

Základy klinické cytogenetiky – chromosomy

Mgr. Hanáková



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



SHRNUTÍ PŘEDNÁŠKY

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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



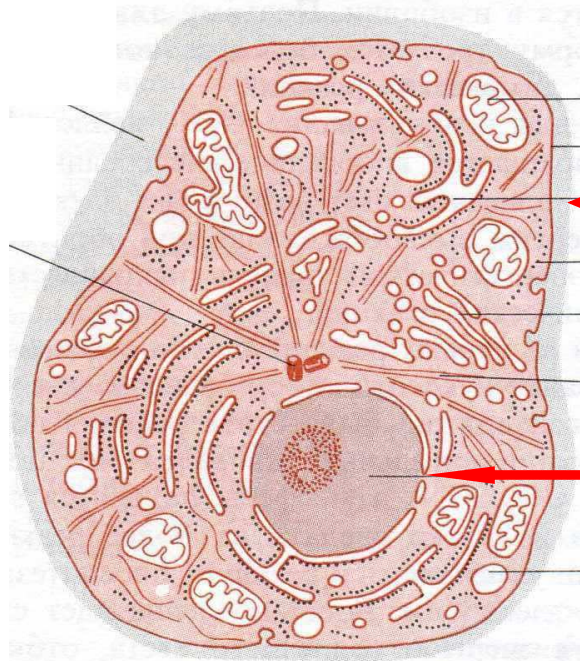
CHROMOSOMY, KARYOTYP



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



SCHEMA LIDSKÉ BUŇKY



cytoplasma s organelami

buněčné jádro
(DNA + proteiny, RNA)

V buněčném jádře se nacházejí molekuly DNA. V interfázi buněčného cyklu jsou molekuly rozvolněné, během mitózy dochází k jejich postupné spiralizaci za vzniku chromosomů.

DEFINICE KLINICKÉ CYTOGENETIKY

- **klinická cytogenetika**
zabývá se **analýzou chromosomů**
 - počtem
 - morfologií
 - vztahem mezi nálezy chromosomových změn a fenotypovými projevy



DNA rozptýlená v buněčném jádře
v **interfázi** buněčného cyklu

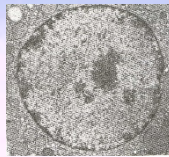


chromosomy = spiralizované molekuly DNA
během procesu buněčného dělení - **mitózy**

JADERNÝ MATERIÁL

pojmy **chromatin** a **chromosomy** - týkají se téhož jaderného materiálu

- **chromatin** – komplex DNA s chromosomovými proteiny
 - pojem lze použít pro jaderný materiál v interfázi
 - i spiralizované chromosomy jsou tvořeny chromatinem



jádro v interfázi



mitóza

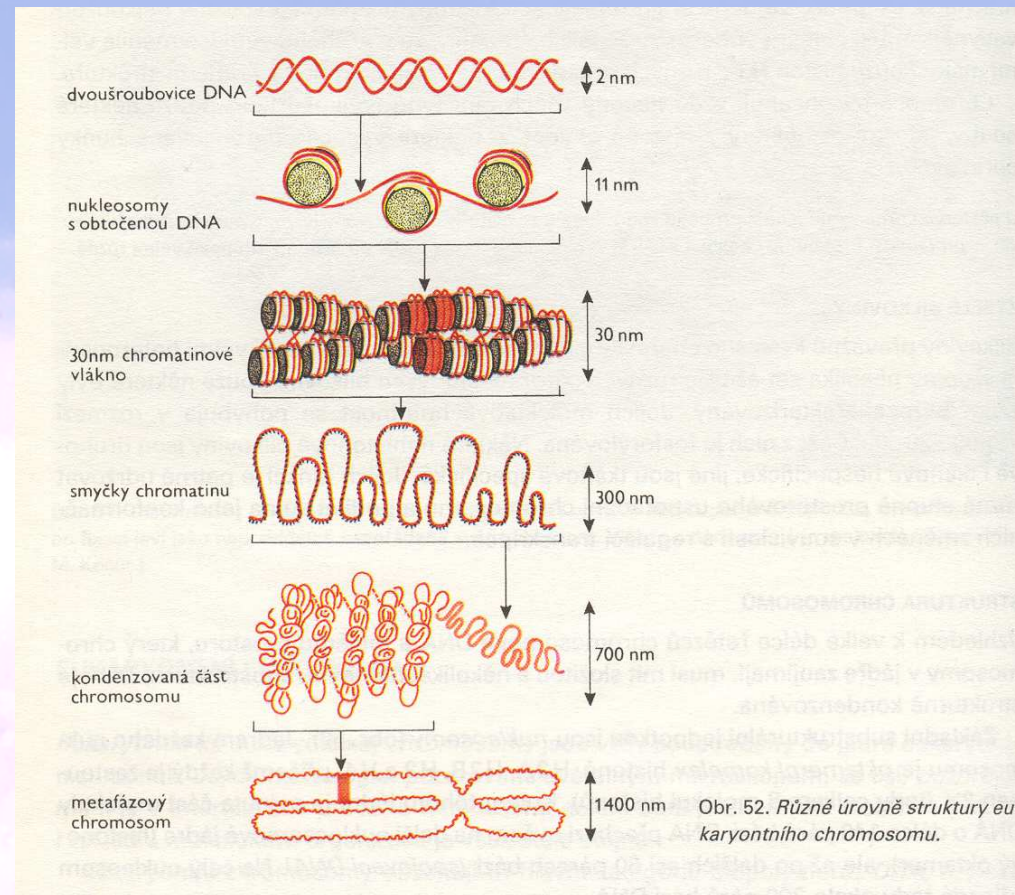
- **chromosom** – chromatin spiralizovaný **v mitóze**
(mitóza - proces dělení buňky, při kterém dochází k rozdělení genetického materiálu mezi 2 dceřinné buňky)



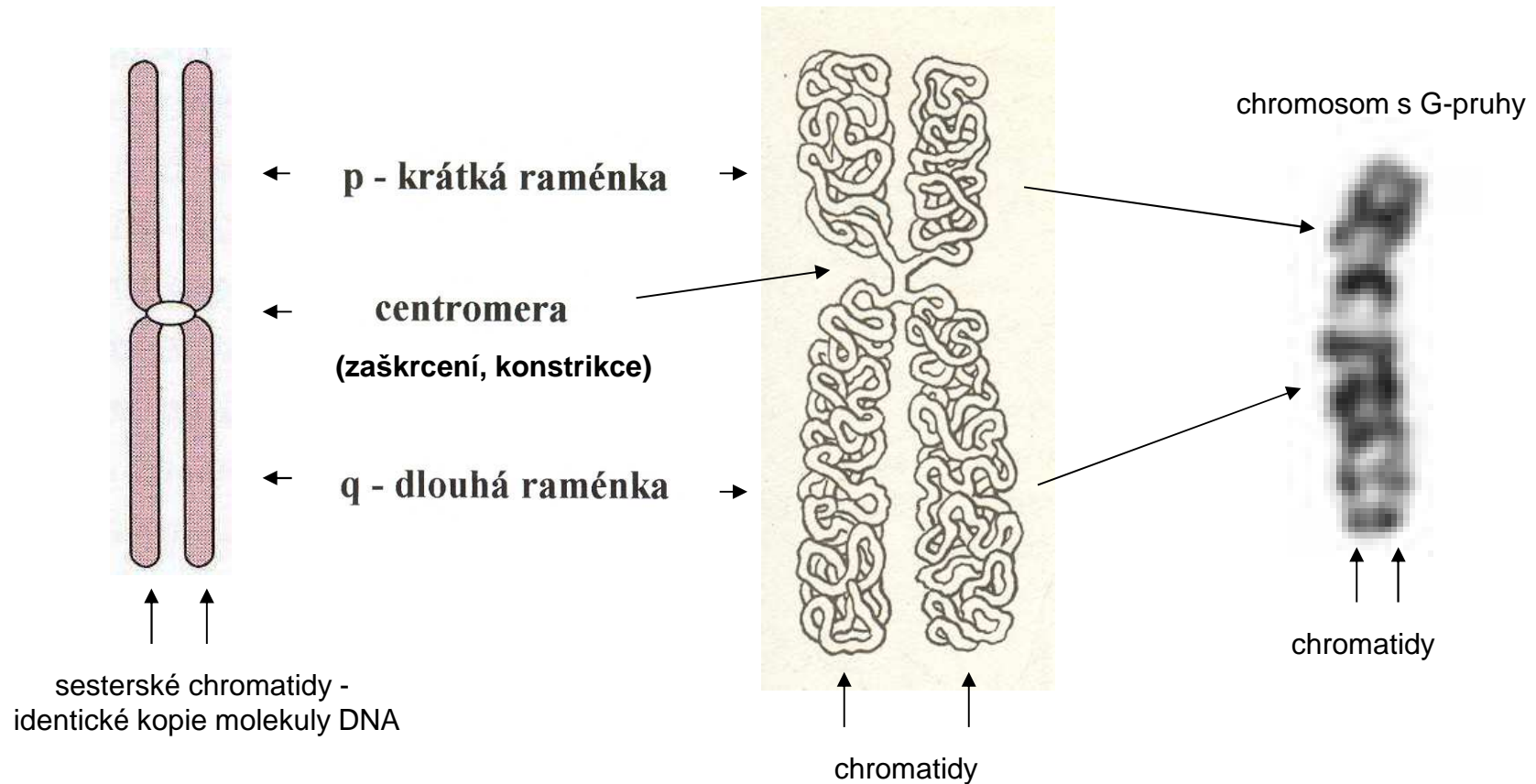
CHROMATIN A CHROMOSOMY BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU

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 V METAFÁZI MITÓZY vláknitá struktura

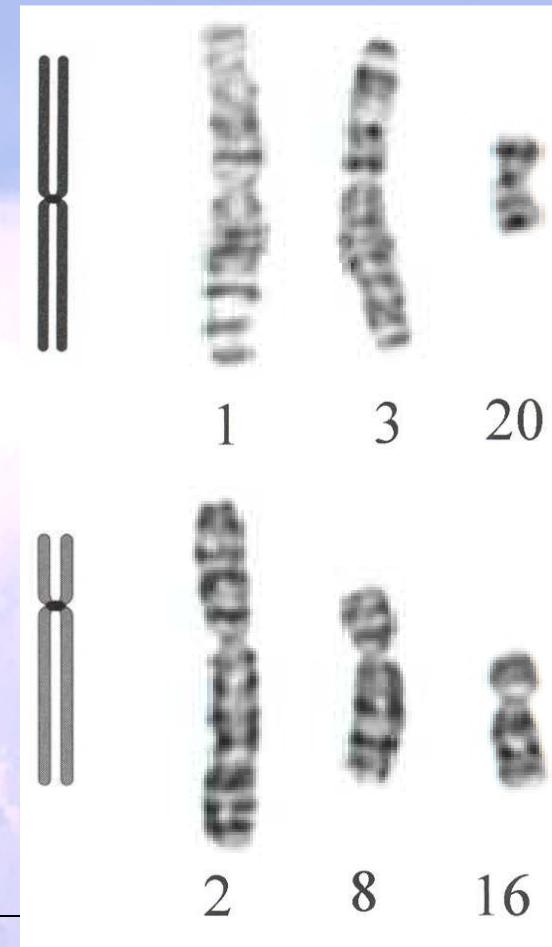


chromatida - 1 kontinuální molekula dvouvláknové DNA ve vazbě s chromosomovými proteiny

