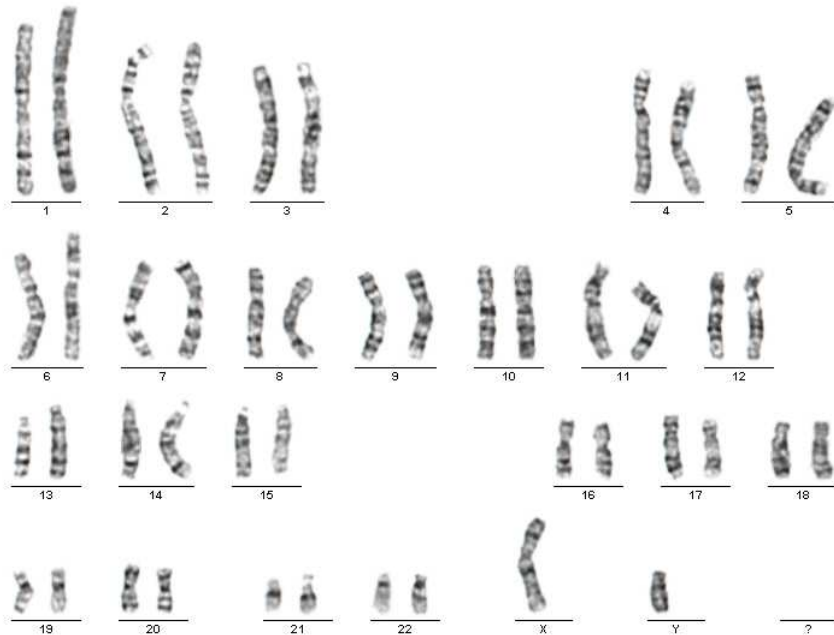
počet chromosomů v jádrech buněk jedince

druh pohlavních chromosomů

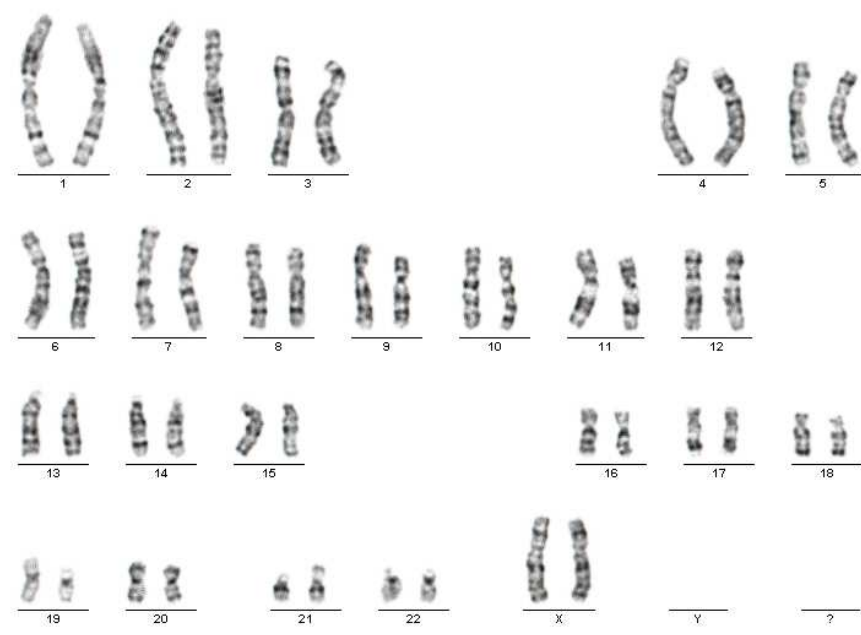
CHROMOSOMY V PRAXI

normální karyotyp

normální mužský karyotyp 46,XY



normální ženský karyotyp 46,XX



CHROMOSOMY V PRAXI

odběr materiálu

Odběr materiálu pro účely **cytogenetického vyšetření**, vždy za sterilních podmínek!!!

- do **heparinu** (nesrážlivá krev) – periferní krev, krev plodu (obv. 3 ml)
- do heparinu a transportního média – kostní dřeň (obv. 1-2 ml)
- do transportního média – solidní tumory, kůže (obv. 1x1 cm), choriové klky (obv. 20 mg)
- **bez přídavku** média a dalších látek – plodová voda (obv. 20 ml)



CHROMOSOMY V PRAXI

odběr materiálu



odebraná
periferní
krev



odebrané choriové klky



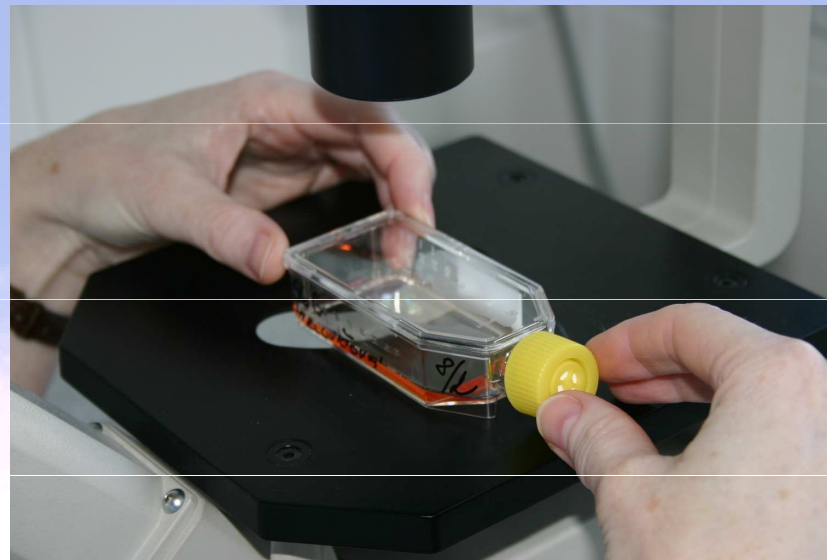
odběr plodové vody

CHROMOSOMY V PRAXI

kultivace materiálu



kultivace periferní krve,
délka 48 nebo 72 hodin



kultivace plodové vody,
délka kultivace asi 10 dní

- délka kultivace se liší v závislosti na typu materiálu a vyšetření (bez kultivace (kostní dřeň) – několik týdnů (solidní tumory))
- podmínky kultivace se liší u různých materiálů

CHROMOSOMY V PRAXI

zpracování suspenze

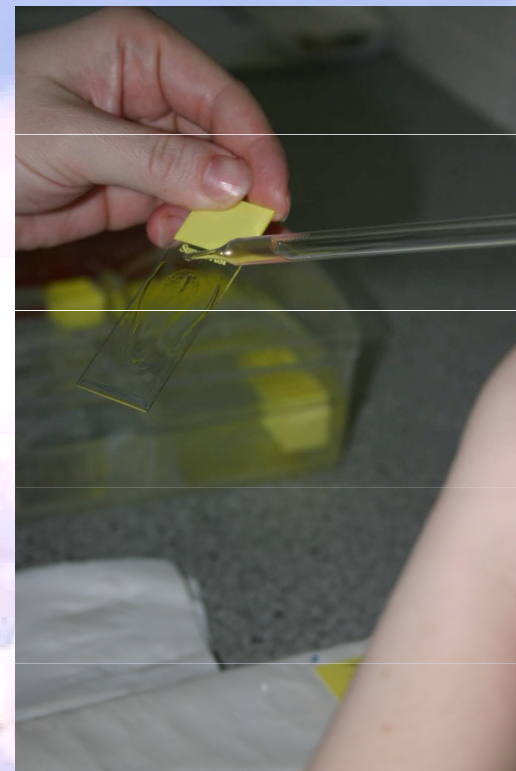
- **aplikace kolchicinu**
(alkaloid z ocúnu jesenního *Colchicum autumnale*)
 - zastavení dělení buněk v mitóze
jaderný materiál zůstane spiralizován ve formě chromosomů, které jsou vhodné k analýze



