

Základy klinické cytogenetiky I

Mgr. Hanáková



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

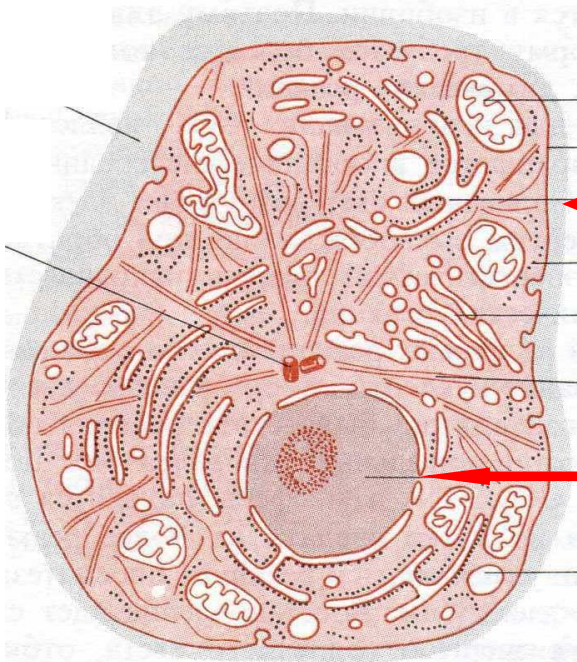


DEFINICE A HISTORIE

- **klinická cytogenetika** se zabývá analýzou **chromosomů** (jejich počtem a morfologií), jejich segregací v meióze a mitóze a vztahem mezi nálezy chromosomových aberací a fenotypovými projevy.
- **vznik moderní lidské cytogenetiky** se datuje od roku 1956, kdy Tjio a Levan vyvinuli efektivní metodiky analýzy chromosomů a stanovili, že normální počet lidských chromosomů je 46.



SCHEMA LIDSKÉ SOMATICKÉ BUŇKY

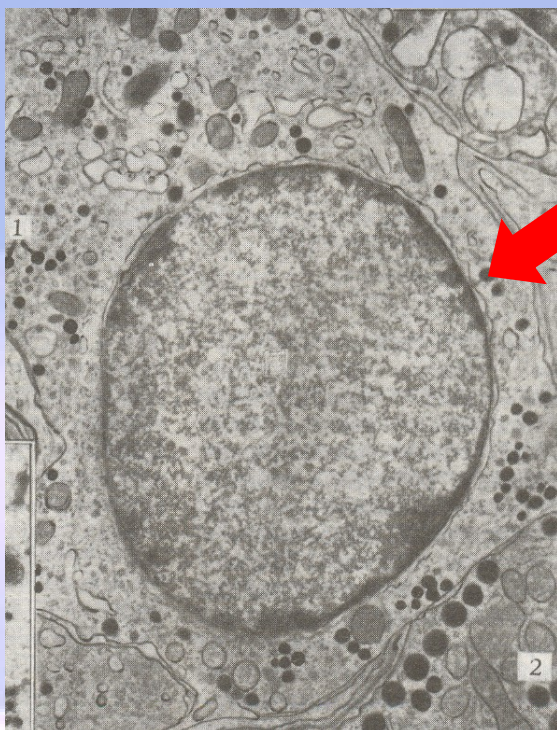


cytoplasma s organelami

buněčné jádro

DEFINICE KLINICKÉ CYTOGENETIKY

chromosomy vznikají při dělení jádra



DNA rozptýlená v buněčném jádře
(interfáze)

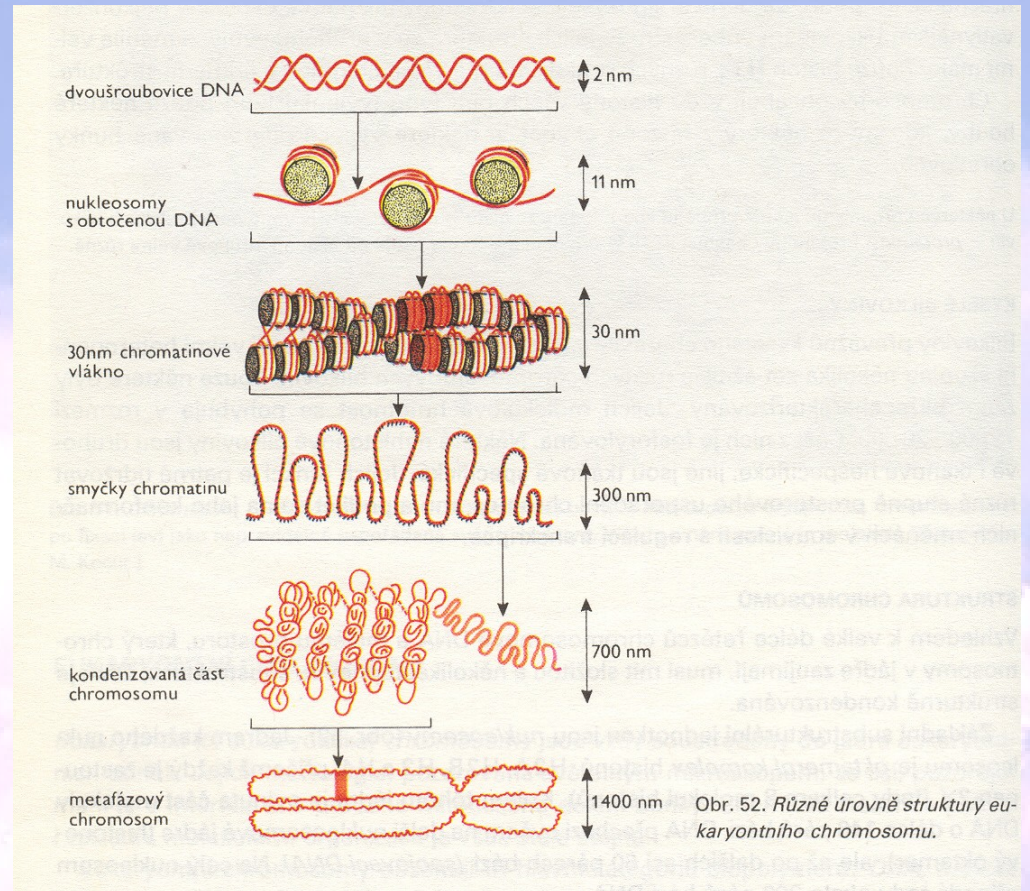


chromosomy = spiralizované molekuly DNA
počet chromosomů člověka = 46
(metafáze mitózy)

CHROMATIN A CHROMOSOMY BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU

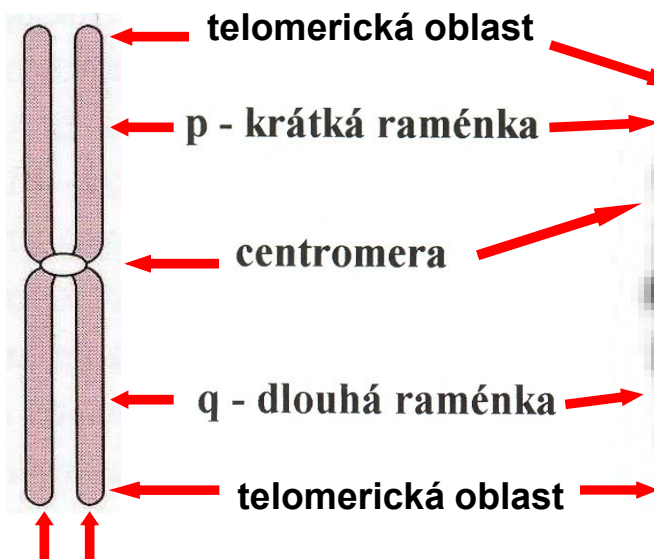
kondenzace chromatinu, vznik chromosomů

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



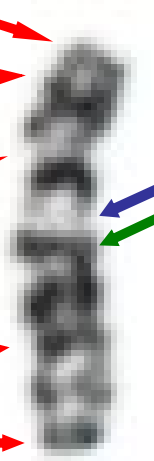
CHROMOSOMY V PRAXI

schema chromosomu

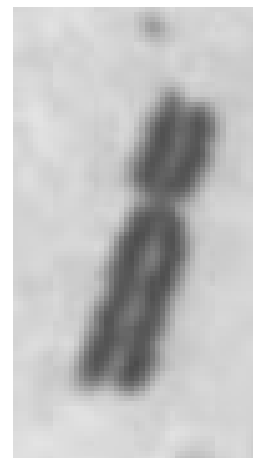


sesterské chromatidy
(identické kopie)