CHROMOSOMY V PRAXI

třídění chromosomů podle umístění centromery

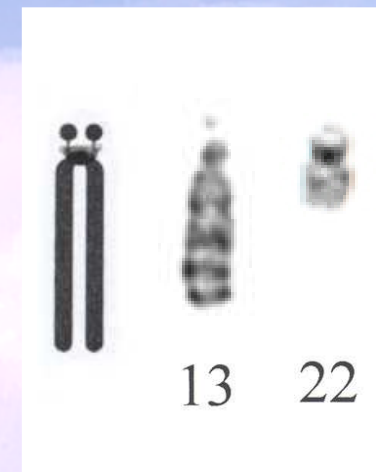
- **metacentrické chromosomy**
centromera téměř nebo úplně uprostřed, tedy krátká a dlouhá raménka jsou (téměř) stejně dlouhá
- **submetacentrické chromosomy**
centromera mimo střed chromosomu, p a q raménka jsou jasně délkově odlišena



CHROMOSOMY V PRAXI

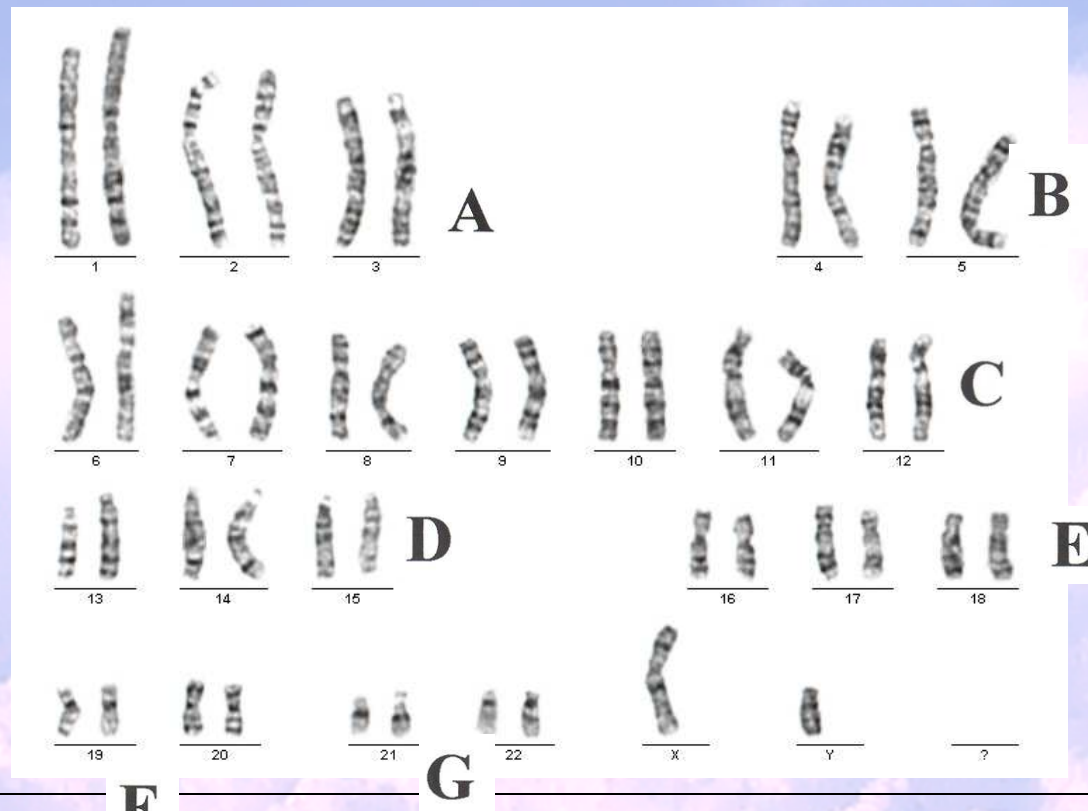
třídění chromosomů podle umístění centromery

- **akrocentrické chromosomy**
centromera je umístěna velmi blízko jednomu konci;
od krátkých ramének jsou odškrnceny satelity (malé výrazné části chromatinu);
místo odškrncení = sekundární konstriktce (tenké stopky);
(sekundární konstriktce obsahuje kopie genů kódujících rRNA = organizátor jadérka)



CHROMOSOMY V PRAXI

třídění chromosomů do skupin podle velikosti a pozice centromery normální mužský karyotyp 46, XY



F vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



CHROMOSOMY V PRAXI

karyotyp

- Karyotypem nazýváme utříděný a zhodnocený **soubor chromosomů** jedince nebo buňky. Hodnocení spočívá v analýze počtu a struktury chromosomů standardně v 10 buňkách vyšetřované tkáně. Výsledný karyotyp je vyjádřen zápisem, v němž označujeme **počet chromosomů**, **pohlavní chromosomy** a případné **aberace** (patologické změny).
- lidský karyotyp se skládá ze **46 chromosomů**, z toho **22 párů autosomů** (nepohlavních chromosomů – chromosomové páry 1 – 22) a **2 gonosomů** (pohlavních chromosomů – XX nebo XY)
- chromosomový pár je tvořen **homologními** chromosomy, z nichž jeden je zděděn od otce a druhý od matky, nepárové chromosomy jsou **nehomologní** (somatické diploidní buňky)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



ZÁPIS KARYOTYPU

46,XX - normální ženský karyotyp

46,XY - normální mužský karyotyp

počet chromosomů

pohlavní chromosomy



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

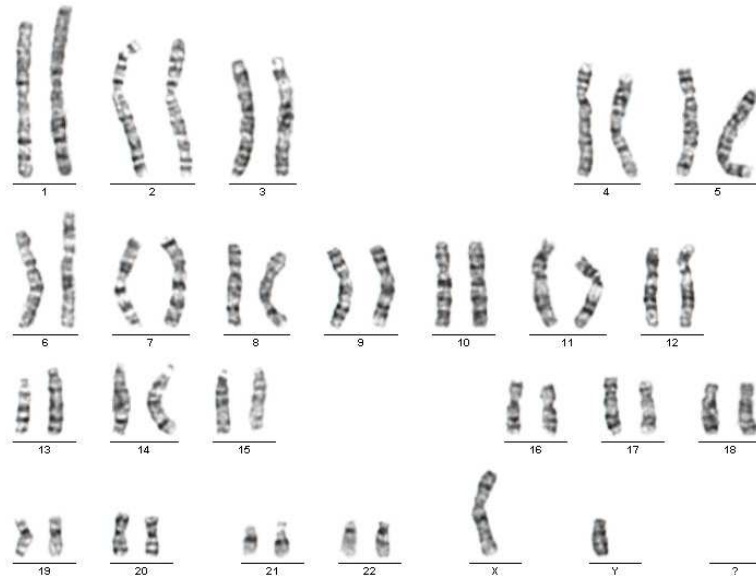


CHROMOSOMY V PRAXI

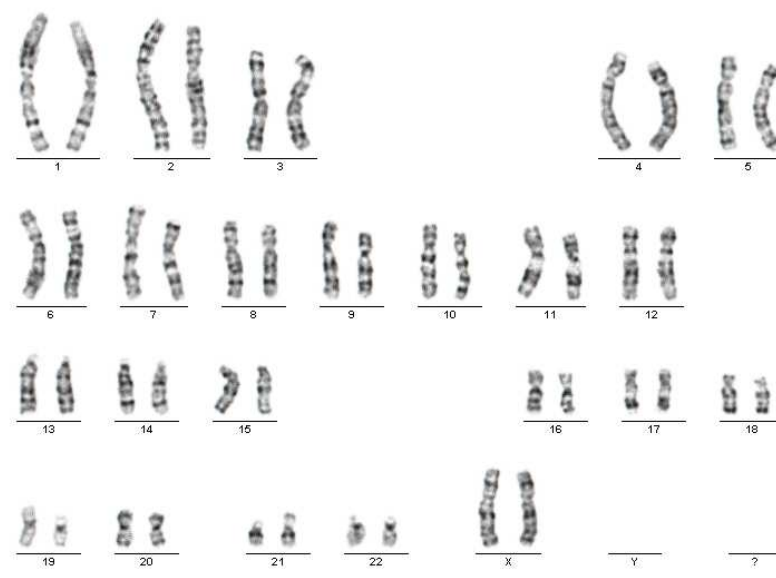
normální karyotyp

Karyogram – obrázek karyotypu 1 buňky, sestavený z reálných chromosomů

normální mužský karyotyp 46,XY



normální ženský karyotyp 46,XX



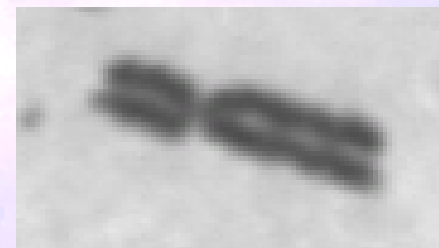
HISTORIE KLINICKÉ CYTOGENETIKY

klasické metody analýzy

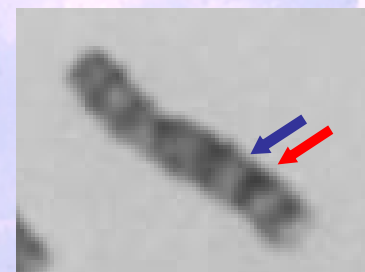
- **vznik moderní lidské cytogenetiky**

- datuje se od roku **1956**, kdy byl stanoven počet lidských chromosomů a byly vyvinuty efektivní metodiky analýzy chromosomů

- **klasická konvenční metoda barvení chromosomů**
(chromosomy obarveny po celé délce – lze třídit chromosomy podle velikosti a polohy centromery)



- **pruhovací metody (1968-70)**
(proužky na chromosomech, které umožňují individuální rozlišení jednotlivých chromosomů a chromosomových změn)



METODY PŘÍPRAVY CHROMOSOMOVÝCH PREPARÁTŮ, HODNOCENÍ CHROMOSOMŮ - metody klasické cytogenetiky



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

- odběr materiálu
- kultivace – **získání dostatečného množství dělicích se buněk,
v nichž dochází ke spiralizaci chromosomů**
- zpracování suspenze buněk
- nakapání suspenze na mikroskopická sklíčka
- pruhování / barvení chromosomů na sklíčkách