CHROMOSOMY V PRAXI

zpracování suspenze

vykapání suspenze na sklíčka



CHROMOSOMY V PRAXI

pruhování chromosomů

metody klasické cytogenetiky

pruhování chromosomů

analýza karyotypu, karyotypu maligních klonů

chromosomy s G – pruhy – střídavé tmavé a světlé proužky různé tloušťky

(G = barvení Giemsovým barvivem po předchozím vystavení chromosomů působení enzymu trypsinu, který natráví chromosomové bílkoviny)

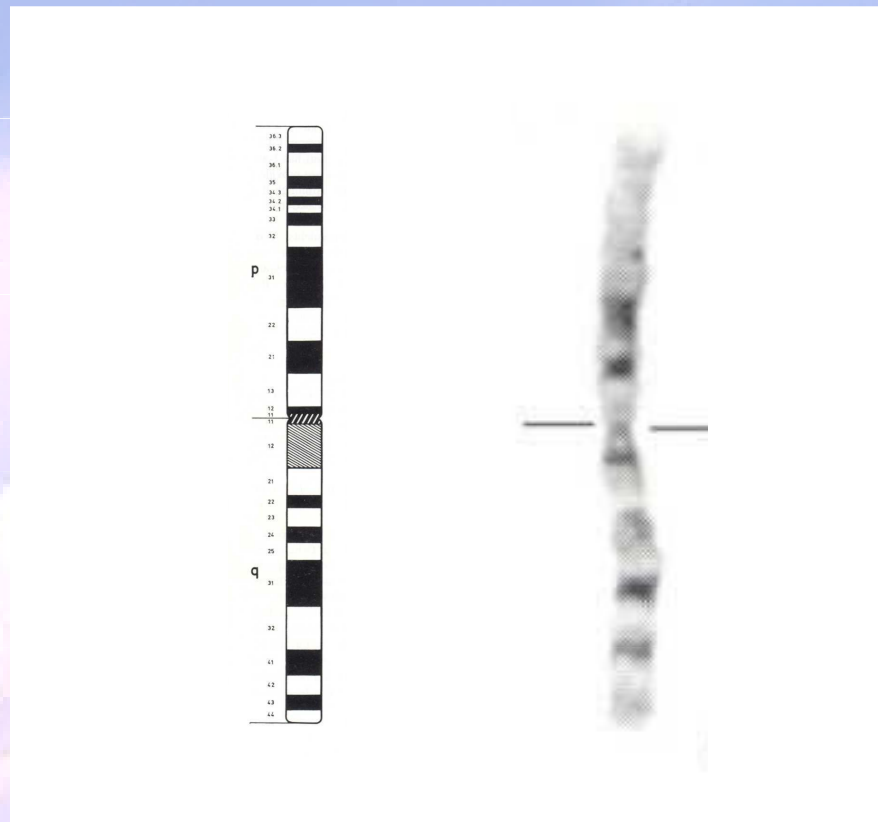


CHROMOSOMY V PRAXI

pruhování chromosomů

metody klasické cytogenetiky

G – pruhování chromosomu č. 1 – vzor a reálný chromosom



CHROMOSOMY V PRAXI

hodnocení metody klasické cytogenetiky

chromosomy hodnotíme ve **světelném mikroskopu** při zvětšení přibližně 1250x za použití imersních objektivů

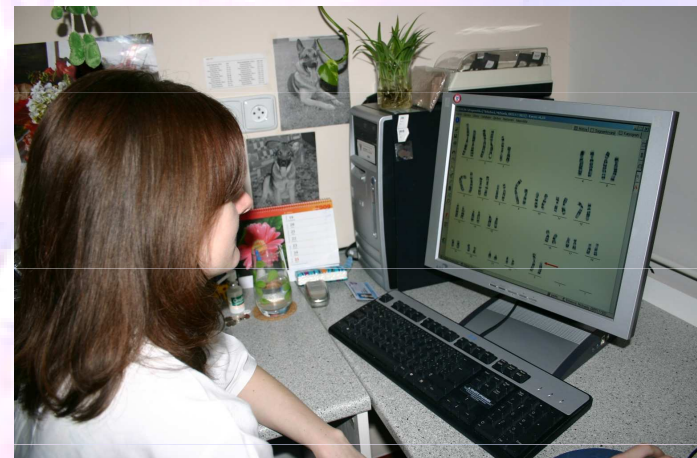


CHROMOSOMY V PRAXI

hodnocení metody klasické cytogenetiky

ke třídění chromosomů a sestavení karyotypu lze využít počítačového programu Lucia

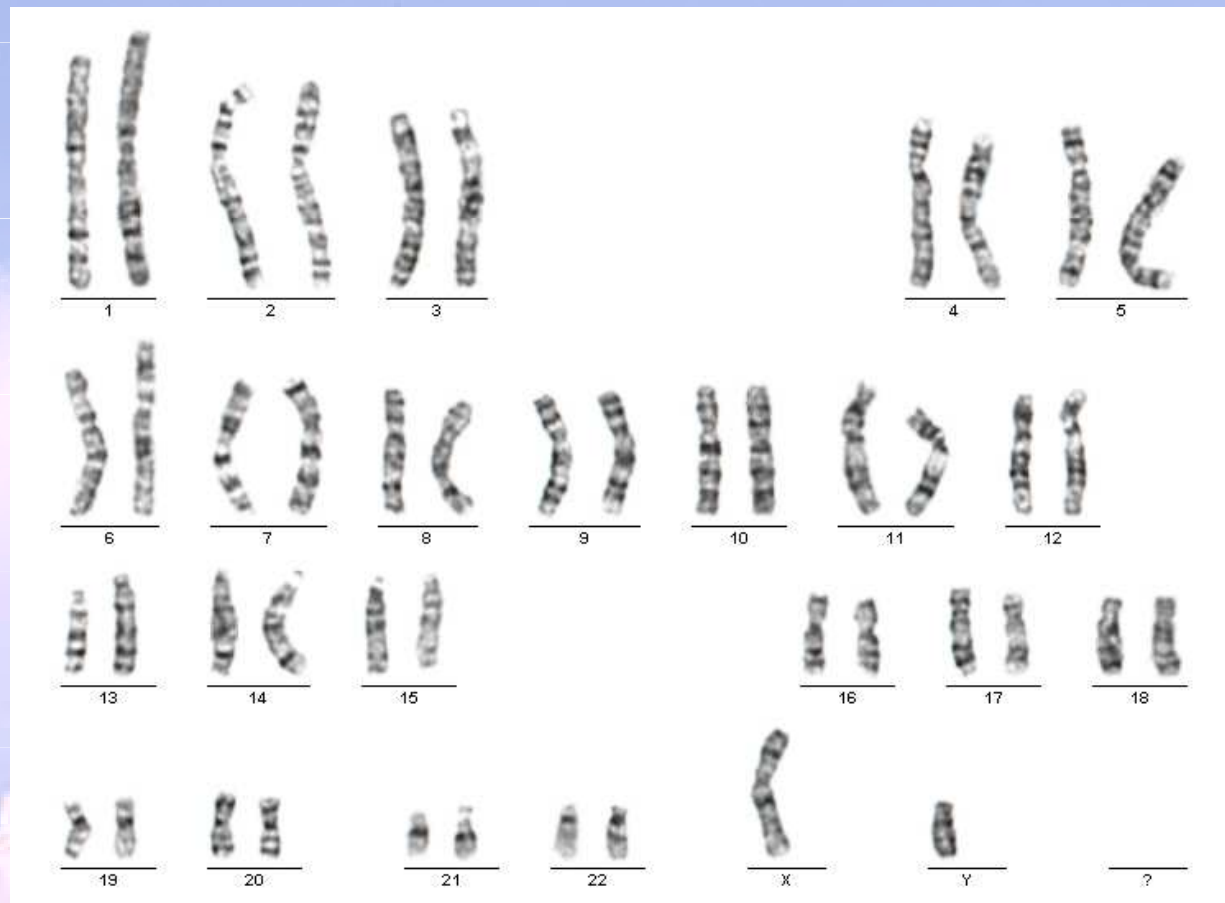
světelný mikroskop
s CCD kamerou
napojený na počítač



CHROMOSOMY V PRAXI

hodnocení metody klasické cytogenetiky

karyotyp sestavený na počítačovém programu Lucia



CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (ABERACE)

- **vrozené chromosomové aberace (VCA)**
(vyšetření karyotypu) – **početní**
- **strukturní**