Chromosom s G- pruhy



Chromosom obarvený po celé délce



dvouchromatidový metafázní chromosom

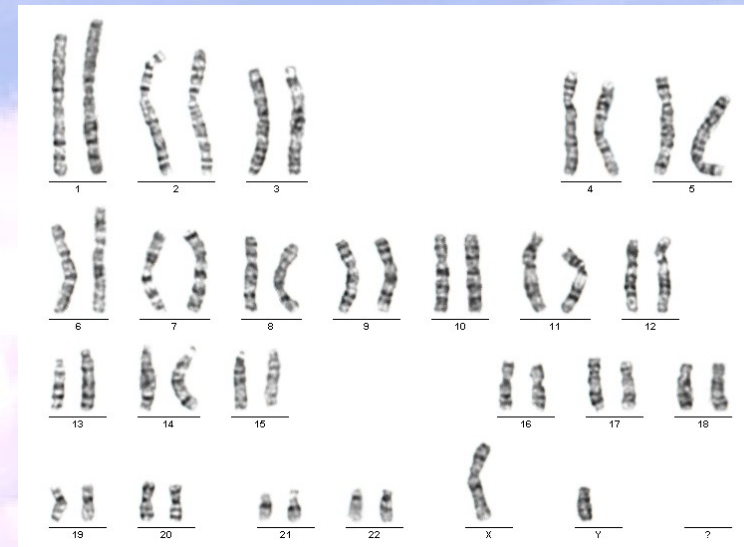
CHROMOSOM

- **centromera** = heterochromatinová oblast (konstitutivní heterochromatin), místo rozdělení krátkých a dlouhých ramének, místo spojení sesterských chromatid, místo tvorby kinetochorů v meióze a mitóze, (primární konstrikce, zaškrcení)
- **telomera** = specifická DNA sekvence na koncích každého chromosomu (každé chromatidy, dvoušroubovice DNA), která zajišťuje integritu chromosomu během buněčného dělení (repetitivní hexamer (TTAGGG)_n)

CHROMOSOMY V PRAXI

karyotyp

- **soubor chromosomů** jedince nebo buňky, označujeme **počet chromosomů, typ pohlavních chromosomů** a případné **aberrace** (zápis karyotypu např. 46,XY)
- 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 zděněn 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

typ pohlavních chromosomů

CHROMOSOMY V PRAXI

normální mužský karyotyp

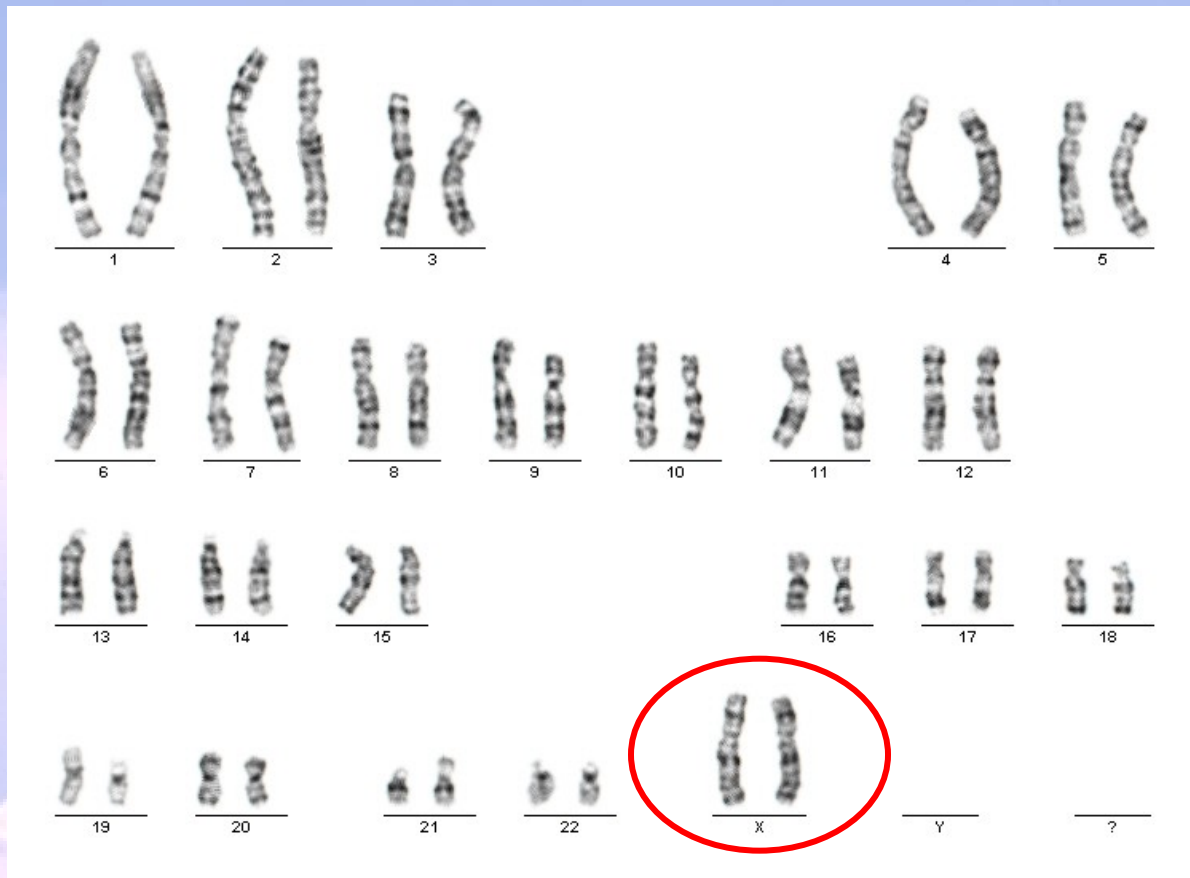
46,XY



CHROMOSOMY V PRAXI

normální ženský karyotyp

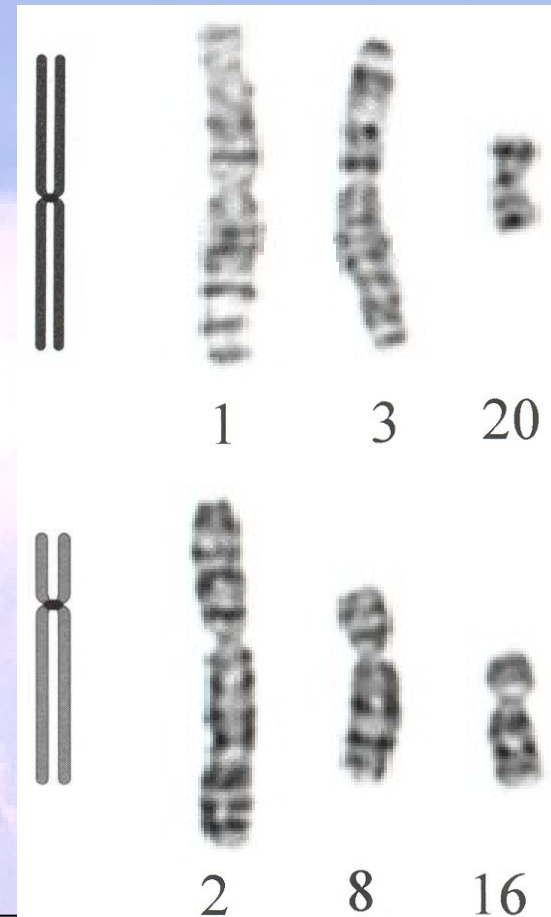
46,XX



CHROMOSOMY V PRAXI

třídění chromosomů podle umístění centromery

- **metacentrické chromosomy**
centromera téměř nebo úplně uprostřed, tedy krátká a dlouhá raménka jsou (téměř) stejně dlouhá
- **submetacentrické chromosomy**
centromera mimo střed chromosomu, p a q raménka jsou jasně délkově odlišena



CHROMOSOMY V PRAXI

třídění chromosomů podle umístění centromery

- **akrocentrické chromosomy**

centromera je umístěna velmi blízko jednomu konci;

od krátkých ramének jsou odškrceny satelity (malé výrazné části konstitutivního heterochromatinu);

místo odškrcení = sekundární konstriktce (tenké stopky);

(sekundární konstriktce obsahuje kopie genů kódujících rRNA = organizátor jádérka)



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

- odběr materiálu
 - kultivace – **získání dostatečného množství dělicích se buněk**
(s chromosomy)
 - zpracování suspenze
 - pruhování / barvení chromosomů
- metody 1. volby v indikovaných případech
- relativně levné metody (ve srovnání s metodami molekulární cytogenetiky)



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

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)



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

odběr materiálu



periferní krev



solidní nádor



kostní dřeň

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

odběr materiálu



kůže (potracený plod,
placenta)



choriové klky



odběr plodové vody pod kontrolou
ultrazvuku

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY nasazení do kultivačního média

Sterilní práce v laminárním boxu

!!!!!!STERILNÍ PROSTŘEDÍ!!!!!!



