

Hematologie pro zdravotní laboranty

III. Laboratorní diagnostika v hematologii

Cytogenetické a molekulárně genetické vyšetření

1. Genetická informace buňky

Autor: Šárka Pospíšilová

Lidský jaderný genom je tvořen molekulami DNA o celkové velikosti **3,2 miliardy párů bází** (bp) a obsahuje přibližně **24 tisíc genů**. Tyto geny kódující proteiny zaujmají pouze 1,5% genomu, zbývající část tvoří sekvence, které proteinové produkty nekódují, například geny pro nekódující RNA molekuly, introny, regulační sekvence, repetitivní a rozptýlené sekvence, transpozony a další složky (Obr. 1, 2). Kromě jaderného genomu se v lidských buňkách nachází DNA také v mitochondriích (mtDNA), která je však významně menší (přibližně 17 tisíc bp, které kódují 37 genů) a dědí se po mateřské linii. Kompletní sekvence lidského genomu byla publikována v únoru 2001 týmy J. D. Watsona („Human genome project“) a J. C. Ventera (společnost Celera) (1, 2). V roce 2007 byla nastartována éra sekvenování individuálních lidských genomů pomocí vysokokapacitních sekvenačních technologií – tzv. DNA sekvenování nové generace (3, 4, 5). Tyto metodiky v budoucnu umožní sekvenování genomu jednotlivých pacientů a rozvoj personalizované a prediktivní medicíny.

Genetická informace člověka obsažená v jádře buňky je rozdělena do **23 chromozomů**, které se v somatických buňkách nacházejí ve dvou sadách (každá diploidní buňka obsahuje 46 chromozomů, tj. 6,4 miliardy bp). Z toho 22 párů chromozomů tvoří autozomy a jeden pár pohlavní chromozomy – gonozomy (heterochromozomy). Chromozomy se významně liší obsahem DNA i počtem kódovaných genů, nejvíce genetické informace obsahují chromozomy 1 a 2, naopak nejméně chromozomy 21, 22 a pohlavní chromozom Y. Podrobným studiem struktury chromozomů a jejich fyziologických i patologických změn se zabývá obor cytogenetika – viz kap. 3.

Gen je charakterizován jako úsek DNA se specifickou funkcí, který je přepisován do RNA a nese informaci pro určitou dědičnou vlastnost. Je považován za základní jednotku dědičné informace.

Podle struktury dělíme **geny** na **jednoduché** (obsahují pouze exony, tj. úseky kódující protein nebo jeho část) a **složené** (obsahují kromě exonů také introny, tj. úseky nepřekládané do proteinu vystřižené při tvorbě mRNA) (Obr. 3). Geny se liší počtem exonů / intronů i jejich délkou (mají min. 1 exon, max. až 178 exonů). Průměrná celková velikost genu se pohybuje kolem 27 tisíc bp, průměrná velikost kódující oblasti překládané do proteinu je však pouze 1300 bp (vzniklé proteiny mají tedy průměrnou velikost 430 aminokyselin). Podle funkce rozlišujeme **geny strukturní** kódující mRNA, která je přeložena do proteinu, **geny pro nekódující RNA** (např. rRNA, tRNA, snoRNA, microRNA...) a **geny regulační**.

Genová exprese neboli vyjádření genetické informace vychází z „centrálního dogmatu molekulární biologie“. Toto dogma charakterizuje cestu přenosu informací mezi DNA, RNA a proteiny a říká, že informaci lze přenést z nukleových kyselin do proteinů, avšak nikoli naopak. Mezi základní cesty přenosu genetické informace patří proces **replikace** (přenos DNA – DNA umožňující vznik identické kopie DNA při dělení buňky), proces **transkripce** (přepis informace z DNA do mRNA) a proces **translace** (překlad informace z mRNA do aminokyselinové sekvence proteinu na základě tripletového genetického kódu) (Obr. 4). Předpokládá se, že lidský genom může kódovat až 100 tisíc různých mRNA díky alternativnímu sestřihu složených genů. Počet možných forem proteinů je ještě několikanásobně vyšší díky různým post-translačním modifikacím. Je však zřejmé, že konkrétní buňky v tkáních jsou diferencovány a specializovány na určitou funkci, a proto v dané buňce nejsou exprimovány všechny geny, které jsou v jádře buňky k dispozici, ale pouze jejich část.