Klinické indikace k postnatálnímu stanovení karyotypu (VCA)

- **problémy časného růstu a vývoje**

neprospívání, opoždění vývoje, dysmorfická facies, mnohočetné malformace, malá postava, obojetný genitál, mentální retardace

- **narození mrtvého plodu a úmrtí novorozence**

výskyt chromosomových abnormalit je vyšší u případů narození mrtvého plodu (téměř 10%) než u živě narozených dětí (asi 0,7%), zvýšený výskyt také u dětí, které umírají v novorozeneckém období (okolo 10%)

- **problémy s fertilitou**

ženy s amenoreou, infertilní páry, opakované spontánní aborty, partneři před IVF

- **rodinná anamnéza**

známá nebo suspektní chromosomová abnormalita u příbuzných

- **dárci gamet, děti k adopci**



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

- významně se podílejí na mnoha případech poruch reprodukce, vrozených malformací, mentálních retardací
- cytogenetické poruchy jsou přítomny přibližně u 1% živě narozených dětí

Tabulka 9.1 Výskyt chromozomálních abnormalit v různých fázích prenatalního a postnatalního vývoje

Abnormální karyotyp	Potraty v prvním trimestru	Plody matek starších než 35 let*	Živě narozené děti
Celkový výskyt	1/2	1/50	1/160
Procento abnormalit			
Numerické abnormality	96 %	85 %	60 %
Strukturní abnormality			
balancované	–	10 %	30 %
nebalancované	4 %	5 %	10 %

* Výsledky vyšetření z amniocentéz. Údaje shrnuty v práci Hsu LYF Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities through amniocentesis. In Milunsky A (ed.) Genetic Disorders and the Fetus, 4. vyd., Baltimore, Johns Hopkins University Press 1998, 179–248.

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) abnormality počtu chromosomů

- **abnormality počtu chromosomů**

- **aneuploidie** – nejčastější a klinicky velmi významný typ chromosomových poruch
 - abnormality počtu chromosomů v páru
 - tento stav je vždy spojen s poruchou fyzického nebo mentálního vývoje



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) abnormality počtu chromosomů aneuploidie

- **trisomie** – nejčastější porucha
(přítomnost nadbytečného chromosomu v páru)

trisomie autosomů - (trisomie celého chromosomu je jen vzácně
slučitelná se životem)

- Downův syndrom 47,XX,+21 (47,XY,+21)
- Edwardsův syndrom 47,XX,+18 (47,XY,+18)
- Patauův syndrom 47,XX,+13 (47,XY,+13)

trisomie gonosomů - (fenotypové důsledky jsou méně závažné
než u trisomie autosomů)

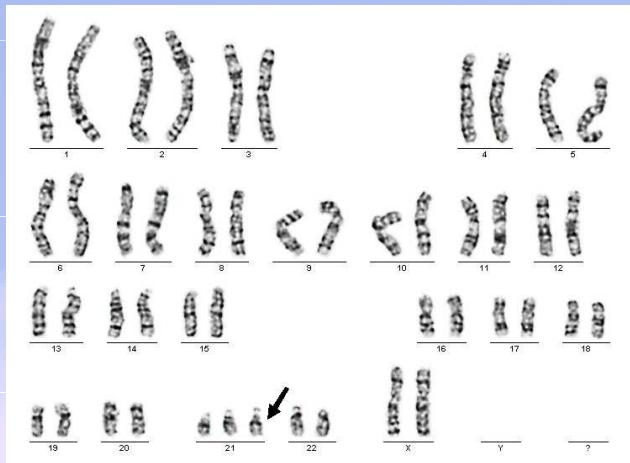
- Klinefelterův syndrom 47,XXY (muž)



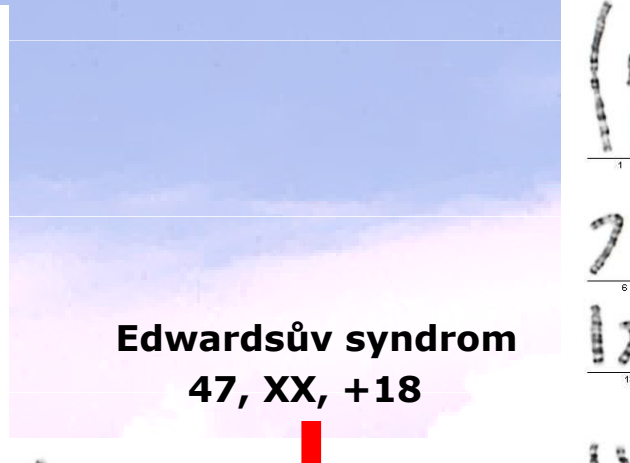
VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