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

kultivace materiálu

- **délka kultivace**

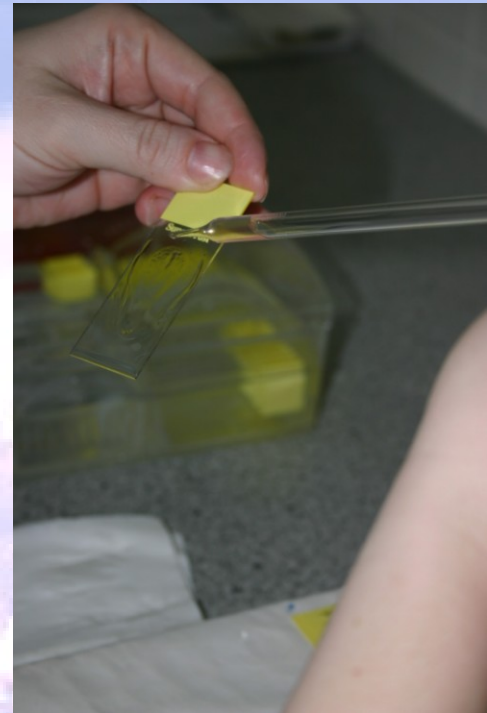
- **periferní krev – 72 hodin (stanovení karyotypu)**
 - **48 hodin (stanovení ZCA)**
kratší doba kultivace - podmínkou je zachytit 1. buněčné dělení, později dochází k reparaci chromosomů nebo k zániku buněk s aberací
- krev plodu 72 hodin (stanovení karyotypu)
- **plodová voda – průměrně 10 dní (stanovení karyotypu)**
- choriové klky – přes noc (stanovení karyotypu)
- **kostní dřev – přímé zpracování** buněk
ihned po odběru
 - **24 hodin** (48 hodin spec. případy)
(stanovení karyotypu maligních klonů v KD)
- kůže – variabilní doba růstu (průměrně 2 týdny)
- solidní tumory – minimálně 3 týdny
(stanovení karyotypu maligních klonů v tumoru)



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

zpracování suspenze

- vykapání suspenze na mokrá podložní sklíčka



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

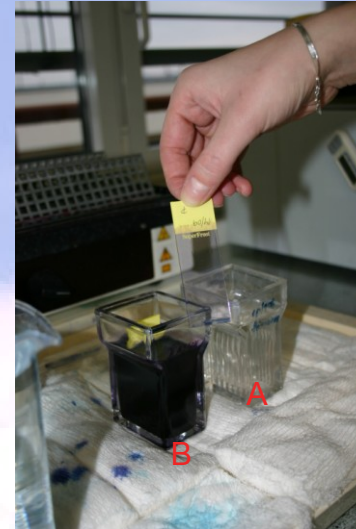
pruhování chromosomů

• pruhování chromosomů

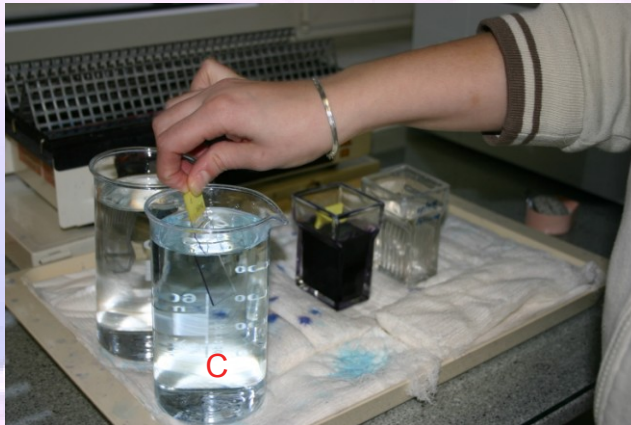
1 – inkubace
preparátu
v roztoku
trypsinu
(dochází
k **natrávení**
chromosomových
proteinů)



2 – oplach
preparátu
v Sørensenově
fosfátovém
pufru (A),
barvení
barvívem
Giemsa-
Romanowski (B)



3 – oplach
ve vodě (C)



4 – sušení
sklíček
na sušící
plotýnce



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení

zvětšení přibližně 1000x



mitóza – proces dělení jádra

mitóza – soubor chromosomů jednoho jádra na podložním sklíčku

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

pruhování chromosomů

G – pruhování chromosomu č. 1 – vzor a reálné chromosomy



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

pruhování chromosomů

číslování pruhů na chromosomech

pruhy na každém raménku jsou očíslovány
vzestupně od centromery k telomeře

s postupnou kondenzací chromosomu
se zmenšuje počet pruhů

číslo pruhu umožňuje jednoznačnou identifikaci
každého pruhu



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

význam pruhování chromosomů

- rozeznáme chromosomy podobné morfologie (specifické pruhy každý chromosom)
- lze zkontrolovat genetický materiál chromosomu po celé délce
- zápis strukturních přestaveb – v zápisu strukturní přestavby jsou uvedena čísla pruhů na ramenech chromosomů, které vstoupily do přestavby, ve kterých došlo ke zlomu.



**definován
rozsah
a lokalizace
abnormality**

46,XX,t(1;15)(q12;q22)

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení

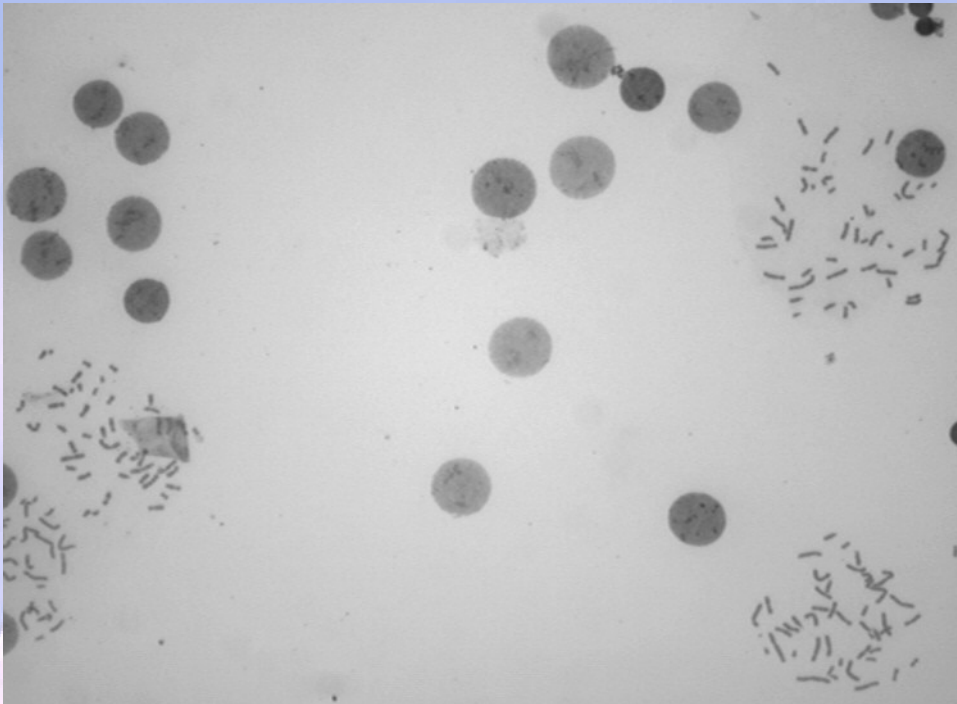
chromosomy hodnotíme ve **světelném mikroskopu** při zvětšení přibližně 1000x za použití imerzních objektivů



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení

zvětšení 100 - 200x
vyhledávání mitóz



zvětšení přibližně 1000x
hodnocení

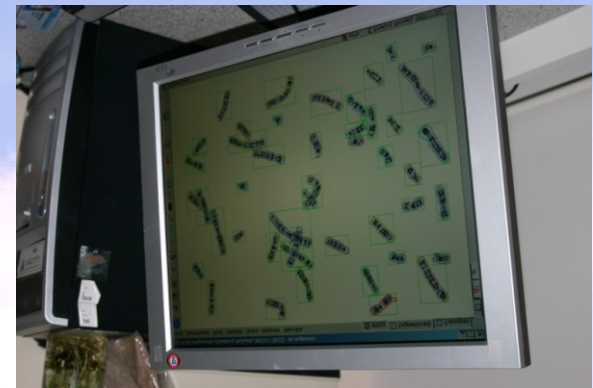


METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení

ke třídění chromosomů a sestavení karyotypu lze využít počítačového programu Lucia