- metody 1. volby v indikovaných případech
- relativně levné metody (ve srovnání s metodami molekulární cytogenetiky)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



odběr materiálu



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

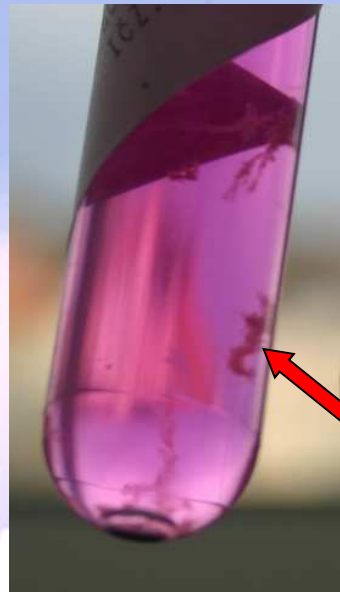


METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

odběr materiálu



periferní krev
nebo krev plodu

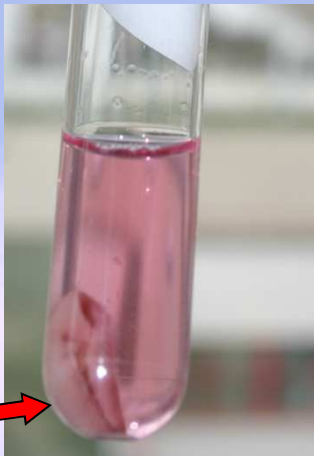


choriové klky



plodová voda

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY odběr materiálu



kůže potracených
plodů



kostní dřev



solidní nádor

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

odběr materiálu

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

- do **heparinu** (nesrážlivá krev) – periferní krev, krev plodu
- do heparinu a transportního média – kostní dřeň
- do transportního média – solidní tumory, kůže, choriové klky
- **bez přídavku** média a dalších látek – plodová voda



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



kultivace



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

nasazení buněk do kultivačního média

sterilní práce v laminárním boxu

!!!!!!STERILNÍ PROSTŘEDÍ!!!!!!



nasazení periferní krve



nasazení plodové vody



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

kultivace – v termostatu při 37°C



- délka kultivace se liší v závislosti na typu materiálu a vyšetření (bez kultivace (kostní dřeň), 72 hodin (periferní krev), přibližně 10 dnů (plodová voda))



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

aplikace kolchicinu po kultivaci

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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



zpracování suspenze buněk



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

zpracování suspenze

- **hypotonizace**

lýza erytrocytů, zvětšení objemu T - lymfocytů, rozestoupení chromosomů v důsledku působení hypotonického roztoku



přídavek roztoku KCl
(periferní krev)



inkubace hypotonizační směsi v termostatu 37°C

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

zpracování suspenze

- **fixace – získání suspenze**

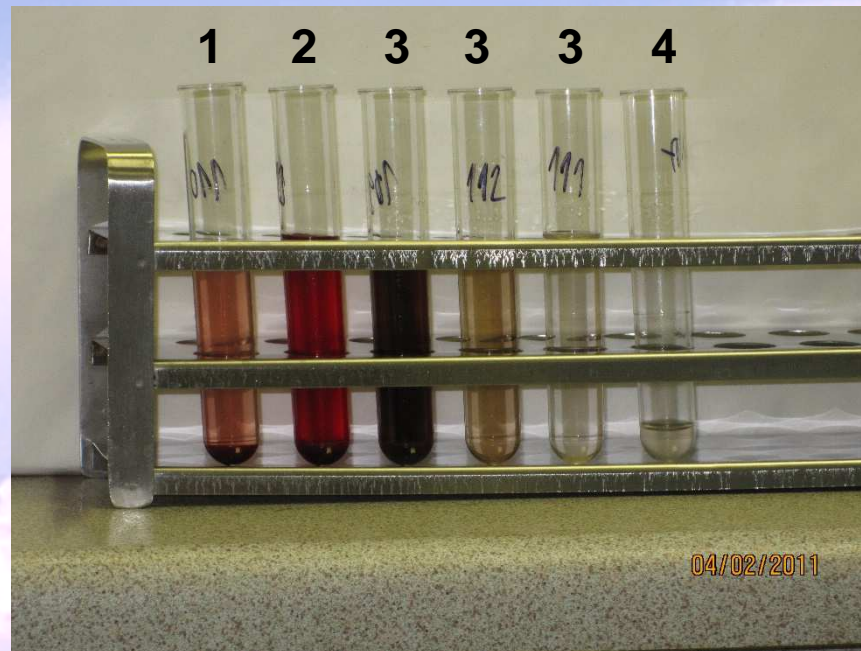
- kyselina octová (1) : metanol (3)
- odvodnění buněk, zviditelnění struktury a zlepšení barvitelnosti chromosomů, rozrušení cytoplasmy buněk, rozpuštění nečistot



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

zpracování suspenze – rekapitulace kroků

- 1- vzorek po **kultivaci** a centrifugaci
- 2 – po **hypotonizaci** a centrifugaci
- 3 – po **fixaci** a centrifugaci (přídavek fixativu 3x)
- 4 – **výsledná suspenze T - lymfocytů**



nakapání suspenze na mikroskopická sklíčka

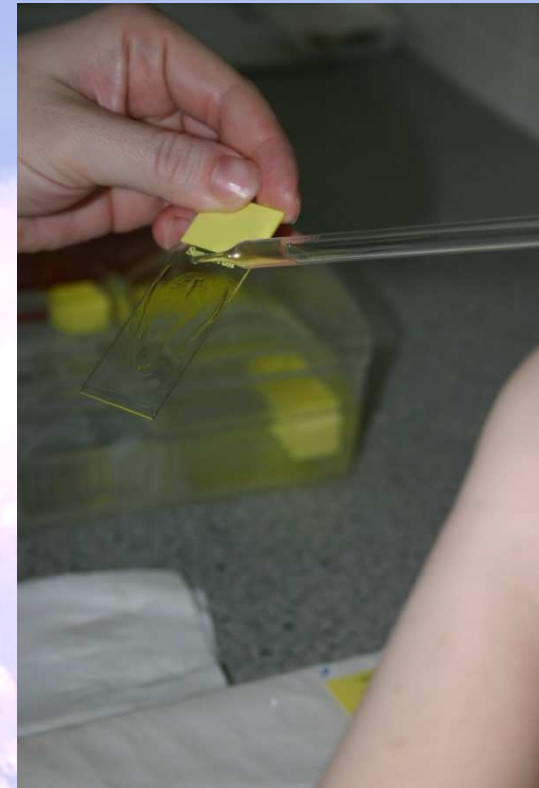


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

nakapání suspenze na sklíčka



sklíčka zasychají při pokojové teplotě ve vodorovné poloze



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



pruhování chromosomů

(konvenční barvení chromosomů)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



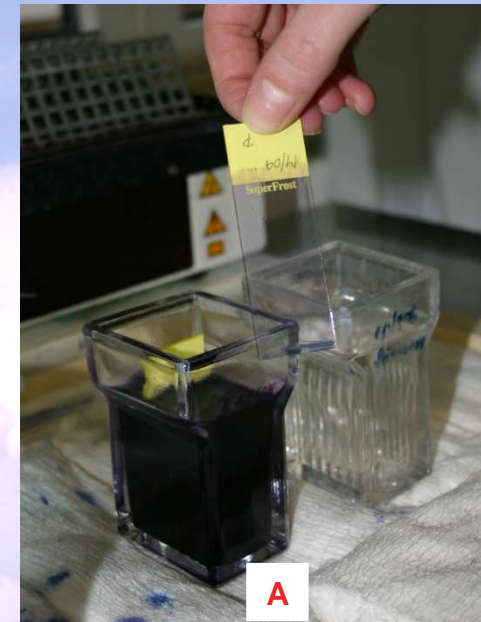
METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

G - pruhování chromosomů

G - pruhování chromosomů



1 - inkubace preparátu v roztoku enzymu trypsinu
(natrávení chromosomových proteinů proteolytickým
enzymem)



2 – barvení barvivem
Giemsa – Romanowski - **A**

METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

G - pruhování chromosomů

G-pruhování chromosomů

analýza karyotypu

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



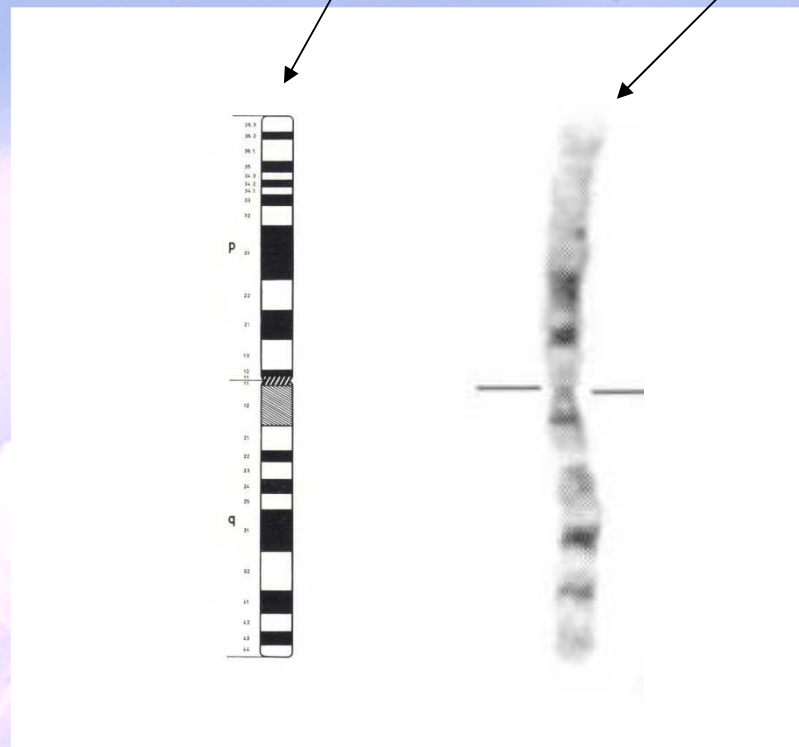
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