abnormality počtu autosomů

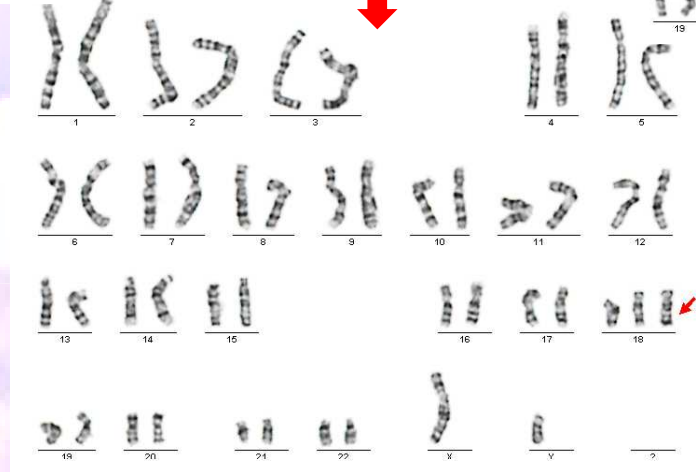
Downův, Edwardsův a Patauův syndrom



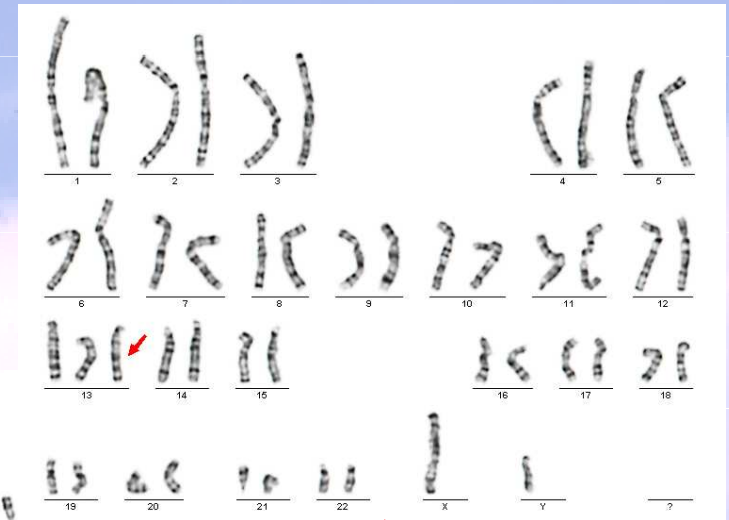
Downův syndrom
47, XX, +21



Edwardsův syndrom
47, XX, +18



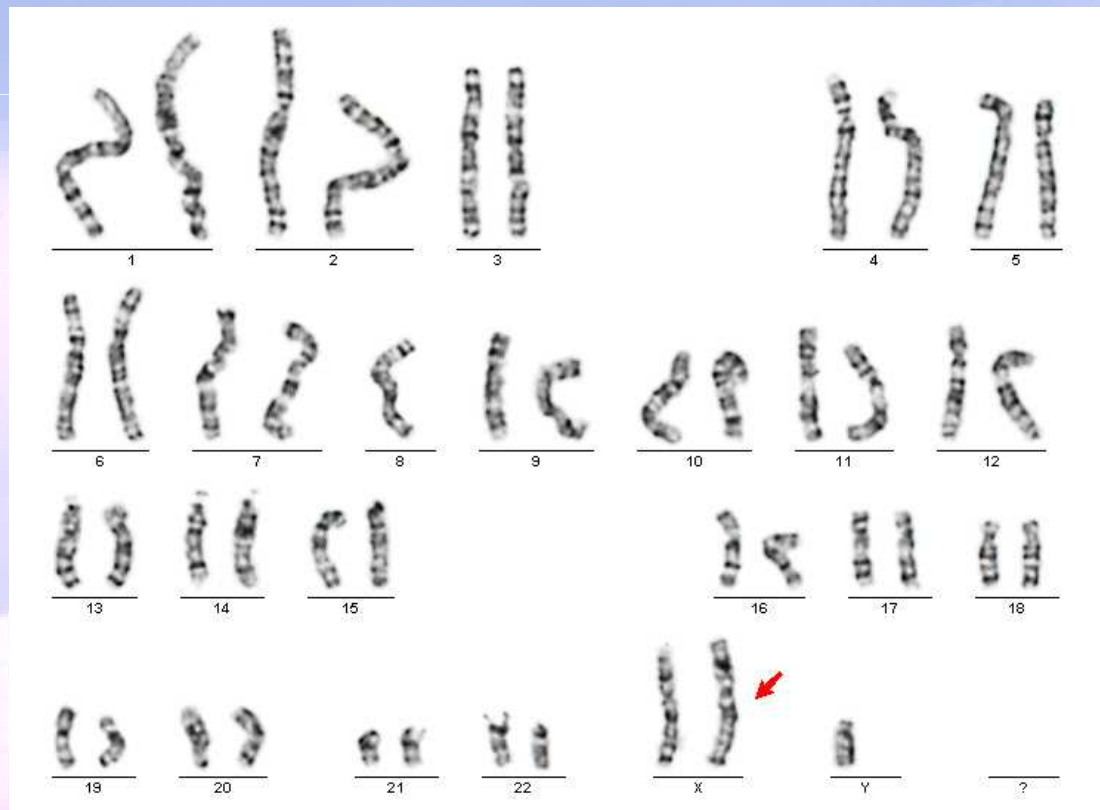
Patauův syndrom
47, XX, +13



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

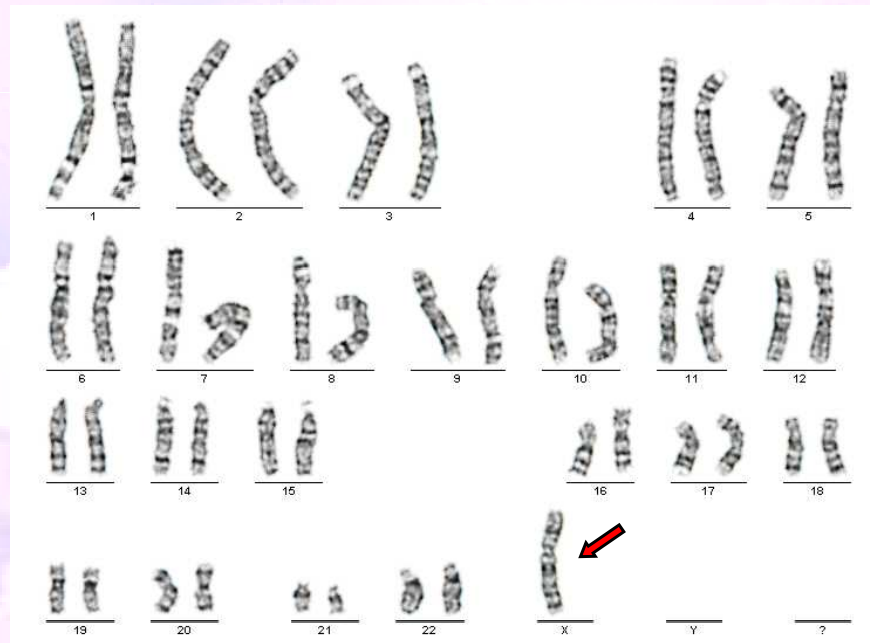
abnormality počtu gonosomů
Klinefelterův syndrom

Klinefelterův syndrom 47,XXY



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) abnormality počtu chromosomů aneuploidie

- **monosomie** – méně častá porucha
(chybění 1 chromosomu v páru)
 - **monosomie gonosomu X** (Turnerův syndrom)
45,X (žena), častý výskyt



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby

- **strukturní abnormality chromosomů**

- méně časté než aneuploidie
- dochází k přestavbám a následně ke změnám morfologie chromosomů
- předpokladem je vznik zlomů na chromosomech



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



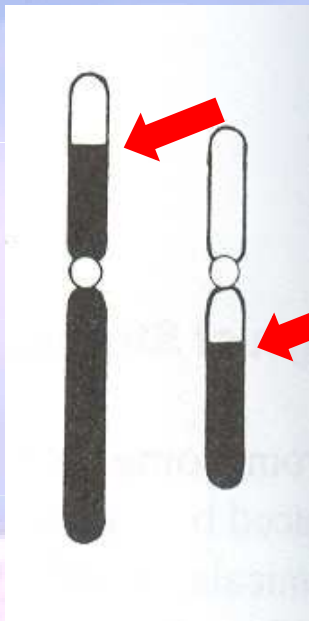
VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokace

- **balancované přestavby** - v sadě chromosomů je zachováno normální množství chromosomového materiálu (žádný materiál nechybí ani nepřebývá)
 - většinou nemají fenotypové vyjádření (nejsou přítomny poruchy fyzického nebo mentálního vývoje), v buňkách je přítomen veškerý chromosomový materiál, i když v odlišném uspořádání
- **nebalancované přestavby** - část chromosomového materiálu v karyotypu chybí (parciální, částečná monosomie) a část přebývá (parciální trisomie)
 - většinou dochází k fenotypovým abnormalitám



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby, balancované translokace

- **translokace** – nejčastější ze strukturních aberací, předpokladem je vznik dvou zlomů, každý na jednom chromosomu



výměny segmentů mezi dvěma chromosomy

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokace

translokace u svých nositelů většinou nezpůsobují abnormální fenotyp, ale jsou spjaty s **vysokým rizikem vzniku nebalancovaných gamet** a s tím souvisejících potratů nebo narození **potomků s nebalancovaným karyotypem** (parciální monosomie jednoho a parciální trisomie druhého chromosomu)

rodiče normální fenotyp,
matka nositelka translokace

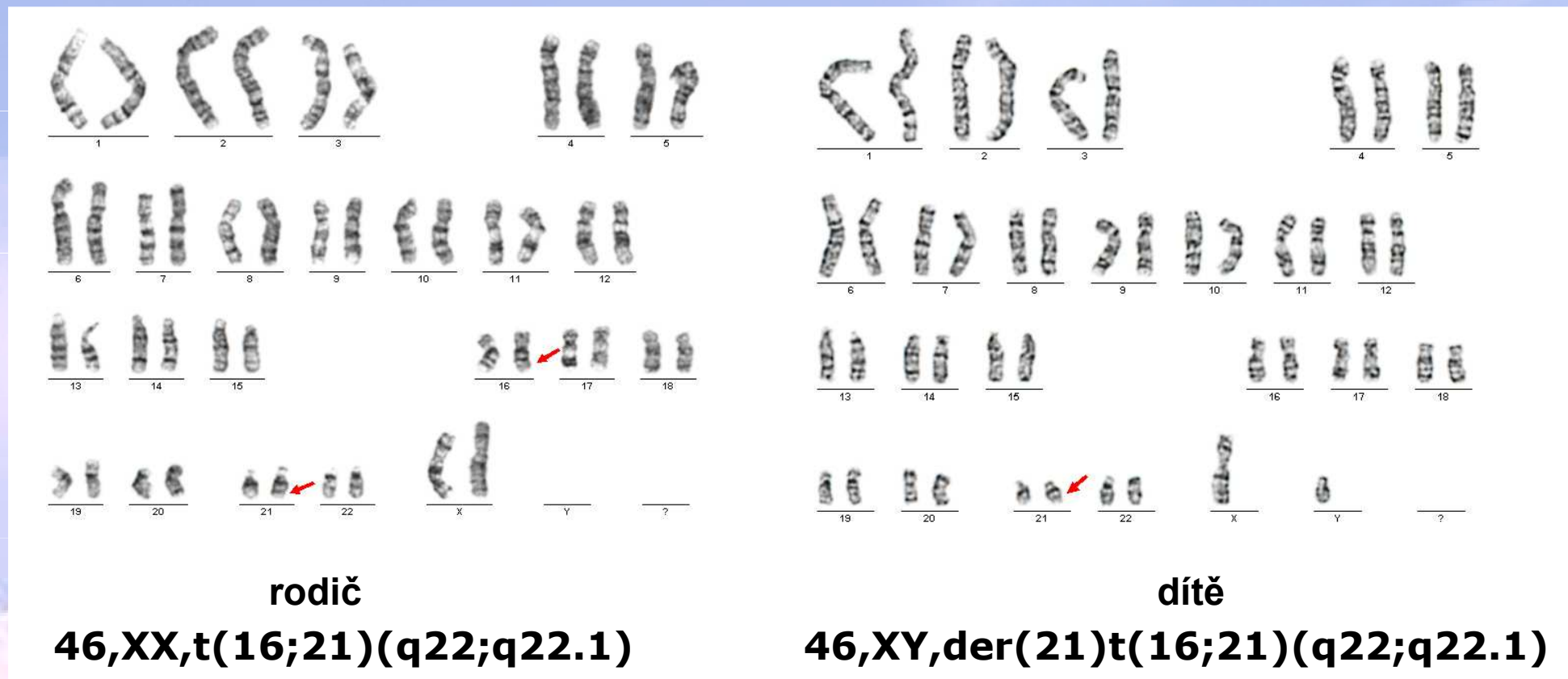
dítě postižené, po matce zdědilo
1 derivovaný chromosom pocházející
z translokace