Jednotlivé procesy genové exprese jsou velmi přesně regulovány řadou mechanismů umožňujících realizovat buněčnou diferenciaci (rozdílení buněk) a reagovat na aktuální potřeby buňky a mezibuněčnou signalizaci (Obr. 4). Tyto mechanismy tedy zajišťují, že se RNA a proteiny vznikající transkripcí a translací nacházejí v buňce ve správném místě a koncentraci a ve správný čas. Specificky jsou regulovány **procesy transkripce, post-transkripční modifikace** (například modifikace 3' a 5' konců mRNA, sestřih mRNA složených genů), **transport RNA** z jádra do cytoplasmy, **translace a post-translační modifikace a degradace proteinů** (například modifikace aminokyselinových zbytků proteinu funkčními skupinami nebo proteiny - fosforylace, acetylace, alkylace, glykosylace, ...).

U nádorových onemocnění často dochází k ovlivnění procesů regulace transkripce, což se projevuje nedostatečnou kontrolou buněčného cyklu. Regulace transkripce je realizována vazbou

proteinových **transkripčních faktorů** (aktivátorů nebo represorů) na regulační oblasti genu (např. promotory, zesilovače transkripce). V lidském genomu je kódováno přibližně 2,5 tisíce proteinů s DNA-vazebnou doménou, které mohou fungovat jako transkripční faktory.

V nádorových buňkách jsou transkripční faktory často mutovány nebo jinak změněny, mezi nejvýznamnější patří transkripční faktory ze skupiny **nádorových supresorů** (např. p53, Rb, PTEN, APC) a **onkogenů** (RAS, MYC, SRC, ABL). Tyto proteiny, vyskytující se v mutované formě u určitých typů nádorových buněk, se stávají vhodným cílem protinádorové terapie (např. fúzní protein Bcr/Abl u chronické myeloidní leukémie). Ke změně regulace transkripce také může docházet v důsledku chromozomových translokací a dalších přestaveb, které umožní vznik nefyziologických kombinací genů a regulačních sekvencí vedoucích k nekontrolované expresi. Významnými regulátory genové exprese jsou také **malé nekódující RNA** (zejména microRNA), které působí prostřednictvím specifické degradace mRNA cílových genů nebo ovlivněním procesu translace (6). Předpokládá se, že microRNA ovlivňují expresi třetiny lidských genů a jsou často aberantně exprimovány nebo mutovány u řady závažných onemocnění včetně nádorových (např. chronické lymfocytární leukémie, lymfomů, nádorů tlustého střeva).

2. Změny genetické informace

Autor: Šárka Pospíšilová

Genetická informace zakódovaná v nukleových kyselinách může být měněna vznikem mutací, které mohou vznikat buď spontánně, nebo jsou indukovány fyzikálními vlivy a chemickými látkami s mutagenním účinkem nebo vnitrobuněčnými procesy. Tyto mutace mohou vznikat v diploidních tělních buňkách (**mutace somatické**) nebo v haploidních buňkách zárodečné linie (**mutace gametické**), které jsou přenášeny na další generaci. Většina mutací má neutrální nebo negativní vliv na fenotyp, jsou však zdrojem genetické variability a mohou podílet na selekci v průběhu evolučního procesu.

Podle úrovně vzniku mutace dělíme na **genové**, které mění jednotlivé nukleotidy v řetězci nukleové kyseliny (Obr. 5), **chromozomové** (někdy nazývané chromozomové aberace), které mění strukturu chromozomů (Obr. 6), a **genomové**, tj. mutace měnící počet chromozomů (např. aneuploidie, polyploidie).