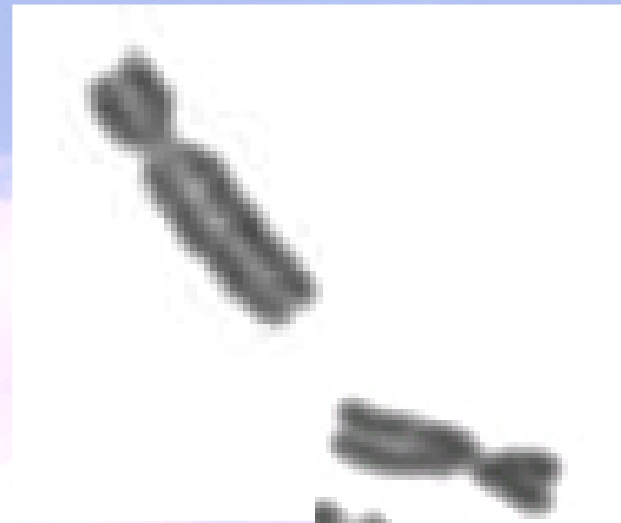
G - pruhování chromosomů

G - pruhování chromosomu č. 1 – vzor (**idiogram**) a reálný chromosom



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

konvenční barvení chromosomů



chromosomy jsou obarvené tmavě, bez příčných pruhů

barvení v barvivu Giemsa – Romanowski
(vynecháme inkubaci v trypsinu)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



hodnocení karyotypu – souboru chromosomů v buňkách



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY **KLASICKÉ** CYTOGENETIKY hodnocení

chromosomy hodnotíme ve **SVĚTELNÉM MIKROSKOPU** při zvětšení
přibližně 1000x



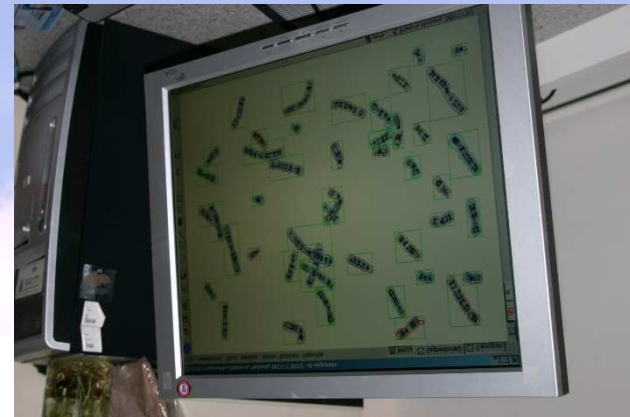
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY hodnocení

ke třídění chromosomů a sestavení karyotypu lze využít počítačového programu

světelný mikroskop
s CCD kamerou
napojený na počítač



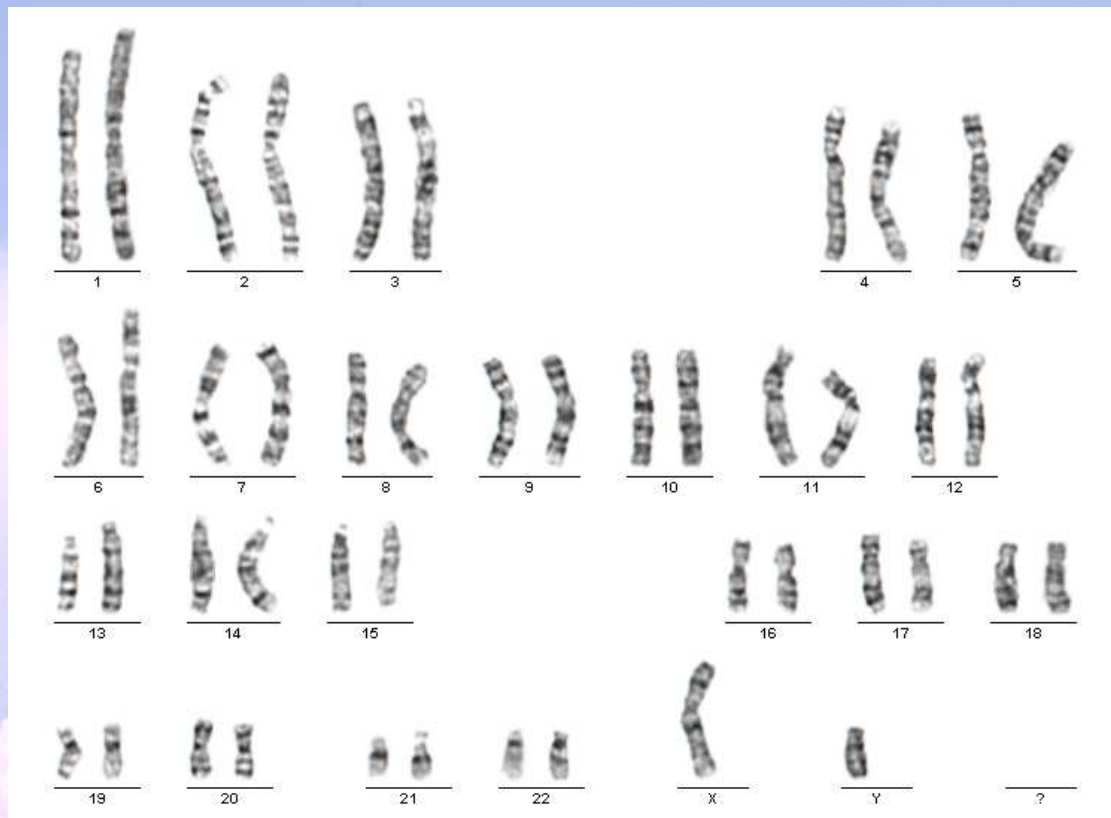
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

hodnocení

karyogram sestavený na počítačovém programu Lucia



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

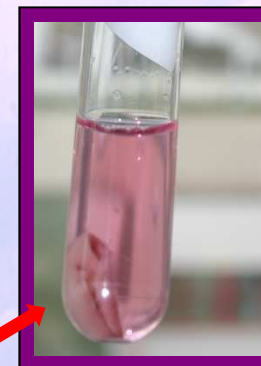


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VSTUPNÍ MATERIÁLY K VYŠETŘENÍ VROZENÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ

- postnatální materiály: periferní krev, kůže
- prenatální materiály: plodová voda, choriové klky, krev plodu, kůže potracených plodů



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

- významně se podílejí na mnoha případech poruch reprodukce, vrozených malformací, mentálních retardací
- cytogenetické poruchy jsou přítomny přibližně u 0,6% živě narozených dětí



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (ABERACE)

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

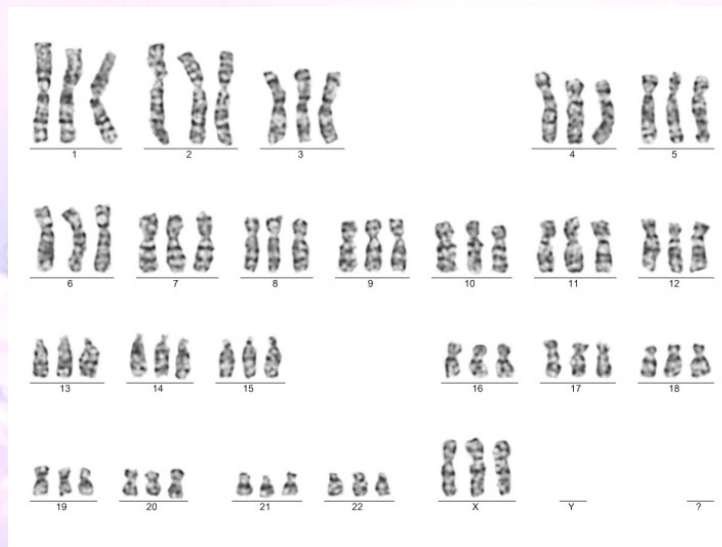


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) abnormality počtu chromosomů

- **abnormality počtu chromosomů**
- **polyploidie** – zmnožení počtu **chromosomových sad**
(1 sada = 23 chromosomů) – **pouze u potrácených plodů**
(triploidie $3n = 69$, tetraploidie $4n = 92$)



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) abnormality počtu chromosomů

- **abnormality počtu chromosomů**
- **aneuploidie** – nejčastější a klinicky velmi významný typ chromosomových poruch
 - abnormality počtu **chromosomů v páru** (normální počet chromosomů v páru = 2, abnormální nejčastěji 3 nebo 1)
 - tento stav je vždy spojen s poruchou fyzického nebo mentálního vývoje



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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)

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

- Klinefelterův syndrom 47,XXY (muž)

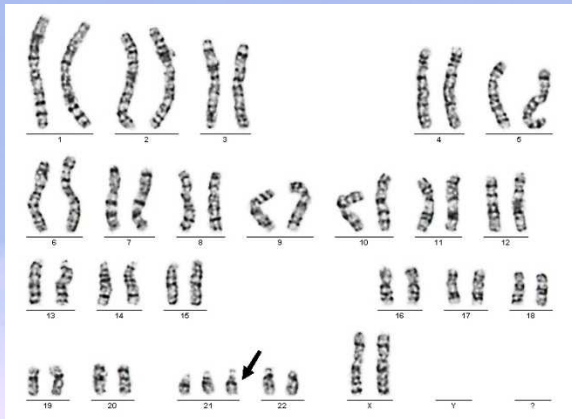


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA)

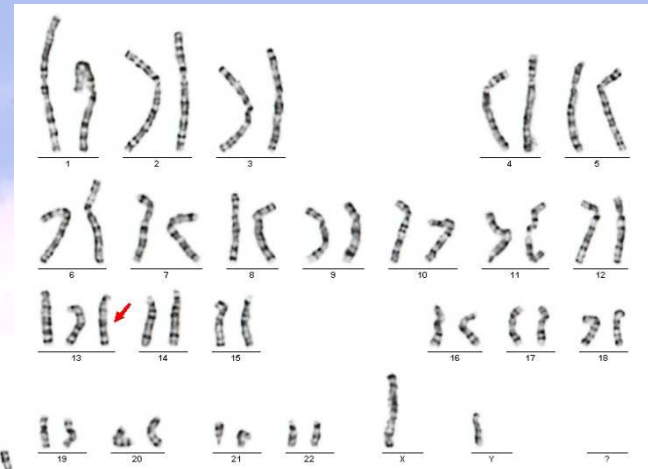
abnormality počtu autosomů
Downův, Edwardsův a Patauův syndrom