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

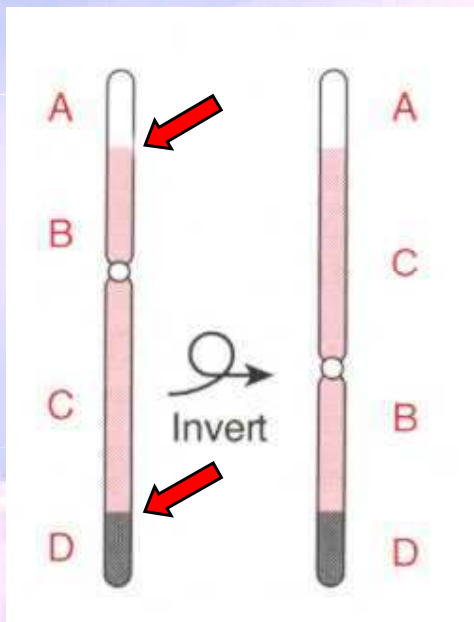


VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokace



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby, balancované inverze

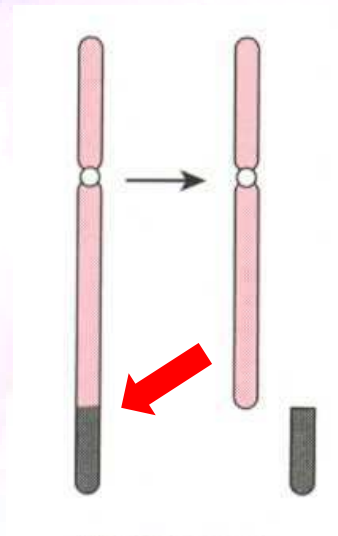
- **inverze** – na jednom chromosomu vzniknou 2 zlomy, segment mezi nimi se otočí o 180° a opět se začlení do chromosomu



inverze u svých nositelů většinou nezpůsobují abnormální fenotyp, ale jsou spjaty s **vysokým rizikem vzniku nebalancovaných gamet** a narození abnormálních potomků

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby, nebalancované delece

- **delece** – vznik zlomů a ztráta úseku chromosomu, který způsobuje vznik nebalancovaného karyotypu (**parciální monosomie**)



ZÁPIS KARYOTYPU

Příklady patologických karyotypů:

47,XX,+21 → nadbytečný autosom v jádrech buněk (početní změna)

45,X 47,XXY → chybějící nebo nadbytečný gonosom v karyotypu (početní změna)

46,XX,t(8;21) → translokace v karyotypu (strukturní změna)

46,XX,inv(1) → inverze v karyotypu (strukturní změna)

46,XX,del(5p) → delece v karyotypu (strukturní změna)

Metody molekulární cytogenetiky, příklady využití v klinické cytogenetice



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

- molekulární cytogenetika aplikuje metody molekulární biologie na cytogenetické úrovni, vizualizuje a lokalizuje genetický materiál v buňkách
- pracuje s metafázními chromosomy nebo interfázními jádry
- potvrzuje a upřesňuje nálezy klasické cytogenetiky (metody klasické cytogenetiky – základní vyšetřovací metody, metody molekulární cytogenetiky – metody s vyšší rozlišovací schopností)
- začátek rozvoje – přelom 60.- 70. let 20. století
- metodami klasické cytogenetiky (ve světelném mikroskopu) lze na chromosomech rozlišit strukturní změny pouze o určité velikosti (>5Mb)
- změny menší lze detekovat metodami s vyšší rozlišovací schopností – metodami molekulární cytogenetiky



METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

- molekulárně cytogenetickými technikami **nelze nahradit klasické karyotypování**
(před použitím metod molekulární cytogenetiky je třeba vědět, co chceme hledat – při klasickém karyotypování vidíme karyotyp jako celek za nízkou cenu, vysoká cena molekulárně cytogenetických metod)
- oblasti uplatnění FISH – klinická cytogenetika (postnatální vyšetření u sterilních párů, postižených dětí a dospělých s podezřením na genetickou příčinu onemocnění, genetická analýza pro účely umělého oplodnění, prenatální diagnostika karyotypu plodu)
 - nádorová cytogenetika
 - výzkum (evoluční studie karyotypu, mapování genomu ...)



METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – ISH (in situ hybridizace)

In situ hybridizace (ISH) je metoda umožňující přesnou detekci a lokalizaci specifických úseků DNA na chromosomech nebo v interfázním jádře pomocí vazby specifických krátkých molekul DNA - **sond**, které jsou označeny většinou fluorescenční značkou.



in situ – na původním místě (cílový úsek vizualizujeme na původním místě na chromosomu nebo v interfázním jádře – pozorujeme na podložním sklíčku ve fluorescenčním mikroskopu; (DNA analýza – izolujeme DNA, konkrétní úseky namnožíme (amplifikace), analyzujeme odděleně od ostatního genetického materiálu - jen část genu))

METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

- **FISH (fluorescenční in situ hybridizace)**
(FISH = nejpoužívanější typ ISH)

- sonda je **značená** - fluorescenčně – **FISH** – fluorescenční in situ hybridizace

vazba sondy (próby) k cílovému místu na chromosomu nebo v interfázním jádře.

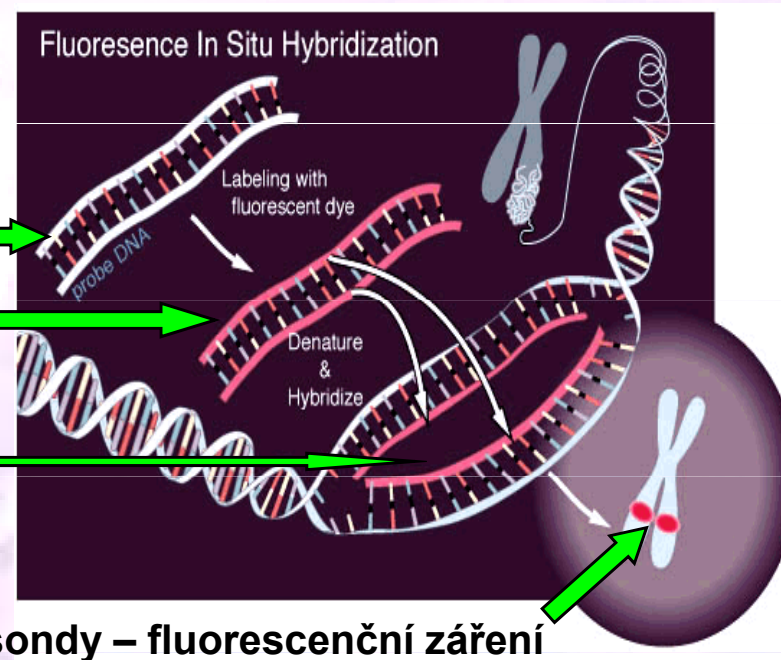
sonda po navázání na cílovou DNA může být vizualizována
– signál pozorujeme ve **fluorescenčním mikroskopu**,
barevné záření vypovídá o místě vazby sondy