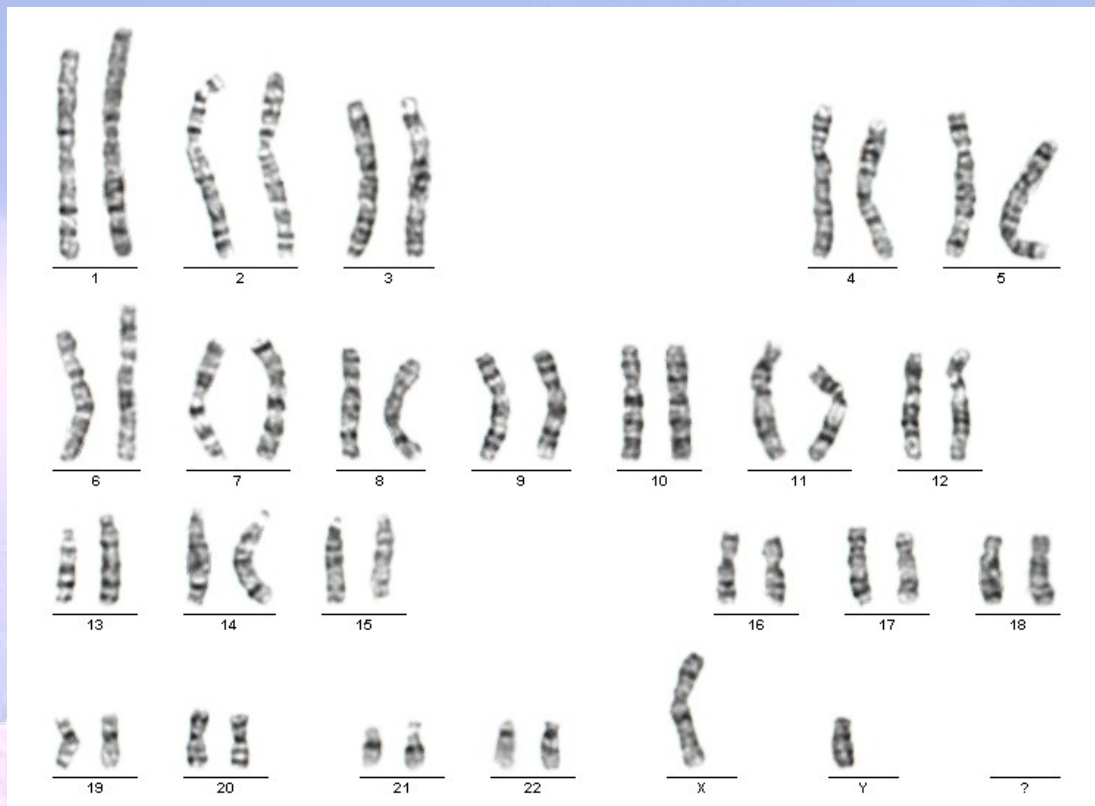
světelný mikroskop
s CCD kamerou
napojený na počítač



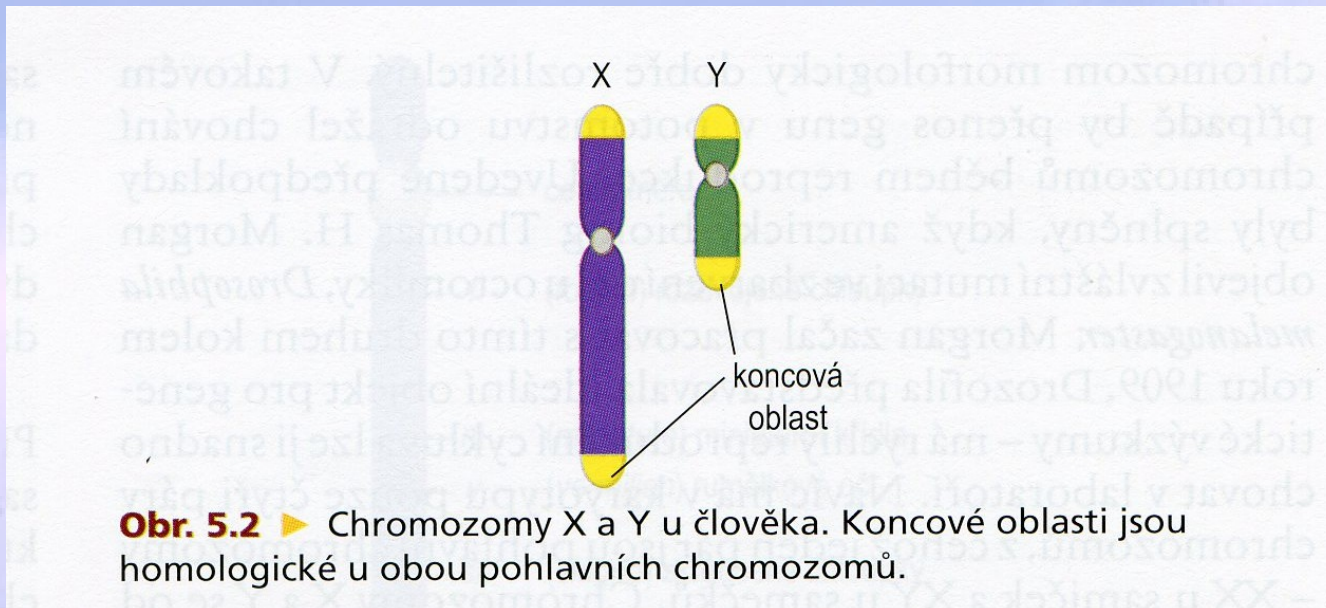
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení

karyotyp setříděný a upravený pomocí počítačového programu Lucia



GONOSOMY – CHROMOSOMY X, Y



GONOSOMY – CHROMOSOMY X, Y

ODLIŠNOSTI MEZI X A Y CHROMOSOMEM:

- odlišná morfologie (Y menší než X, u chromosomu Y centromera blíže ke konci krátkých ramének než u X)
- chromosomy X a Y obsahují jen malé množství homologního genetického materiálu (**PSEUDOAUTOSOMÁLNÍ OBLASTI** + některé geny mimo pseudoautosomální oblasti)

ODLIŠNOST MEZI CHROMOSOMY X A Y A AUTOSOMY:

- u autosomů dochází v profázi meiózy I k párování **homologních chromosomů po celé jejich délce** a k výměně genetického materiálu mezi **nesesterskými** chromatidami homologních chromosomů (rekombinace genetického materiálu (crossing over))
význam – zvýšení genetické variability
- u chromosomů X a Y dochází k párování pouze v **pseudoautosomálních (homologních) oblastech** (na koncích krátkých a dlouhých ramének)