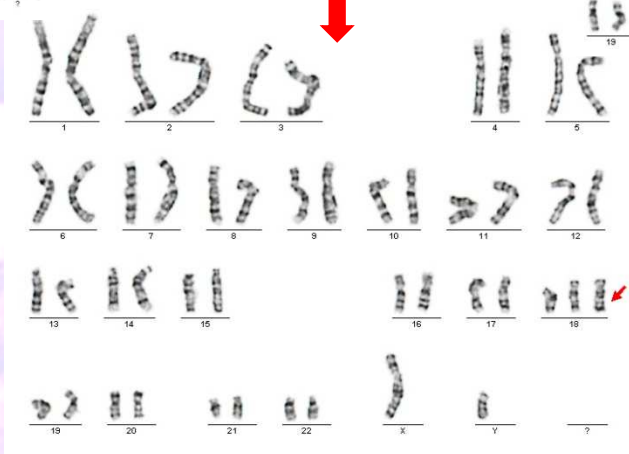
Downův syndrom
47, XX, +21



Edwardsův syndrom
47, XY, +18

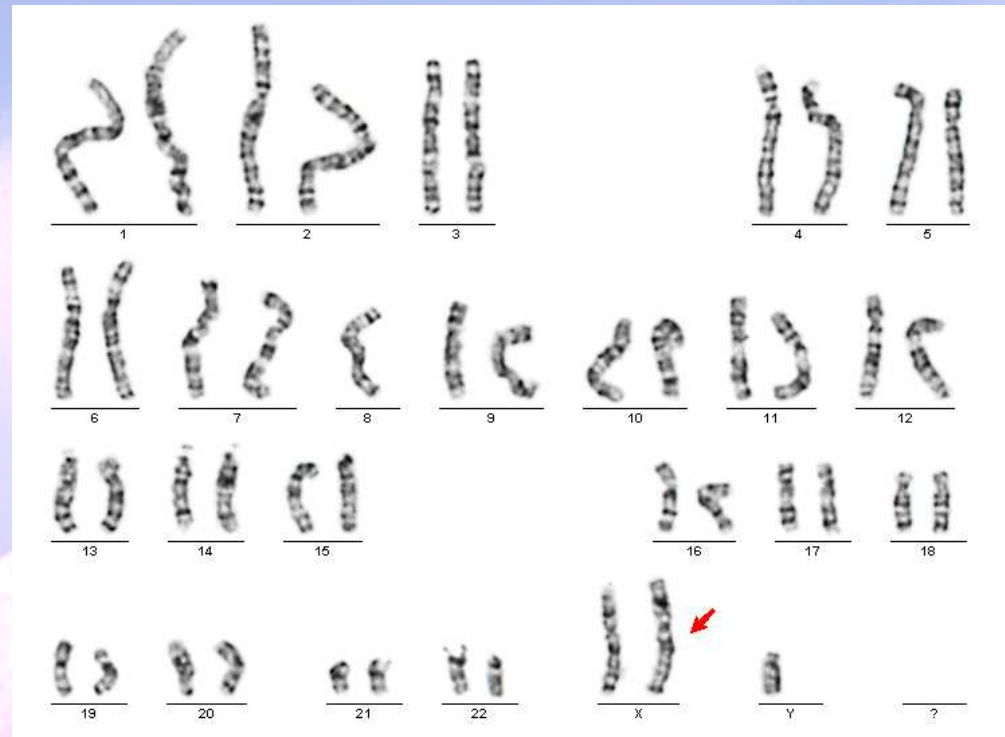


Patauův syndrom
47, XY, +13



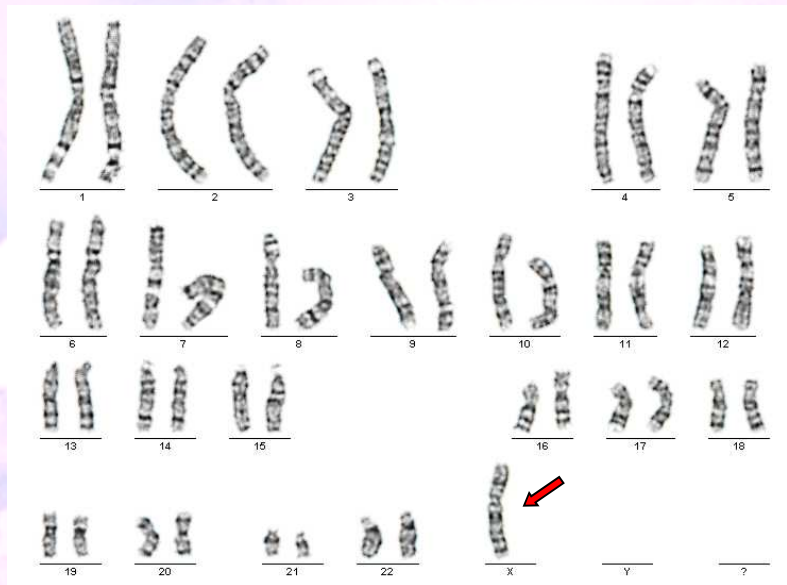
VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) abnormality počtu gonosomů Klinefelterův syndrom – aneuploidie gonosomů

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

- **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 (nebo) část přebývá (parciální trisomie)
 - většinou dochází k fenotypovým abnormalitám



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby, balancované translokace

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



nosiči translokace mají normální fenotyp (bez patologie)

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

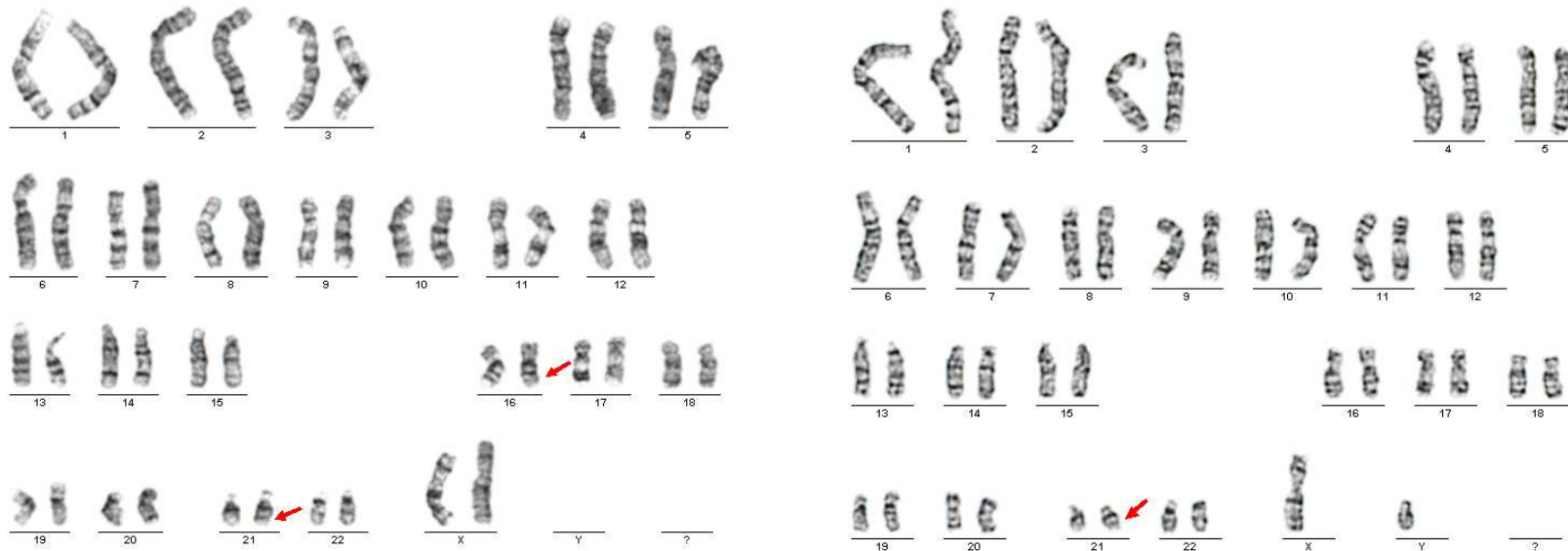
dítě postižené, po matce zdědilo
1 derivovaný chromosom pocházející
z translokace



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokace



rodič

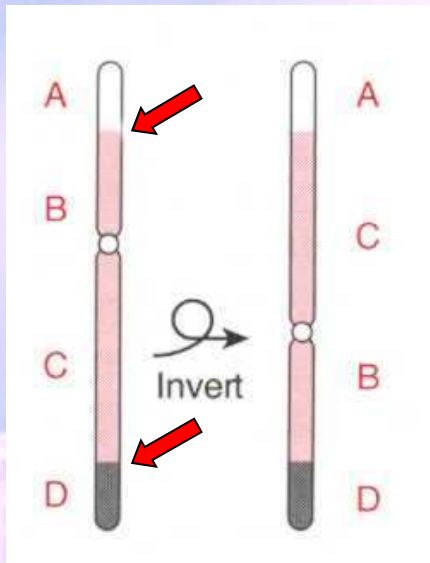
46,XX,t(16;21)(q22;q22.1)

dítě

46,XY,der(21)t(16;21)(q22;q22.1)

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

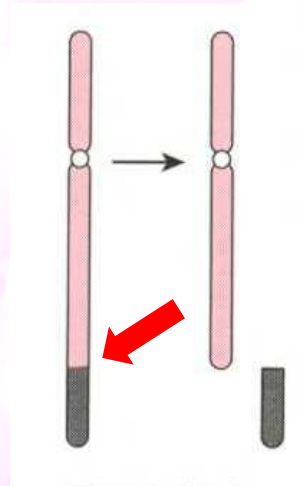


inverze u svých nositelů většinou nezpůsobují abnormální fenotyp, ale jsou spjaty s **vysokým rizikem vzniku nebalancovaných gamet** a narození abnormálních potomků

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby, nebalancované delece

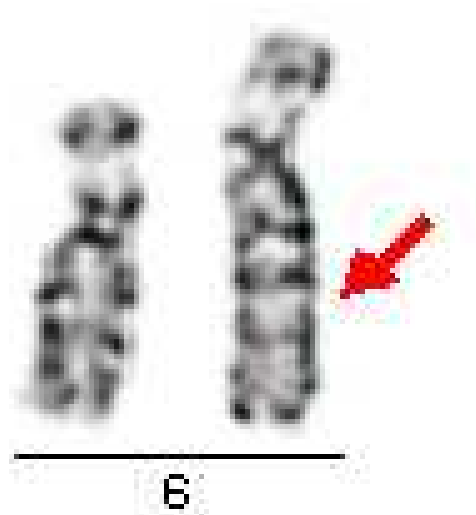
- **delece** – vznik zlomů a ztráta úseku chromosomu, který způsobuje vznik nebalancovaného karyotypu (**parciální monosomie**)

Pacienti mají ve většině případů abnormální fenotyp.