sonda před označením fluorescenční značkou

označená sonda

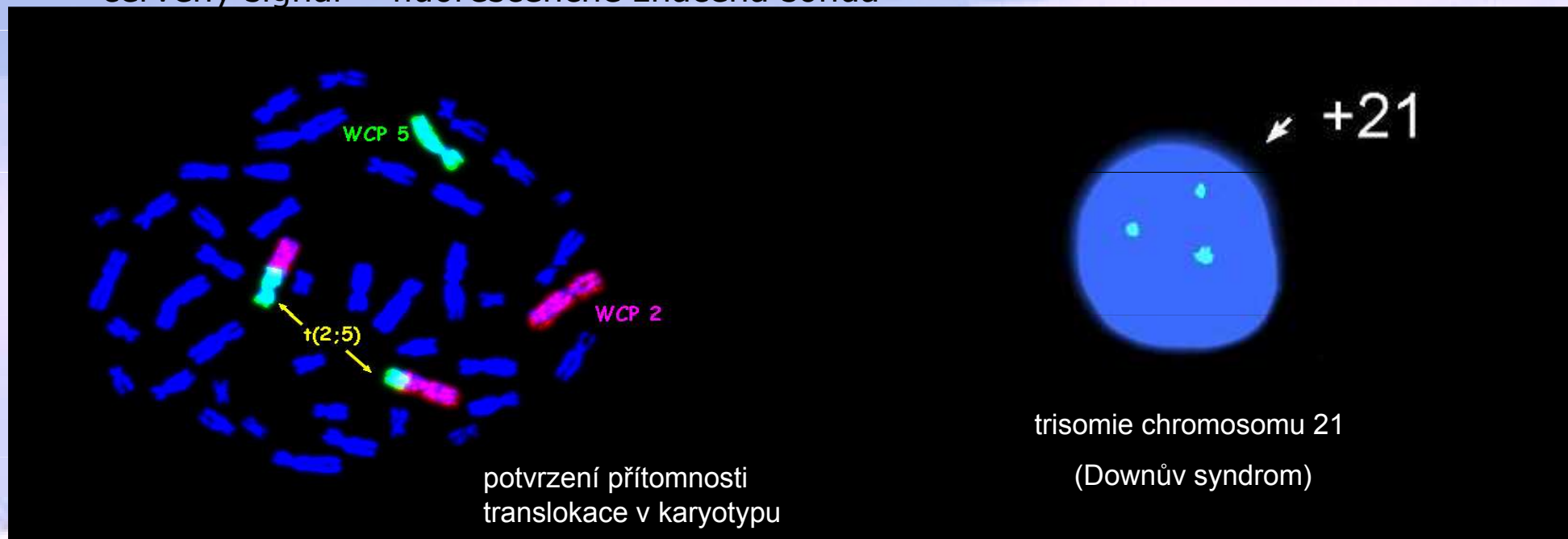
vazba sondy na cílovou DNA

vizualizace místa navázání sondy – fluorescenční záření



METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – FISH (fluorescenční in situ hybridizace)

- **vyhodnocení a zpracování signálu** – FISH - fluorescenční mikroskop napojený na počítač – vizualizace a kvantifikace (signál září v tmavém poli) – modrá barvička (DAPI) obarvuje všechny chromosomy, červený signál = fluorescenčně značená sonda



FISH na metafázních chromosomech

FISH na interfázních jádrech

METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MODIFIKACE FISH

- složitější metody, které vypovídají o genetickém materiálu v celém karyotypu (nejen o jednotlivých specifických úsecích)
- pracují se směsí sond, která je specificky připravená pro danou metodu



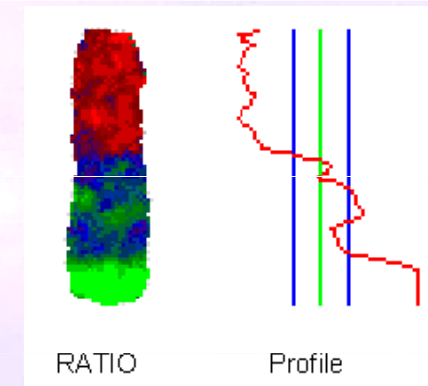
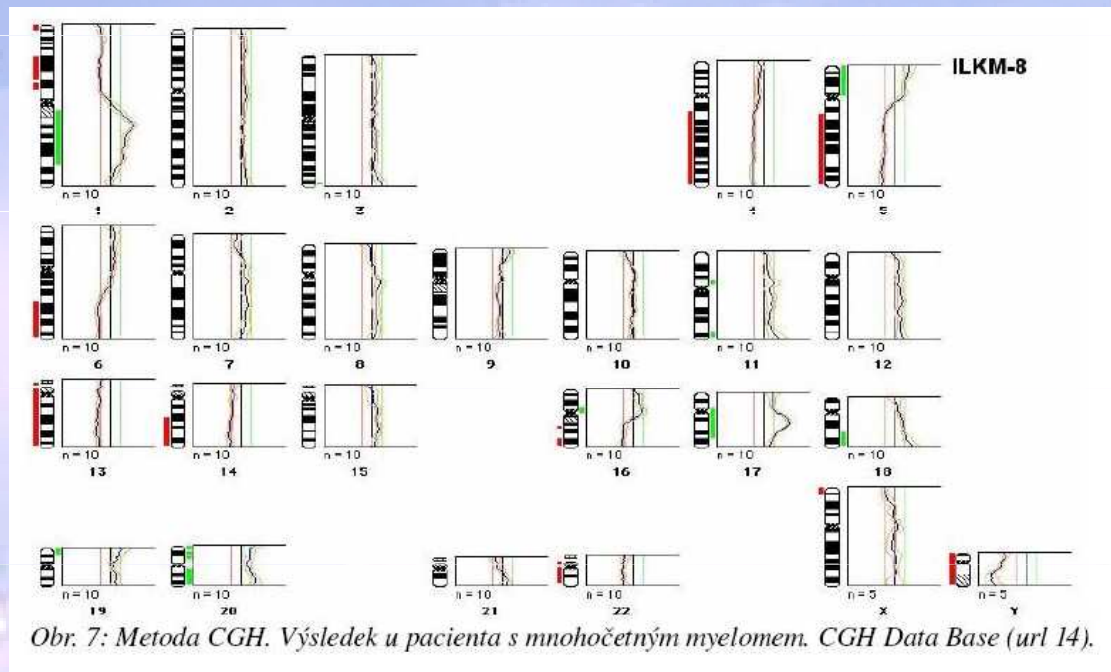
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MODIFIKACE FISH – CGH (komparativní genomová hybridizace)

metoda odhaluje **nebalancovaný** genetický materiál (chybění – nadbytek DNA)

- systém fluorescenční mikroskop – kamera – počítač, analyzační software měří poměr fluorescence při vlnových délkách odpovídajících červenému a zelenému fluorochromu