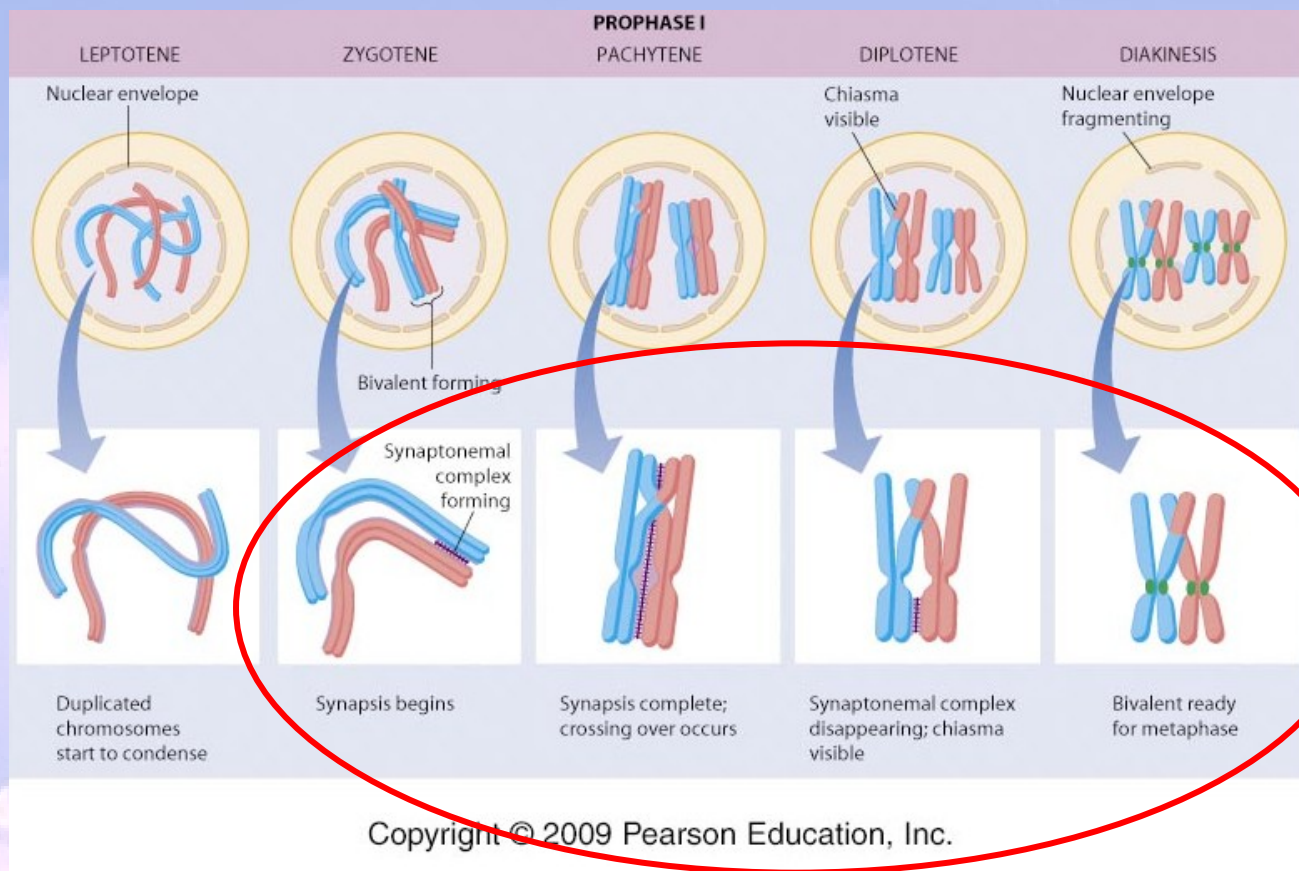


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



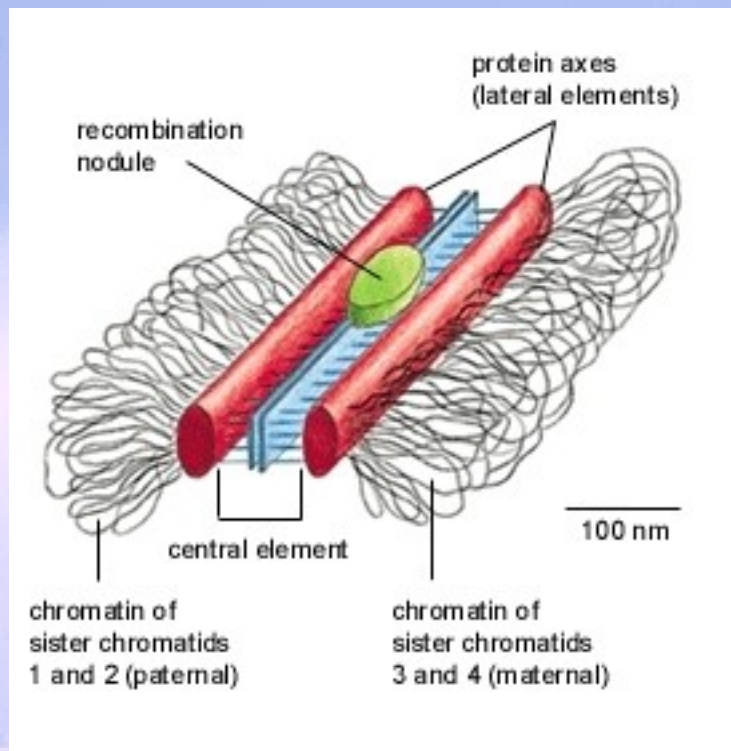
AUTOSOMY – crossing over

(párování po celé délce chromosom v profázi meiózy I
- proces vzniku spermií)



AUTOSOMY – crossing over

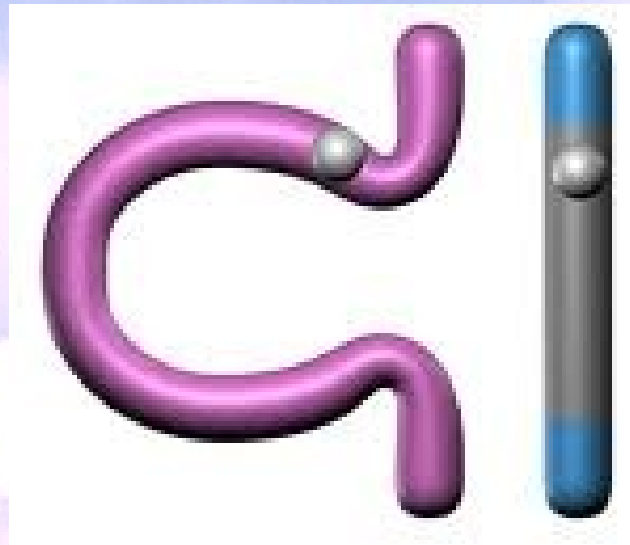
(párování po celé délce chromosomů v profázi meiózy I
- párování homologních úseků)



CHROMOSOMY X, Y – crossing over

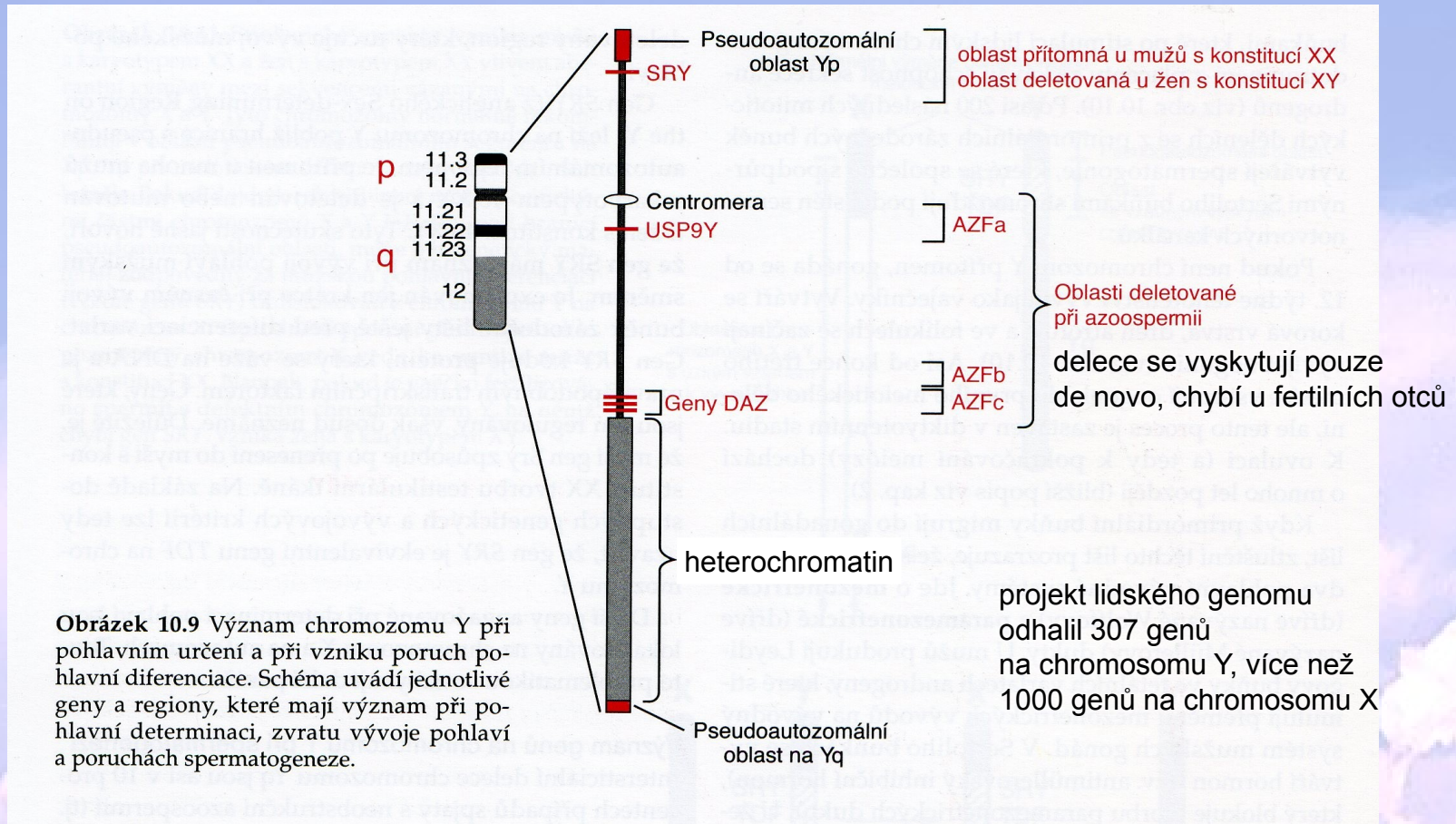
(párování pouze v pseudoautosomálních oblastech
v profázi meiózy I u mužů – párování homologních
úseků)

k párování v meióze I dochází pouze v pseudoautosomálních oblastech
na koncích krátkých a dlouhých ramen chromosomů X a Y



dědičnost genů v pseudoautosomálních oblastech připomíná dědičnost autosomálních genů –
pseudoautosomální dědičnost