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby duplikace

- **duplikace** – nadbytečný chromosomový segment, který způsobuje vznik nebalancovaného karyotypu (**parciální trisomie**)
 - bývají méně nebezpečné než delece, pacienti mají ve většině případů abnormální fenotyp



- vznik de novo
v důsledku
nerovnoměrného
crossing overu

**duplikace segmentu
dup(6)**

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(5) → delece v karyotypu (strukturní změna)

46,XX,dup(6) → duplikace v karyotypu (strukturní změna)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



Klinické indikace k postnatálnímu stanovení karyotypu

- **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 0,6%), 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**



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



Klinické indikace k prenatálnímu stanovení karyotypu (karyotypu plodu)

invazivní metody vyšetření karyotypu plodu jsou indikovány – **při vyšším riziku narození dítěte s VCA (vrozenou chromosomovou aberací)**

- patologické hodnoty biochemických markerů z krevního séra matky (screening I., II. trimestru)
- VVV nalezené na UZ (screening I., II. trimestru)
- balancovaná VCA u rodičů nebo v rodině
- výskyt VCA v rodině
- předchozí porod dítěte s VCA
- po umělém oplodnění (IVF – in vitro fertilizace)

- věk matky – 35 let v roce porodu - **pouze vyšší věk není indikací k vyšetření**
- věk otce – nad 40 let (riziko vyššího výskytu monogenních chorob) - **II -**
- součet věku rodičů – nad 70 let - **pouze vyšší věk není indikací k vyšetření**



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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 – speciální metody s vyšší rozlišovací schopností, některé detekují pouze specifické úseky genetického materiálu, jiné vyšetří celý genetický materiál)
- začátek rozvoje – přelom 60.- 70. let 20. století
- metodami klasické cytogenetiky (ve světelném mikroskopu) lze na chromosomech rozlišit strukturní změny pouze o určité velikosti (>5 – 10 Mb)
- změny menší lze detekovat metodami s vyšší rozlišovací schopností – metodami molekulární cytogenetiky



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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 **relativně nízkou cenou, 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 ...)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

– FISH (fluorescenční in situ hybridizace)

fluorescenční in situ hybridizace (FISH) 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 značeny fluorescenční značkou.



in situ – na původním místě (cílový úsek vizualizujeme na původním místě na chromosomu nebo v interfázním jádře – pozorujeme na podložní skličku ve fluorescenčním mikroskopu; (pro srovnání - 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)

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

– signál pozorujeme ve **FLUORESCENČNÍM MIKROSKOPU**,
barevné záření vypovídá o místě vazby sondy

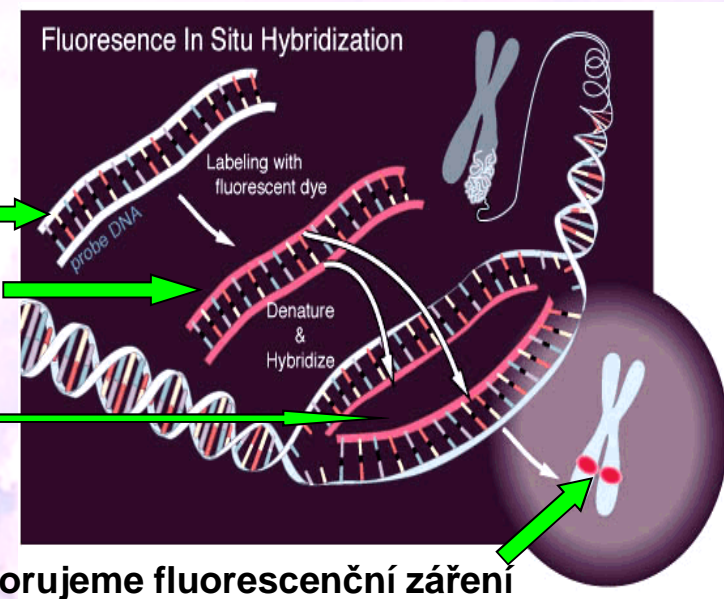
sonda před naznačením fluorescenční značkou

značená sonda

vazba sondy na cílovou DNA

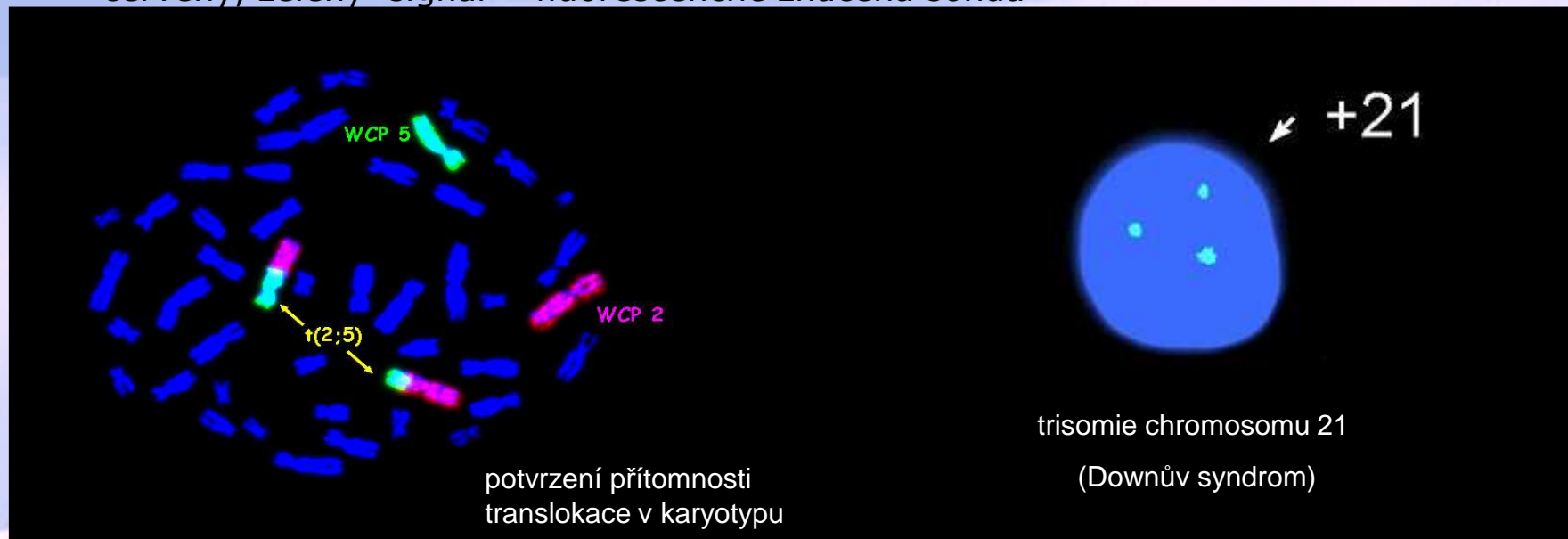
v místě navázání sondy pozorujeme fluorescenční záření

denaturace – rozvolnění vodíkových můstků mezi řetězci molekul DNA (cílové DNA a SONDY) – vliv teploty a chemických látek
hybridizace – znovuspojení vláken DNA – vznikají hybridní vlákna – cílová DNA - sonda



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, zelený signál = fluorescenčně značená sonda



FISH na metafázních chromosomech

FISH na interfázních jádrech

METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MODIFIKACE FISH

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

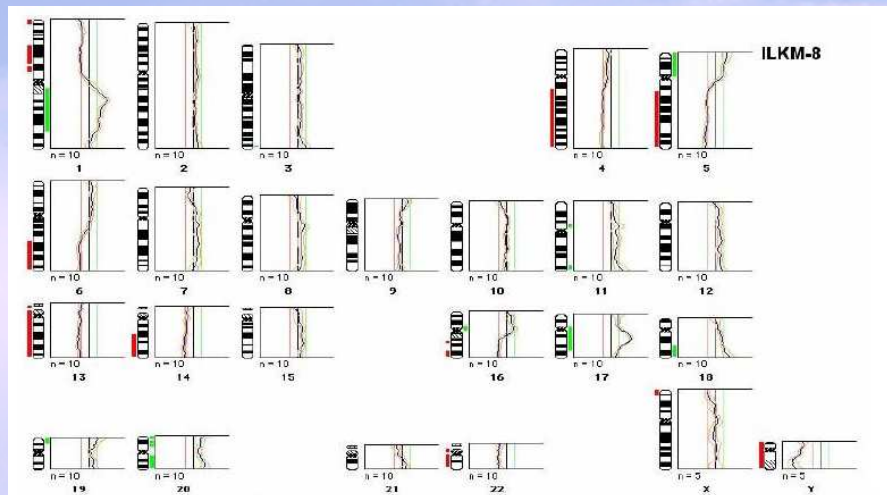


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

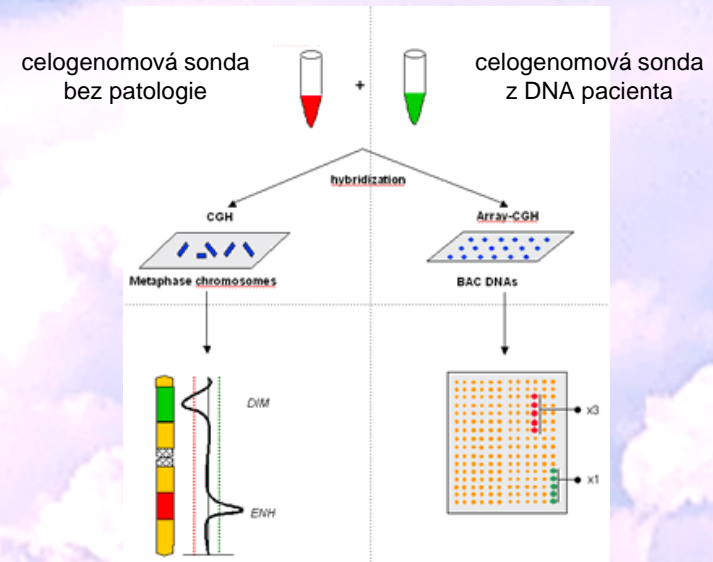


METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MODIFIKACE FISH – CGH (komparativní genomová hybridizace)

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



Obr. 7: Metoda CGH. Výsledek u pacienta s mnohočetným myelomem. CGH Data Base (url 14).

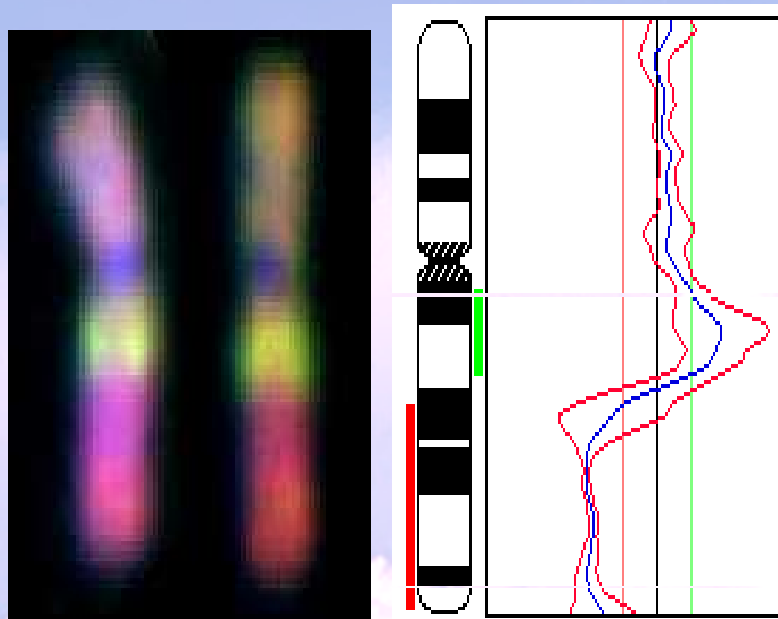


zeleně označeny úseky na chromosomech, které jsou v karyotypu maligního klonu zmnoženy,
červeně označeny chybějící úseky chromosomů (obrázky převzaty z internetu)

METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – Array-CGH – vyšší rozlišovací schopnost – odhalíme menší změny