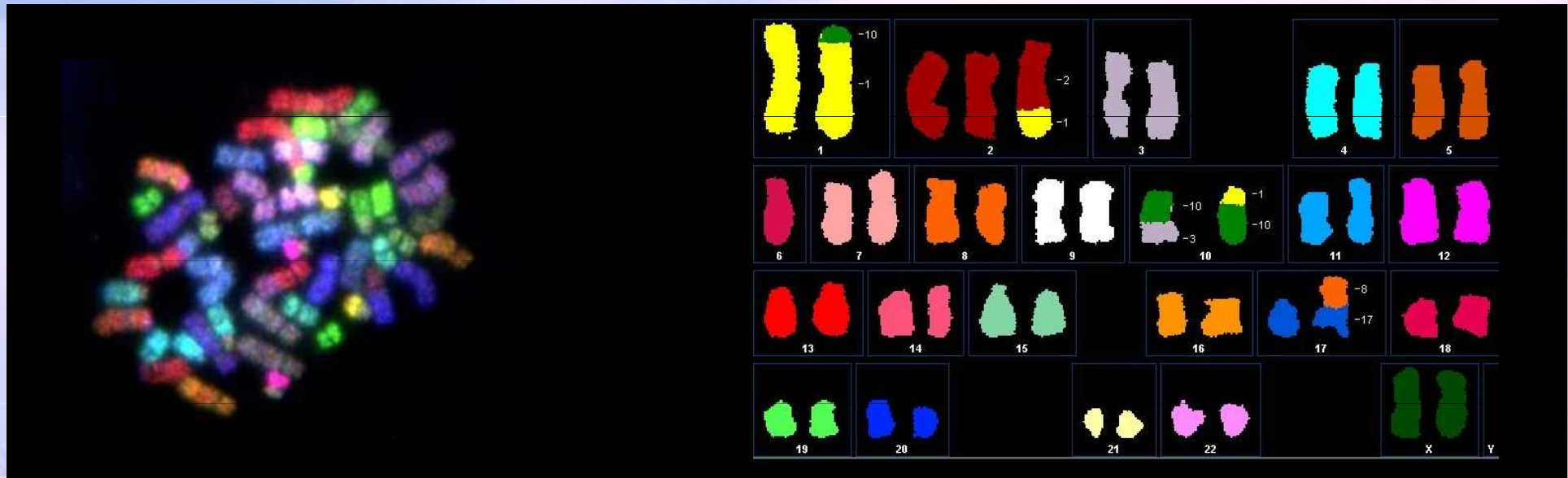


převaha červené fluorescence – křivka vychýlena za hranice intervalu spolehlivosti doleva (delece), převaha zelené fluorescence – křivka vychýlena doprava (nadbytek materiálu)

zeleně označeny úseky na chromosomech, které jsou v karyotypu maligního klonu zmnoženy, červeně označeny chybějící úseky chromozomů (obrázky převzaty z internetu)

METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MODIFIKACE FISH – SKY (spektrální karyotypování), M-FISH (multicolor FISH)

objasnění složitých přestavech

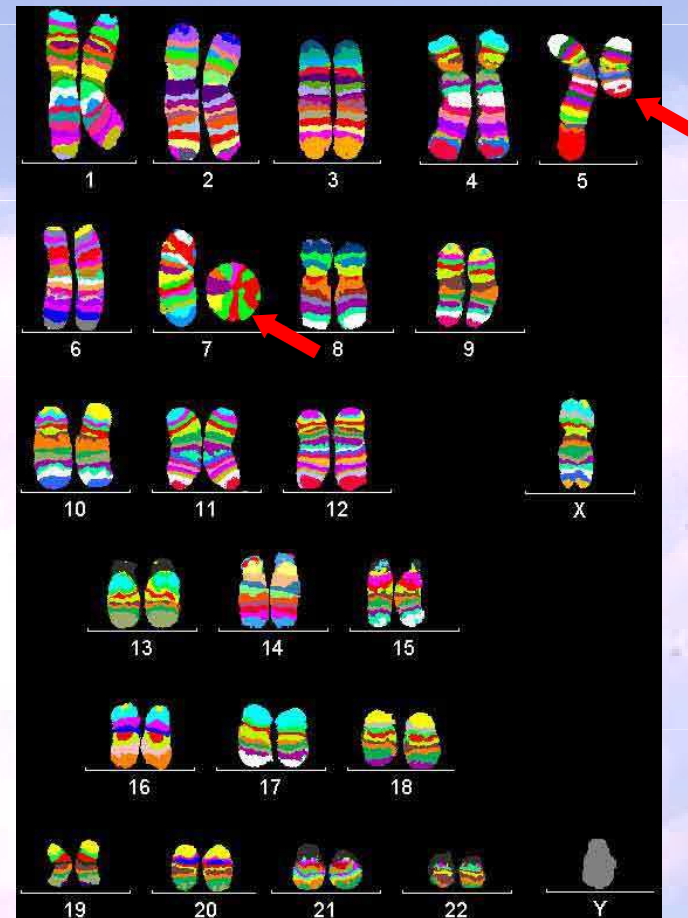


SKY – mitóza po hybridizaci
se směsí sond značených fluorochromy

SKY – seřazené chromosomy po úpravě obrazu

METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MODIFIKACE FISH – m-BAND (mnohobarevné pruhování)

přestavby v rámci jednoho
chromosomu (inverze, delece)



Nádorová cytogenetika



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



ONKOCYTOGENETIKA

základy

- zhoubné bujení je genetické onemocnění
- vznik nádoru (maligní transformace) je mnohastupňový proces – sled genetických změn – mutace genů řídících buněčné dělení, růst a diferenciaci, buněčný zánik, reparaci DNA, **přestavby na úrovni chromosomů a genomu**, narušení integrity genomu (defekty v genech zajišťujících chromosomovou stabilitu a přesný rozchod chromosomů v mitóze)
- maligní buňky mají během vývoje nádoru tendenci akumulovat chromosomové abnormality



ONKOCYTOGENETIKA

základy

- **vyšetření karyotypu maligních klonů z kostní dřeně (klon – skupina buněk se stejnými genetickými změnami)**
- vyšetření metodami klasické cytogenetiky (G-pruhování)
- vyšetření metodami molekulární cytogenetiky (FISH, SKY, CGH, mBAND..)



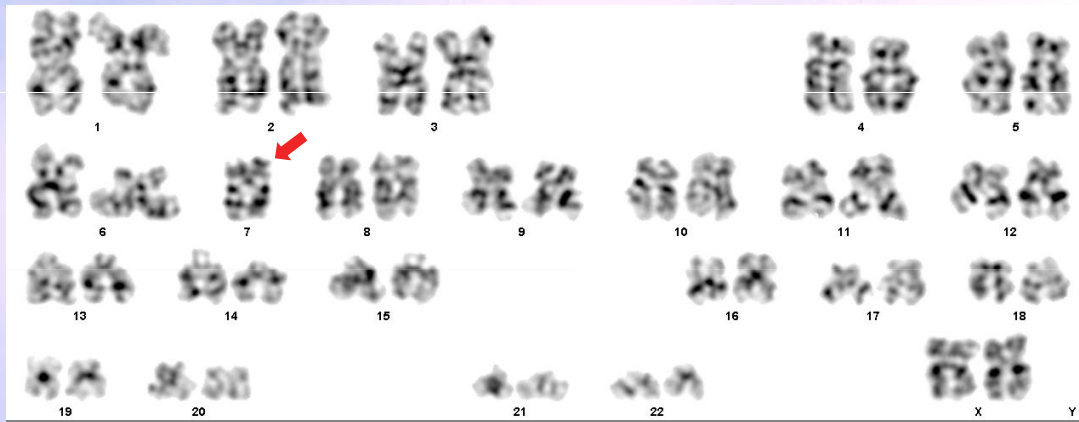
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



ONKOCYTOGENETIKA

typy chromosomových změn

- chromosomové změny – **početní**
 - chybění nebo nadbytek jednotlivých chromosomů – (typické jsou abnormality jiných chromosomů než u VCA)