CHROMOSOM Y

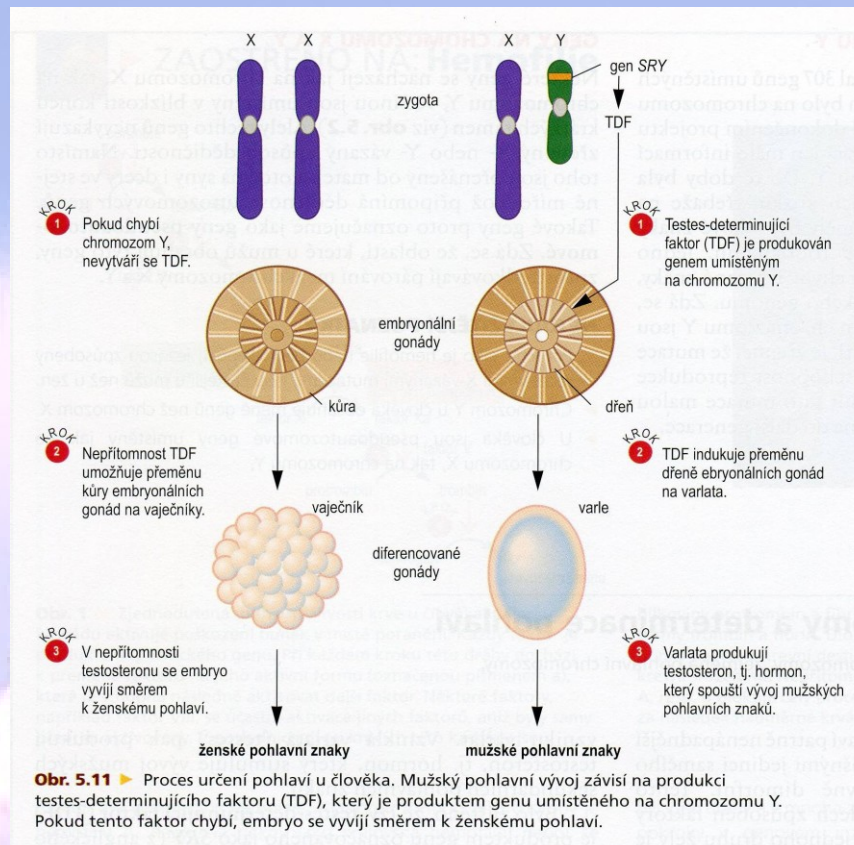


Obrázek 10.9 Význam chromozomu Y při pohlavním určení a při vzniku poruch pohlavní diference. Schéma uvádí jednotlivé geny a regiony, které mají význam při pohlavní determinaci, zvratu vývoje pohlaví a poruchách spermatogeneze.

gen SRY – „sex determining region Y“ – produktem je testes determinující faktor (TDF)

CHROMOSOM Y

pohlaví u člověka je určeno přítomností či absencí chromosomu Y, chromosom řídí vývoj primordiálních gonád směrem ke vzniku testes

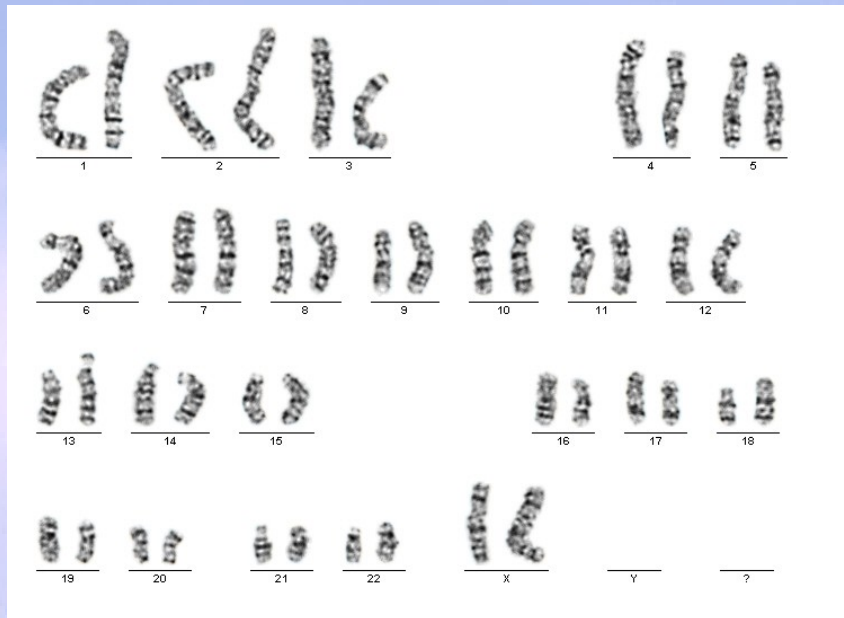


Nesoulad mezi typem pohlavních chromosomů v karyotypu a pohlavím pacienta

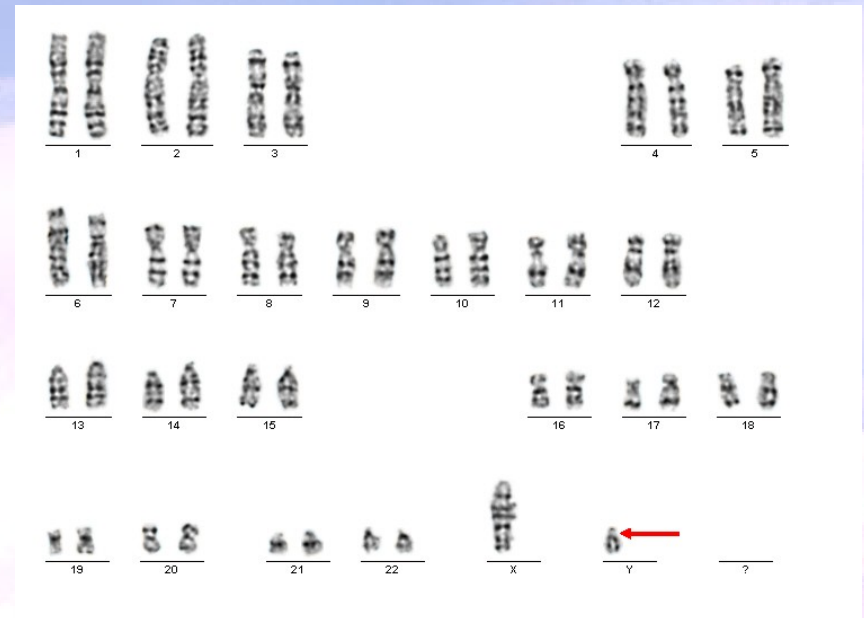
46,XYfemale

46,XXmale

Nesoulad mezi typem pohlavních chromosomů v karyotypu a pohlavím pacienta



46,XXmale



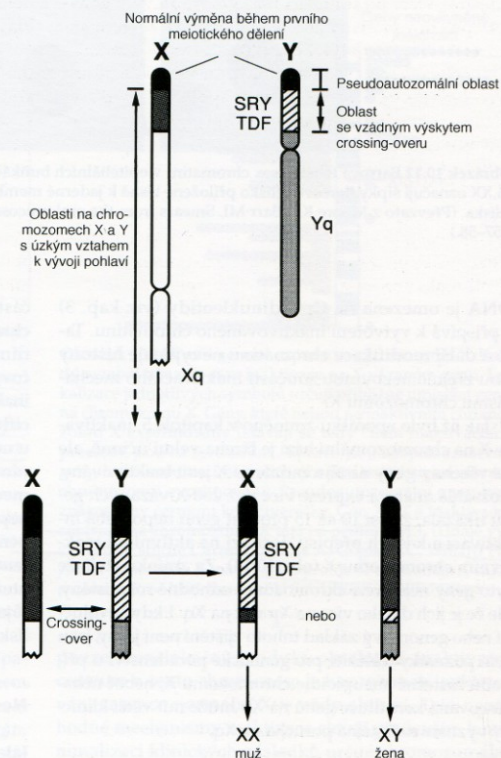
46,XYfemale

46,XY female; 46,XX male vznik fenotypů může mít spojitost

vznik v důsledku **abnormální rekombinace** mezi Xp a Yp v zárodečných buňkách otce, dochází k **přenosu genu SRY na chromosom X / ztráta genu SRY na chromosomu Y**

(gen SRY je lokalizován v blízkosti pseudoautosomální oblasti na Yp, obvykle do rekombinace zahrnován nebývá, normální rekombinace se týká pouze pseudoautosomálních oblastí)

Obrázek 10.11 Etiologické aspekty vzniku mužů s karyotypem XX a žen s karyotypem XY vlivem abnormální výměny mezi sekvencemi vázanými na chromozomy X a Y. Tyto chromozomy normálně rekombinují v oblasti pseudoautosomálního segmentu na Xp/Yp při meiotickém dělení mužských pohlavních buněk. Pokud dojde k rekombinaci mezi specifickými částmi chromozomů X a Y ležícími pod hranicí pseudoautosomální oblasti, může být genetický materiál zodpovědný za mužskou pohlavní diferenciaci (včetně genu SRY) translokován z chromozomu Y na chromozom X. Oplodnění spermií obsahující takto pozměněný chromozom X vede ke vzniku muže s konstitucí XX. Naopak, pokud je vajíčko fertilizováno spermií s defektním chromozomem Y, na němž chybí gen SRY, vzniká žena s karyotypem XY.