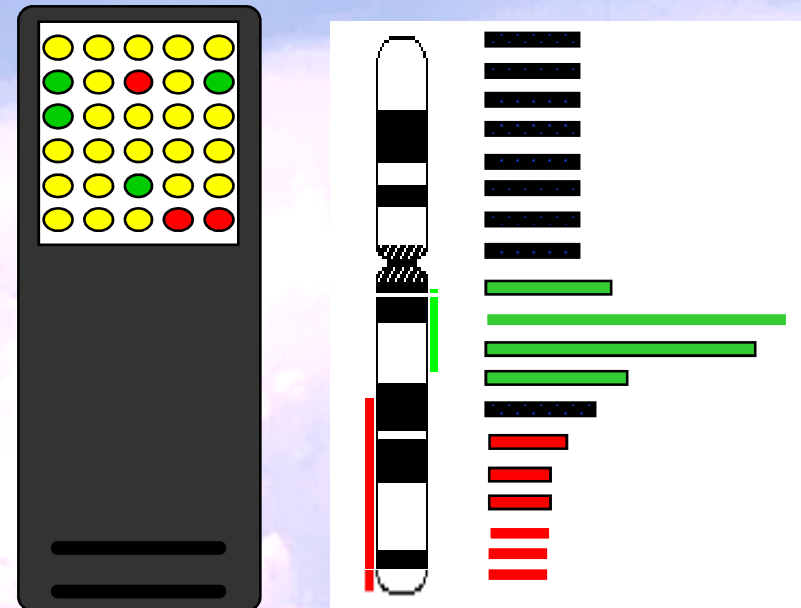
rozdíl od CGH je jen v podkladu

CGH



Cílová DNA je sklíčko s chromosomy na které hybridizují fluorescenčně značené sondy.

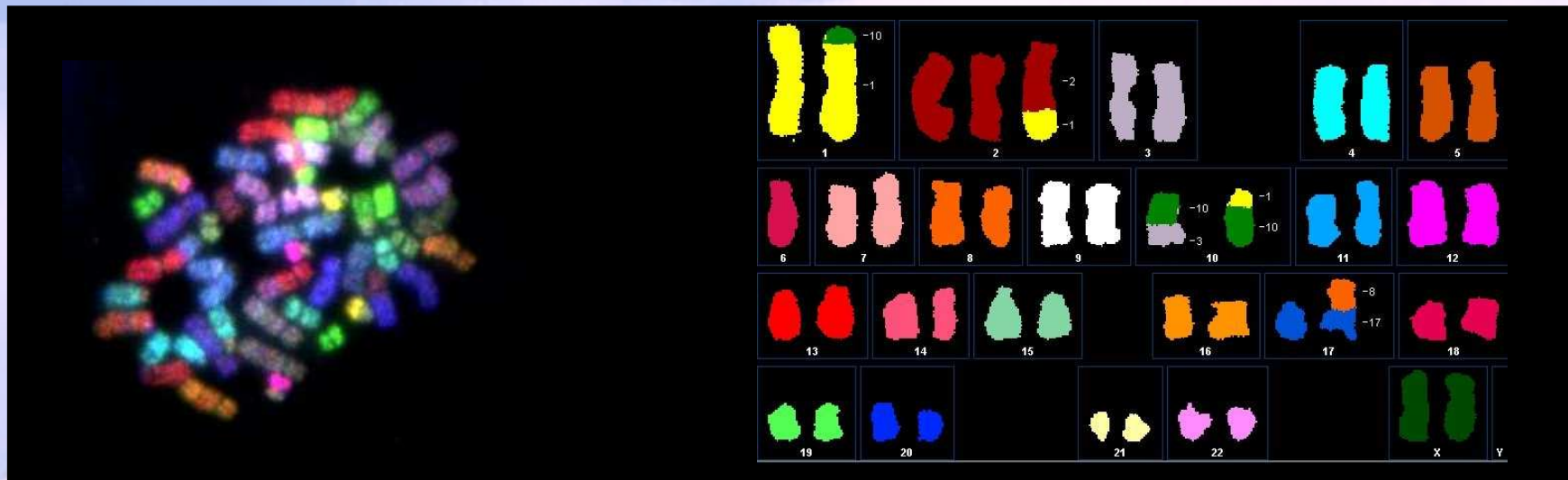
Array-CGH



Cílová DNA je sklíčko s naspotovanými úseky DNA (ne celé chromosomy) na které hybridizují fluorescenčně značené sondy.

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

objasnění složitých přestavech (např. translokace)
směs sond, které barevně odliší genetický materiál jednotlivých chromosomových párů



SKY – mitóza po hybridizaci
se směsí sond značených fluorochromy

SKY – seřazené chromosomy po úpravě obrazu

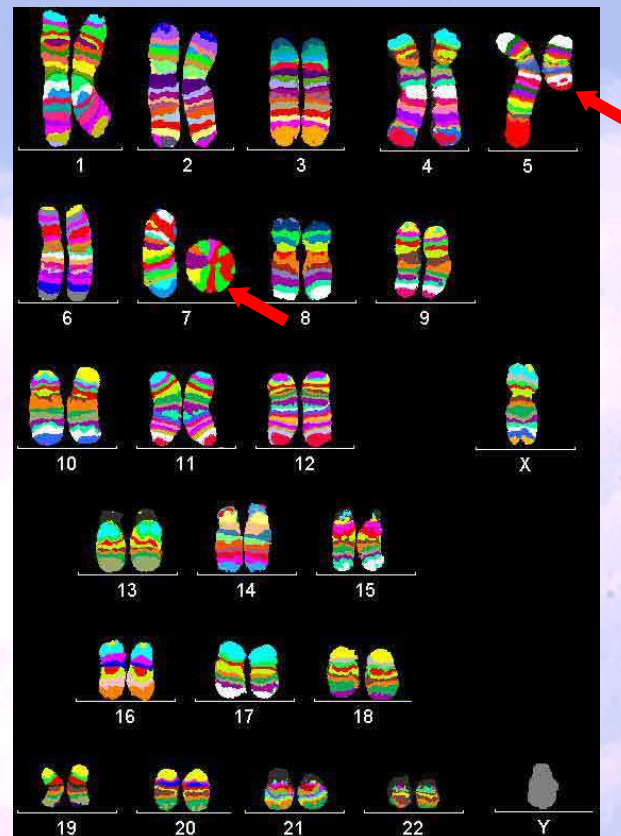


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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

přestavby v rámci jednoho
chromosomu (inverze, delece)



ONKOCYTOGENETIKA - získané chromosomové aberace



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



ONKOCYTOGENETIKA

základy

- zhoubné bujení je genetické onemocnění
- vznik nádoru (maligní transformace) je mnohašupňový proces – zahrnuje 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
- cytogeneticky jsou u onkologických pacientů analyzovány chromosomové přestavby, které vznikají v průběhu progresu onemocnění, jedná se o **získané aberace (nikoli vrozené)**



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



ONKOCYTOGENETIKA

protoonkogeny - onkogeny

- **protoonkogeny** – normální geny přítomné ve všech buňkách, jsou zahrnuty do procesů regulace buněčné proliferace (buněčného dělení, růstu a diferenciaci) a reparace (opravy) DNA
- **onkogeny** – mutované („aktivované“) alely protoonkogenů, mutace vede k **zisku funkce** nebo **změně funkce** (atypická aktivace). Usnadňují maligní transformaci.

K aktivaci dochází v důsledku mutace.



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



ONKOCYTOGENETIKA

tumor supresorové geny

- **tumor supresorové geny (antionkogeny)** – normální buněčné geny, jejichž funkcí je zabránit nekontrolovanému dělení buněk. Jejich onkogenicita se projeví při **ztrátě funkce (inaktivaci) obou alel genu**.

K inaktivaci dochází většinou v důsledku delece.



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VSTUPNÍ MATERIÁLY K VYŠETŘENÍ

kostní dřeň



solidní nádory



periferní krev



VYŠETŘENÍ CHROMOSOMŮ

vyšetření v laboratořích
klasické a **molekulární** cytogenetiky

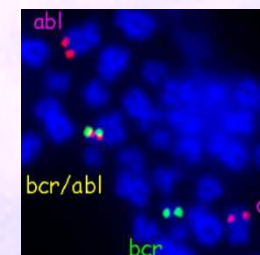
klasická cytogenetika – kultivace, zpracování vstupních materiálů založeny na obdobných principech

- **G-pruhování chromosomů**

molekulární cytogenetika – **metoda FISH, SKY, CGH a další metody**

stanovujeme **KARYOTYP MALIGNÍCH KLONŮ** –

v nádorové tkáni mohou být přítomny skupiny buněk s odlišným karyotypem – klony – v rámci klonu stejný karyotyp



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



ZÍSKANÉ CHROMOSOMOVÉ ABERACE u onkologických pacientů

– souvisí se vznikem a progresí onkologického onemocnění (poruchy dělení somatických buněk), vyšetřujeme buňky postižené nádorovým bujením

- **početní abnormality**
- abnormality počtu chromosomových sad (obv. se nejedná o přesný násobek haploidního počtu)
 - polyploidie (hypo-, hyper- (di-, tri- atd.) ploidie)
- abnormality počtu chromosomů v páru
 - aneuploidie (trisomie, monosomie)- často se týká jiných chromosomů než u vrozených chromosomových aberací
- **strukturní abnormality**
- translokace, inverze, delece, duplikace a další změny – konkrétní aberace odlišné od VCA (vrozených chromosomových aberací)
- **amplifikace (mnohonásobné zmožení onkogenu, detekovatelné cytogeneticky)**
 - pouze u onkologických pacientů



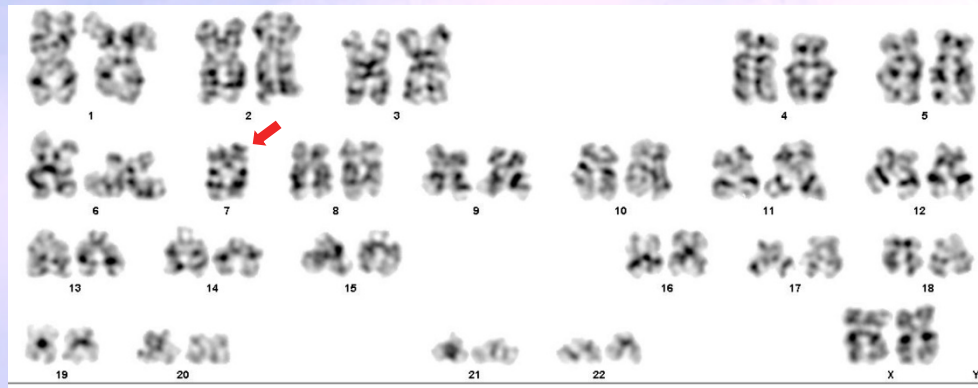
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