45,XX,-7

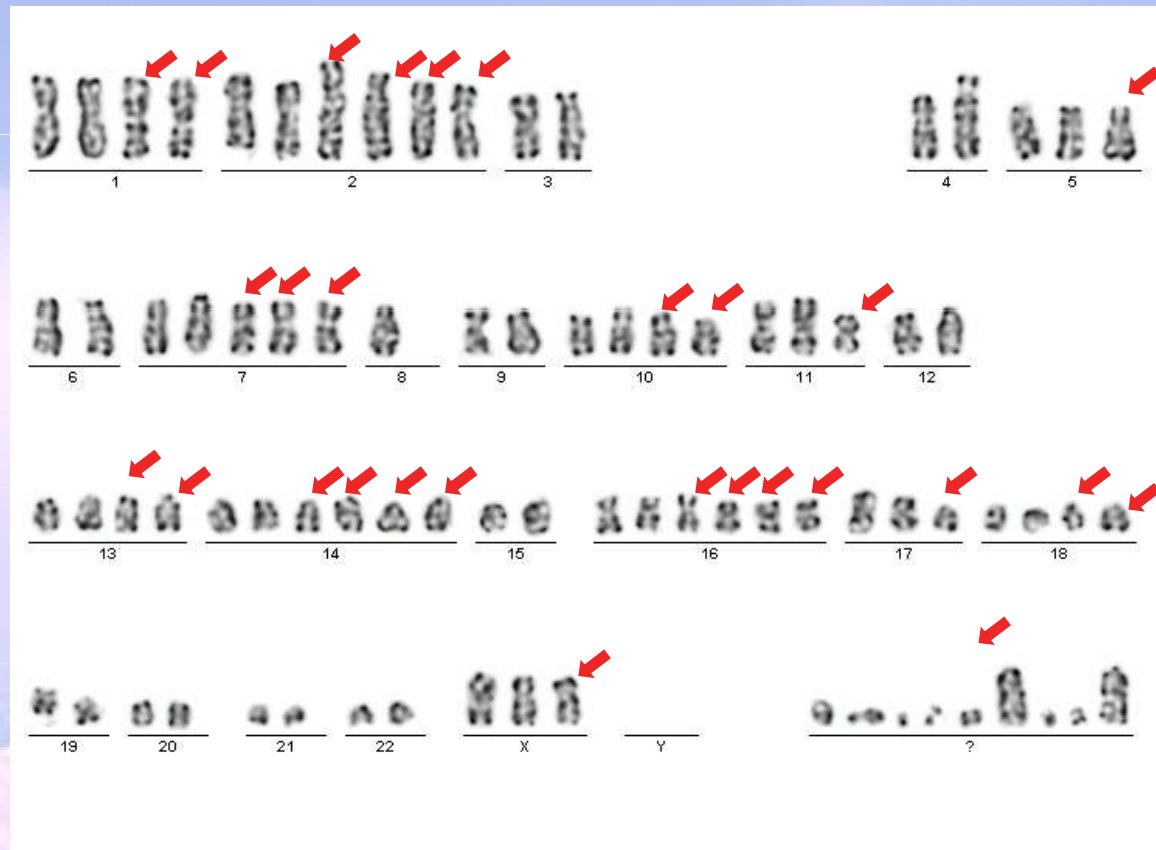


47,XX,+8

ONKOCYTOGENETIKA

typy chromosomových změn

- chromosomové změny – **početní**
 - chybění nebo nadbytek více chromosomů



ONKOCYTOGENETIKA

typy chromosomových změn

- chromosomové změny - **strukturní**

často typické změny pro určité typy nádorů (jiné body zlomů než u VCA)

- **translokace** - nejznámější translokace **t(9;22)** - **Ph chromosom** (Philadelphský chromosom) u **chronické myeloidní leukemie**

- **inverze**

- **delece**

- **amplifikace** - v buňce je přítomno mnoho kopií genu

(normální počet genů na 1 chromosomu je 1)

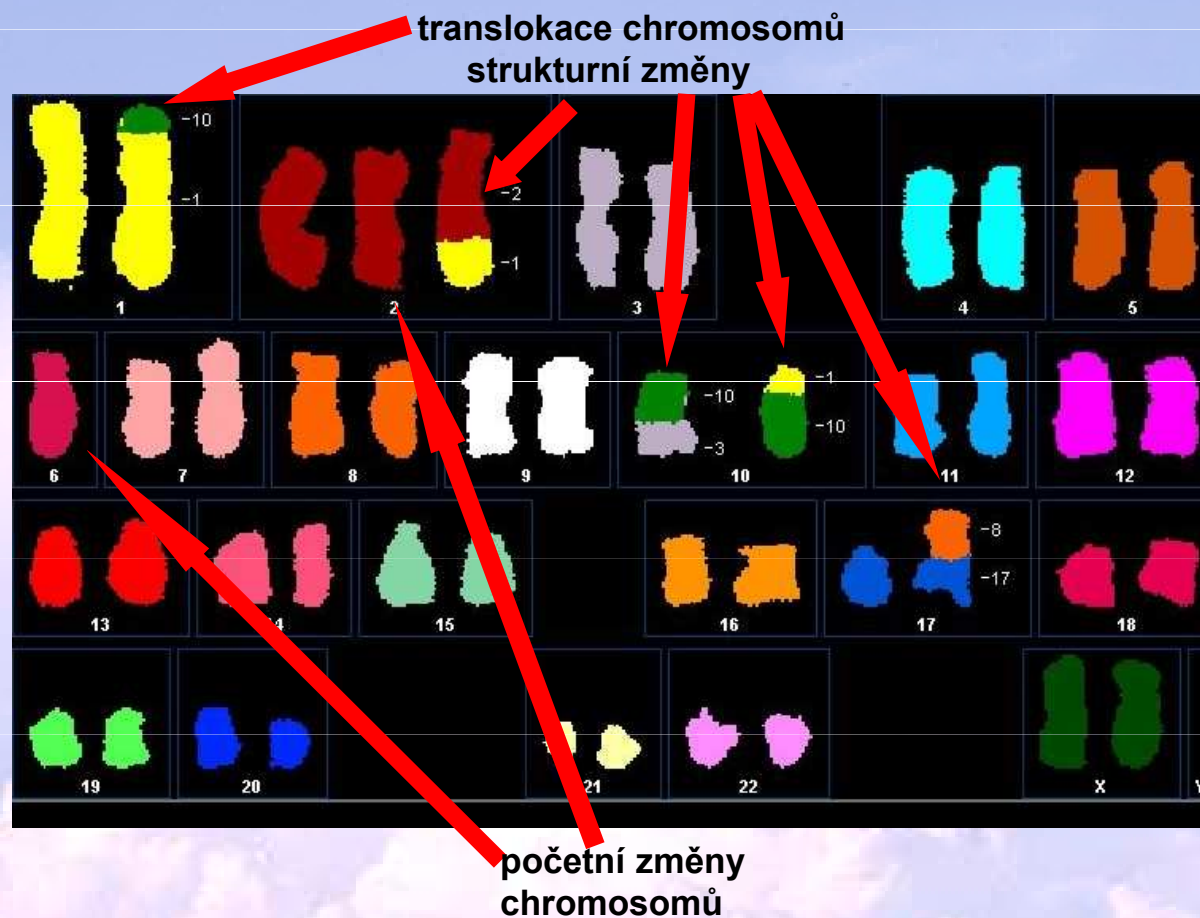
(tato změna se nevyskytuje u VCA, je typická pro onkologická onemocnění)



ONKOCYTOGENETIKA

typy chromosomových změn

- kombinace početních a strukturních chromosomových změn



VÝZNAM ONKOCYTOGENETICKÉHO VYŠETŘENÍ

- zpřesnění diagnózy
- stanovení prognózy onemocnění
- zjištění fáze onemocnění (remise, relaps)
- sledování úspěšnosti léčby (transplantace kostní dřeně při léčbě leukemií, chemoterapie)
- charakteristika dosud nepopsaných chromosomových abnormalit



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



TYPY NÁDORŮ VYŠETŘOVANÉ CYTOGENETICKY na OLG FN Brno

- HEMATOLOGICKÉ MALIGNITY (leukemie)
 - lymfoblastická leukemie – postihuje buňky lymfoidní vývojové řady
 - akutní (ALL) – nejčastější u dětí
 - chronická (CLL)
 - myeloidní leukemie – postihuje buňky myeloidní vývojové řady
 - akutní (AML) - t(15;17), t(8;21), inv(16)
 - chronická (CML)- **t(9;22) - Ph chromozom**
 - myelodysplastický syndrom (MDS) – dysplastické změny v hemopoetických řadách v kostní dřeni – del(5)
- SOLIDNÍ NÁDORY
 - všechny typy maligních nádorů u dětí – nádory CNS, Ewingův sarkom, Wilmsův tumor, osteosarkomy, lymfomy a další



Doporučená literatura

- Klinická genetika, Thompson 2001
- Základy klinické genetiky, Sršeň, Sršňová 1995
- Základy lékařské genetiky, Pritchard, Korf 2003



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



Děkuji za pozornost



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