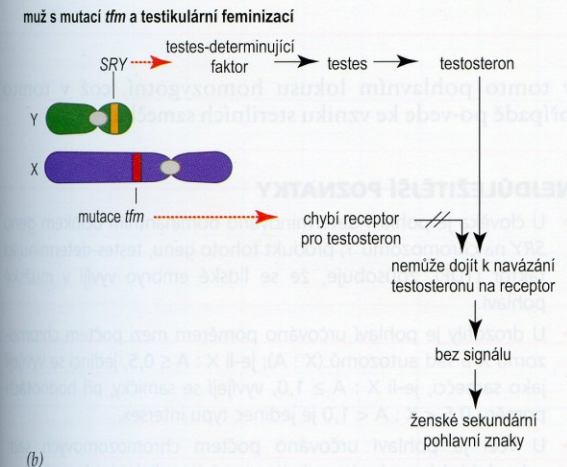
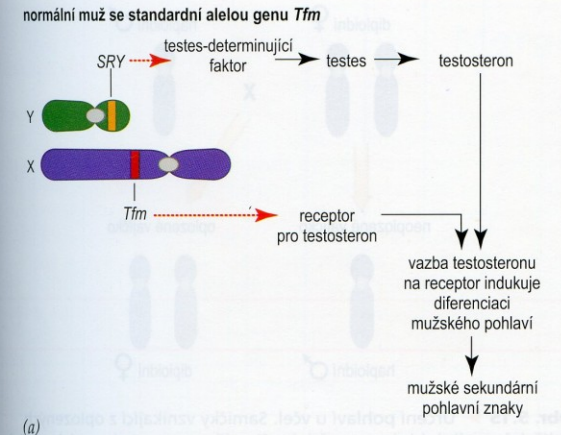


46,XYfemale – další možnosti vzniku

- mutovaný SRY gen (ztráta funkce, abnormální funkce)
- mutace jiných genů na jiných chromosomech nebo chromosomové změny
 - delece či mutace v genu Tfm na chromosomu X – syndrom testikulární feminizace (viz obrázek)
 - duplikace části Xp v oblasti Xp21 s lokalizací genu DAX1 – transkripční faktor, hraje roli při určení pohlaví, působení je závislé na genové dávce (nadbytek SRY produktu – tvorba varlat, nadbytek produktu DAX1 – tvorba vaječníků)
 - mutace na autosomech
 - chromosom 17q gen SOX9, gen nezbytný pro tvorbu varlat
 - chromosom 9 pruh p24, gen DMRT1 delece – oblast nezbytná pro normální vývoj mužského pohlaví
 - chromosom 11 pruh p13 gen WT1 – dominantní mutace vede k výrazné poruše vývoje testikulární tkáně (ženský nebo obojetný genitál)
 - a další (pseudohermafroditismus...)

46,XY female – další možnosti vzniku

delece či mutace genu *Tfm* na chromosomu X – kóduje receptory pro testosteron – **rezistence cílových orgánů k androgenům** (SRY gen přítomen a je funkční) – **syndrom testikulární feminizace (androgen insensitivity syndrome)** – ženský fenotyp, přítomny testes v malé pánvi, predispozice k malignímu zvrhnutí



Obr. 5.13 ▶ Testikulární feminizace, odchylka způsobená X-vázanou mutací *tfm*, která zabraňuje produkci testosteronových receptorů. (a) Normální muž. (b) Feminizovaný muž s mutací *tfm*.

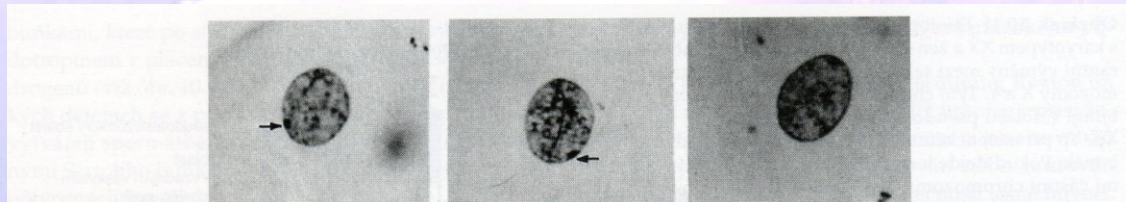
CHROMOSOM X

- normální ženský karyotyp – 2 chromosomy X
- normální mužský karyotyp – 1 chromosom X

autosomy – každý gen přítomen ve 2 kopiích, odchylky mohou vést k abnormálnímu fenotypu, v některých případech ke smrti jedince

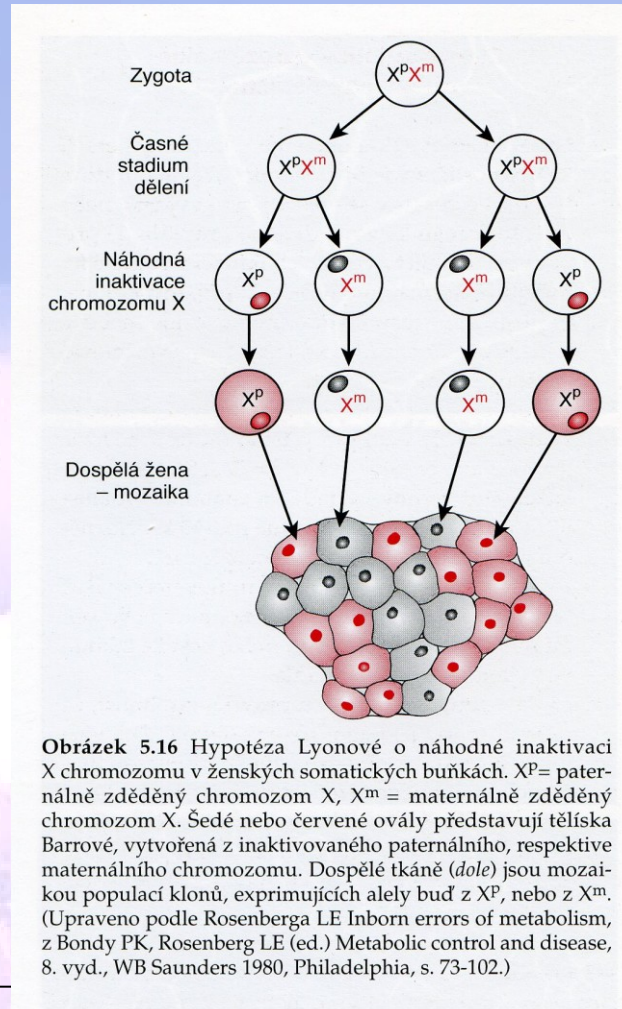
kompence rozdílu v počtu kopií X vázaných genů (**dávky genových produktů**)
u žen – **náhodná inaktivace jednoho X chromosomu (lyonizace)**
(Mary Lyonová 1961)

- jeden chromosom X se stává transkripčně inaktivním, v interfázních jádrech je viditelný v podobě Barrova tělíska (heterochromatin, sex chromatin) (Murray Barr)



Obrázek 10.12 Barrova tělíska (sex chromatin) v epiteliálních buňkách lidské ústní sliznice. U ženských buněk s karyotypem 46,XX označují šípky Barrovo tělísko přiložené těsně k jaderné membráně. Mužská buňka (vpravo) neobsahuje žádné Barrova tělíska. (Převzato z Moore KL, Barr ML Smears from the oral mucosa in the determination of chromosomal sex. Lancet 1955; 2:57-58.)

CHROMOSOM X

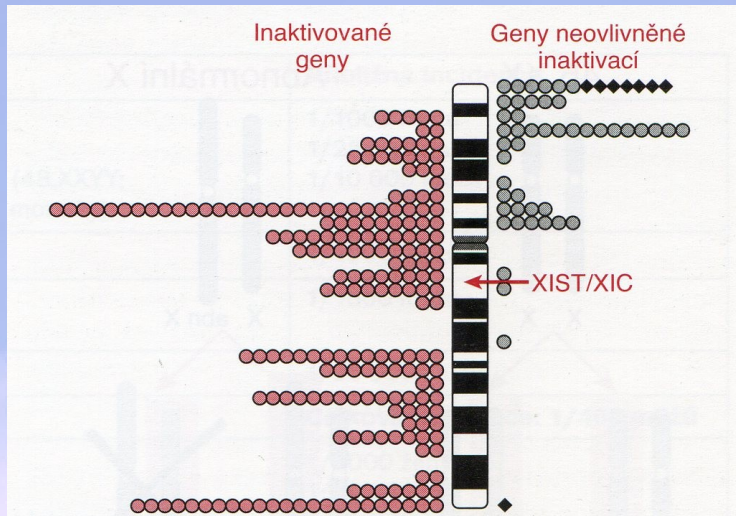


CHROMOSOM X

- k inaktivaci jednoho X chromosomu dochází v časném stádiu vývoje embrya
- inaktivace chromosomu maternálního či paternálního původu je náhodná (tkáně – mozaika populací klonů, které exprimují alely genů buď z paternálního nebo maternálního chromosomu X)
- jakmile k inaktivaci dojde, jedná se o jev trvalý (v somatických buňkách) a všechny buňky, které vzniknou dělením buňky mateřské, mají inaktivovaný stejný chromosom X
- v zárodečné linii je inaktivovaný X chromosom reaktivován (pravděpodobně důležité pro úspěšné dokončení oogeneze)
- u karyotypů s početními aberacemi – nadbytečnými chromosomy X – jsou vždy všechny X chromosomy, kromě jednoho, inaktivovány, každý X chromosom může tvořit samostatné Baarovo tělísko nebo mohou vytvářet jen 1