ONKOCYTOGENETIKA

typy chromosomových změn

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



45,XX,-7

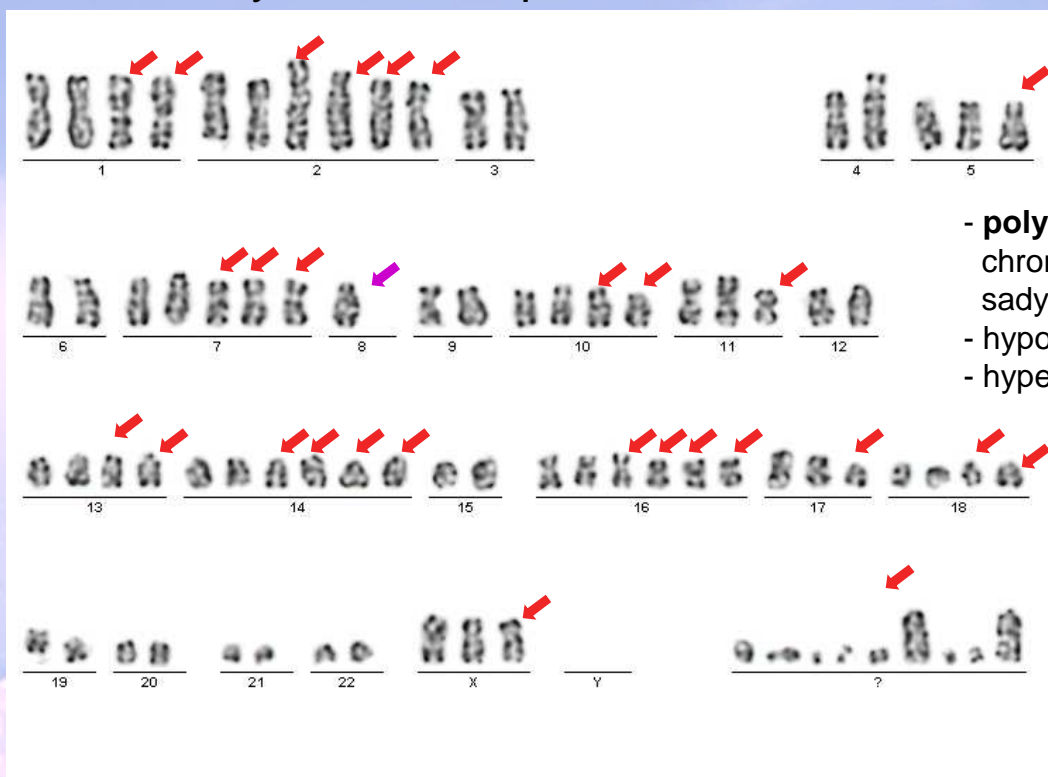


47,XX,+8

ONKOCYTOGENETIKA

typy chromosomových změn

- chromosomové změny – **početní**
 - chybění nebo nadbytek většího počtu chromosomů



- **polyploidie** – násobek počtu chromosomových sad – často sady nejsou kompletní
- hypo - diploidie
- hyper - triploidie...

ONKOCYTOGENETIKA

typy chromosomových změn

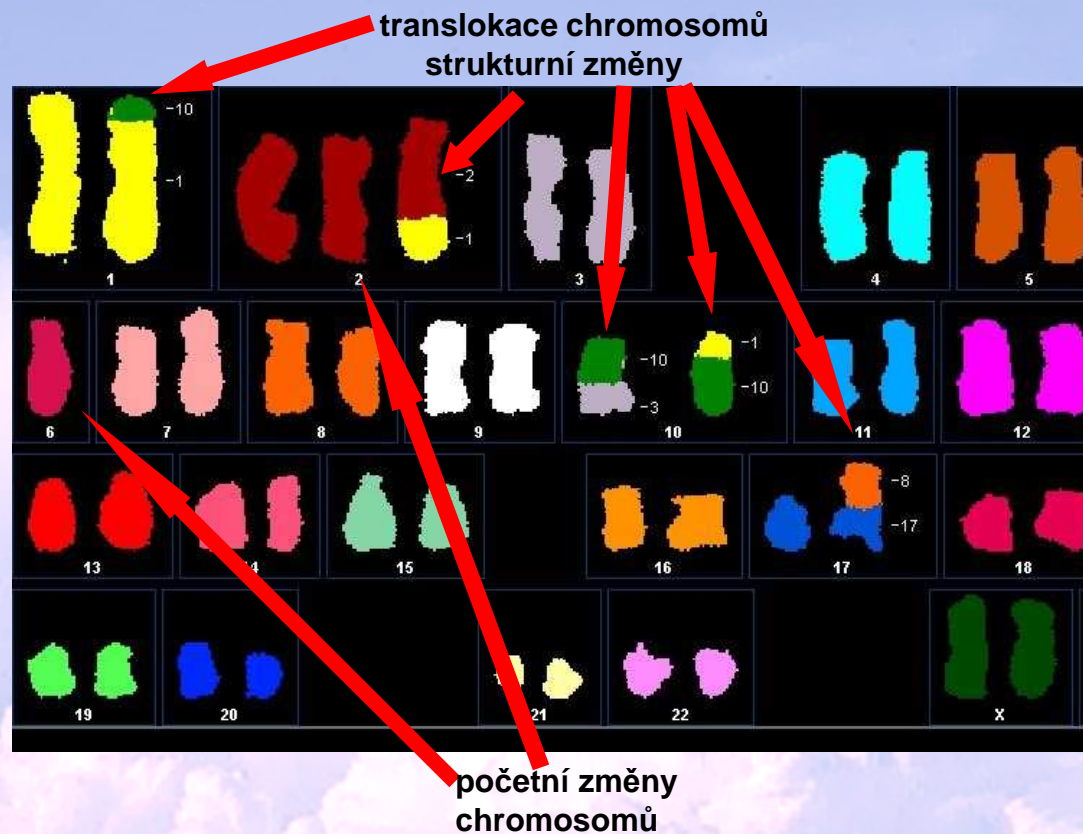
- chromosomové změny - **strukturní**
 - často typické změny pro určité typy nádorů (jiná místa zlomů než u VCA)
- **translokace** – nejznámější translokace **t(9;22)** – **Ph chromosom** (Philadelphský chromosom) u **chronické myeloidní leukemie (CML)**
- **inverze**
- **delece**
- **amplifikace** - 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

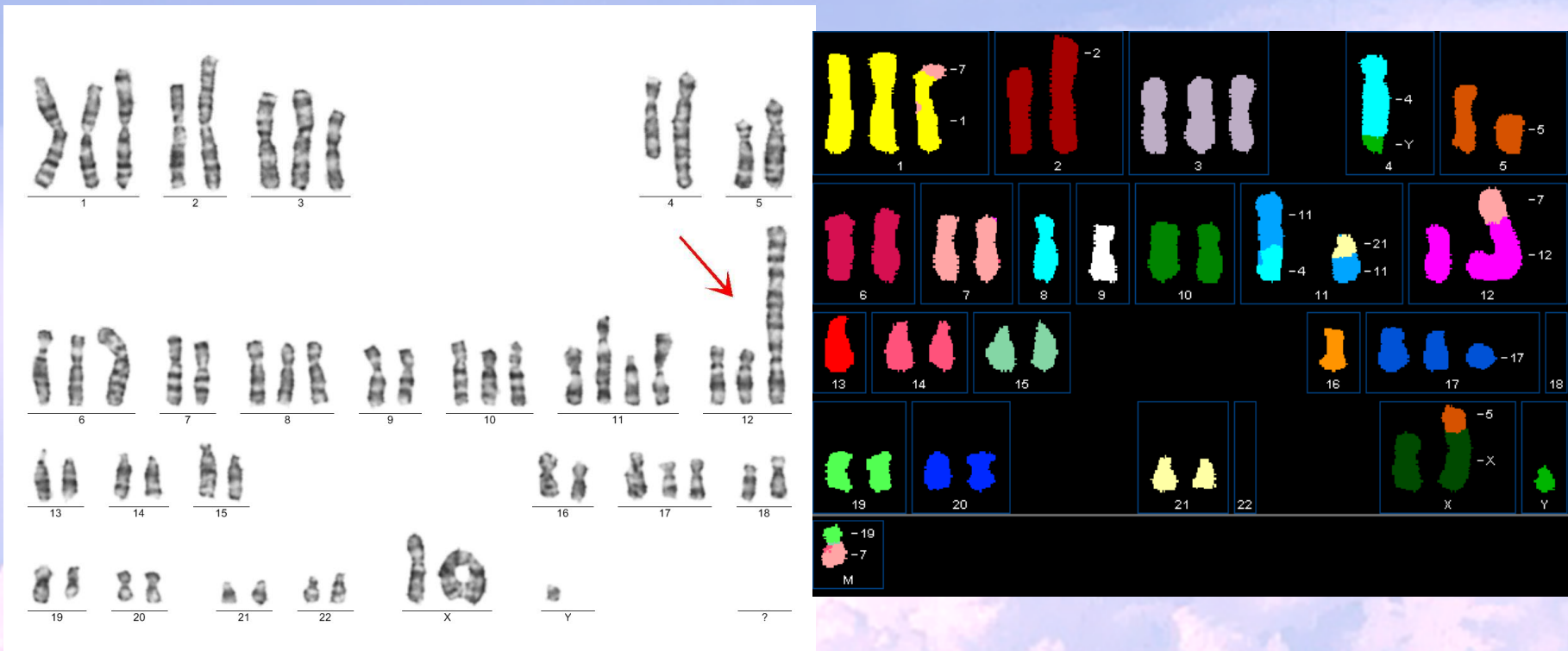


ONKOCYTOGENETIKA

komplexní karyotyp

56,XY,der(X)t(X;5),+der(1),add(2),+3,der(4)t(4;?),+6?,+8,
+10,der(11),+der(11)t(11;21)?,+der(11),+der(12)t(7;12)
qdp(12p),+17,der(18)

smíšený germinální tumor



ONKOCYTOGENETIKA

typy chromosomových změn

nahromadění více chromosomových změn v karyotypu =
KOMPLEXNÍ KARYOTYP

(charakteristický znak zhoubných nádorů zvláště
v pozdějších stádiích progresu nádoru)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



VÝZNAM VYŠETŘENÍ ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ u onkologických pacientů

U **onkologických pacientů** vyšetřujeme buňky postižené nádorovým bujením, v souvislosti s onemocněním vznikají chromosomové změny.

Cytogenetické vyšetření přesněji charakterizuje nádor, typ nalezených aberací vypovídá o prognóze, fázi onemocnění. Pomáhá **zpřesnit diagnózu, stanovit prognózu onemocnění, sledovat úspěšnost léčby a průběh onemocnění, zvolit léčebný postup.**

Cílem je záchrana života pacienta.

- některé translokace – vznik fúzních genů, jejichž produkty mají změněnou funkci podporující nebo způsobující nádorové bujení
- některé chromosomové změny souvisejí s horší/ lepší/ střední prognózou



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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