CHROMOSOM X



Obrázek 10.14 Profil genové exprese na chromozomu X. Každý symbol ukazuje stav inaktivace na X-vázaném genu. Lokalizace jednotlivých symbolů určují přibližné umístění genu na chromozomu X. Geny, které nejsou na inaktivním chromozomu X exprimovány (stávají se tedy cílem inaktivačních procesů), jsou na levé straně. Vpravo jsou naopak označeny geny, které inaktivaci nepodléhají a jsou tedy i na inaktivním chromozomu exprimovány. Pseudoautozomální geny jsou znázorněny černými kosočtverečky. Gen *XIST* a inaktivační centrum na chromozomu X leží na pruhu Xq13. (Údaje vycházejí ze studie Carrel L, Cottle A, Goglin KC, Willard HF A first-generation X inactivation profile of the human X chromosome. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:14440–14444.)

na inaktivovaném X chromosomu je inaktivována většina **genů**, ale **některé zůstávají aktivní** (10 – 15% genů), k jejich přepisu dochází na inaktivovaném i neinaktivovaném chromosomu, více je jich lokalizováno na **Xp**

význam – kompenzace genové dávky (geny, které mají kopii na chromosomu Y (v pseudoautosomálních oblastech i mimo ně), které jsou u žen exprimovány ve vyšší míře než u mužů)

- **klinický význam – vysvětlení fenotypu Turnerova syndromu (a dalších abnormalit vedoucích k podobnému fenotypu – delece Xp) – nesprávná dávka genů**

X inaktivační centrum (**XIC**) – oblast, která zahrnuje **gen XIST** (lokalizace Xq13) – klíčový regulační lokus X inaktivace

CHROMOSOM X

náhodná inaktivace chromosomu X

nenáhodná inaktivace chromosomu X – speciální případy

- nebalancovaná strukturní aberace chromosomu X (delece, duplikace, izochromosomy) – **preferenční inaktivace strukturně abnormálního chromosomu**
- balancovaná translokace chromosomu X s autosome – **normální X chromosom je preferenčně inaktivován** (při inaktivaci X s translokací by došlo k inaktivaci autosomálního úseku a k projevu abnormálního fenotypu jako u nebalancovaného karyotypu)
- **nebalancovaný karyotyp** (část chromosomu X zahrnující oblast XIC, na němž je translokována část autosomu) – potomci přenašeče balancované translokace X chromosomu s autosome – **postižený chromosom vždy inaktivován**

klinický význam – minimalizace následků chromosomové poruchy



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



CHROMOSOM X

Možné negativní klinické důsledky preferenční inaktivace normálního X chromosomu u přenašečů balancované translokace

- v **místě zlomu** u translokace chromosomu X s autosomem dojde k **přerušení genu a jeho inaktivaci** – v důsledku inaktivace normálního X chromosomu se ve fenotypu pacienta projeví **ztráta funkce genu**

exprese X vázaných znaků u žen, které se obvykle projevují jen u mužů



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

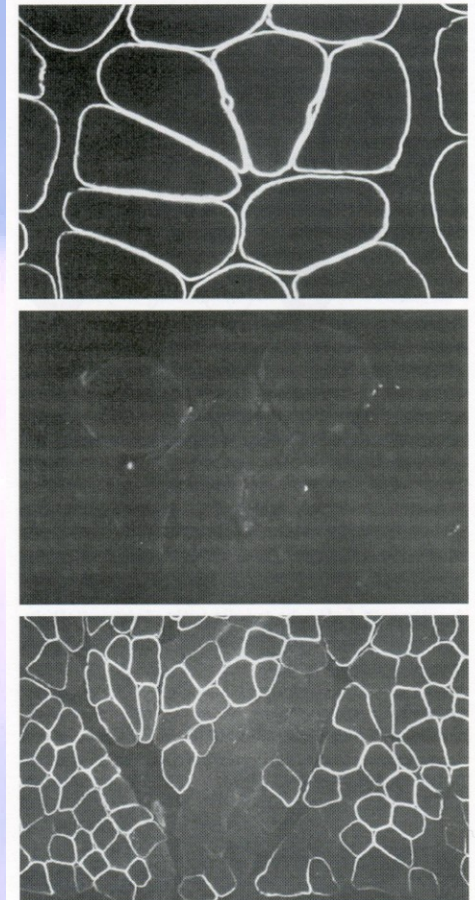


CHROMOSOM X

důsledek inaktivace X chromosomu – variabilita exprese X vázaných genů u žen heterozygotek (přenašeček genu pro X vázané onemocnění)

Funkční mozaicismus v důsledku inaktivace X chromosomu, který nese mutantní alelu genu nebo který nese zdravou alelu (v různých tkáních různý poměr); je možná i extrémní (asymetrická) inaktivace (od normálního stavu (asymptomatické heterozygotky) po úplnou manifestaci onemocnění (manifestující heterozygotky).

rozdíl mezi autosomální a X – vázanou dědičností – u mužů je alela na chromosomu X vždy exprimována (může být mutantní) (1 chromosom X), u žen může být exprimována jen v určitém %



Obrázek 5.17 Imunologické barvení na dystrofin v svalových vzorcích.

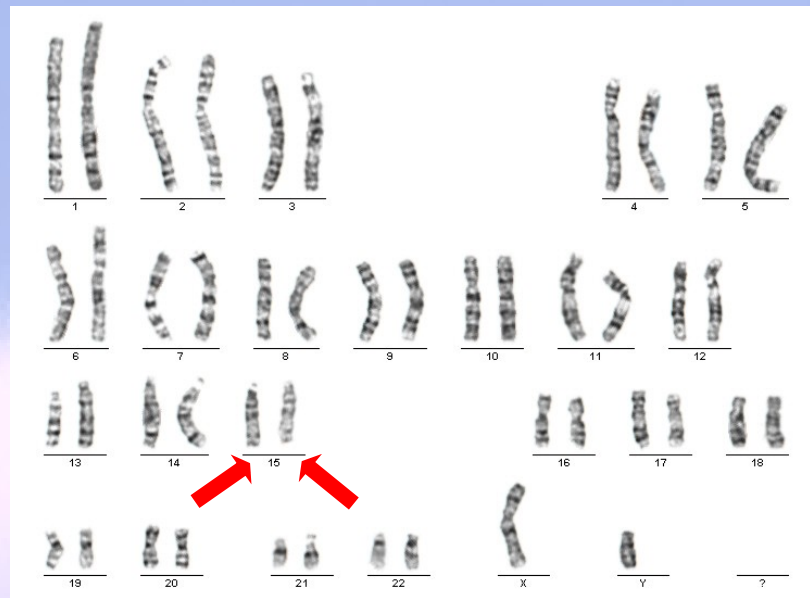
Nahoře – normální žena (zvětšení 480x)

Uprostřed – muž s DMD (zvětšení 480x)

Dole – přenašečka (zvětšení 240x)

Sval pacientů s DMD se nebarví na dystrofin. Sval přenašečky má pozitivní i negativní místa dystrofinového imunobarvení, což odráží X inaktivaci. (Fotografie použita s laskavým svolením K Arahata, National Institute of Neuroscience, Tokyo.)

CHROMOSOMY V PÁRU (HOMOLOGNÍ CHROMOSOMY)



- jeden chromosom pochází od jednoho, druhý od druhého rodiče
- abnormalita s klinickými důsledky (postižení jedince) – **chromosomy v páru jsou zděděny od 1 rodiče (uniparentální disomie)** – abnormalitu nelze prokázat vyšetřením karyotypu, ale molekulárně genetickými metodami

UNIPARENTÁLNÍ DISOMIE (UPD) klinický význam

chromosomy v páru zděděny od stejného rodiče genomový imprinting

- existují **rozdíly v genové expresi** mezi alelami, které se nacházejí na chromosomech, zděděných od otce a od matky – jsou důsledkem genomového imprintingu (**metylace** chromatinu, různý metylační vzor na chromosomu mateřského a otcovského původu, **dochází k ovlivnění exprese genů**, nedochází ke změně sekvence DNA) – genová exprese párových chromosomů se vzájemně doplňuje, společně se podílejí na vzniku normálního fenotypu jedince
- párové chromosomy pocházejí od stejného rodiče – mají **stejný metylační vzor** – **abnormální fenotyp** (např. syndrom Prader Willi / Angelman, chromosom 15 – uniparentální disomie simuluje mikrodeleční syndrom, geny se neexprimují buď v důsledku chybění oblasti (delece) nebo zametylování (inaktivace) stejné oblasti na obou párových chromosomech – **chybí funkční (nezametylovaná) alela od druhého rodiče**)
- imprinting je reverzibilní – **v germinální linii** v procesu vzniku gamet dochází ke změně imprintingu – **podle pohlaví rodiče**

mechanismy vzniku – „**trisomy rescue**“ (ztráta nadbytečného chromosomu v buňkách embrya), „**monosomy rescue**“ (duplikace přítomného chromosomu)

nemendelovská dědičnost



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



UNIPARENTÁLNÍ DISOMIE (UPD) klinický význam

Klinické důsledky UDP:

- homozygotita autosomálně recesivních genů s mutací
- přenos X – vázaných genů s mutací z otce na syna
- homozygotita X vázaných genů s mutací u žen
- klinické projevy související s abnormálním imprintingem

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