Genové mutace se mohou vyskytovat ve formě nukleotidových substitucí (Obr. 5), insercí, delecí nebo inverzí (záměna, vložení, odstranění nebo přehození nukleotidů). Míra důsledků těchto mutací pro nositele je velmi variabilní, velký význam zpravidla mají mutace posunové, kdy v důsledku inserce nebo delece 1 nebo 2 nukleotidů a jejich násobků dojde k posunu čtecího rámce a vzniku nefunkčního proteinu. Příkladem bodových mutací, které mohou významně ovlivnit život buňky i celého jedince, jsou mutace v antionkogenu TP53. Pokud vznikne gametická mutace v TP53 genu, dochází ke vzniku dědičného autozomálně-dominantního onemocnění nazývaného Li-Fraumeni syndrom, který se projevuje zvýšenou náchylností ke vzniku nádorových onemocnění v mladém věku. Somatické mutace v genu TP53 se vyskytují ve více než 50% lidských nádorových buněk a znamenají horší prognózu onemocnění a reakci na terapii.

Chromozomové mutace jsou strukturální aberace vzniklé v důsledku chromozomových zlomů a přestaveb. Rozlišujeme chromozomové aberace balancované, které zachovávají původní množství genetického materiálu, a nebalancované, u kterých dochází ke ztrátě nebo získání části chromozomu. Mezi nejčastější formy patří translokace, inserce a delece, inverze a vznik atypických chromozomů. Přítomnost chromozomových aberací může mít na buňku i jedince zásadní vliv - jsou častou příčinou vrozených vývojových vad a velmi často se nacházejí v nádorových buňkách (např. vznik Ph chromosomu translokací t(9;22) dává vznik fúznímu genu Bcr/Abl, který je příčinou chronické myeloidní leukémie – Obr. 6, 7, 8).

Genomové mutace se projevují numerickými změnami chromozomů. U člověka se vyskytují především aneuploidie, tedy změny počtu jednotlivých chromozomů (vzhledem k normálnímu diploidnímu počtu 46 chromozomů). Pokud jsou tyto změny dědičné, často se projevují letálně již během prenatalního vývoje, přežívají plody s trizomiemi chromozomů 21 (Downův syndrom), 18 (Edwardsův syndrom) a 13 (Patauův syndrom) a numerickými změnami pohlavních chromozomů (45,X Turnerův syndrom, XXY Klinefelterův syndrom, syndromy XXX, XYY...).

Vzhledem ke kontinuální expozici jedinců spontánní i indukované mutageny a dalším vlivům (u lidských buněk nastává řádově 10^{-8} změn na nukleotid a generaci) může denně vzniknout v každé buňce člověka až milion poškození DNA. Aby se tato poškození nepřenášela do dalších generací buněk, jsou rozpoznávána **reparačními systémy buňky**, které zajistí opravu poškozené DNA, případně navodí programovanou buněčnou smrt. Odpovědi na poškození DNA se účastní řada faktorů, převážně enzymů, které mohou vzniklé poškození DNA buď opravit, nebo odstranit. U

člověka se nejčastěji uplatňují opravy prostřednictvím vyštěpení chybné báze nebo celého nukleotidu, opravy chybného párování nebo opravy pomocí rekombinace řetězců DNA. Přestože tyto mechanismy opraví většinu vzniklých poškození, část mutací opravným mechanismům unikne a může se stát příčinou patologického fenotypu buňky.

Cytogenetické vyšetření

Autor: Petr Kuglík

Cytogenetika je samostatné odvětví genetiky, které s použitím specifických metod dokáže sledovat změny genomu na úrovni chromozomů. Nádorová cytogenetika se zabývá studiem získaných chromozomových odchylek nádorových buněk. Historie nádorové cytogenetiky začíná rokem 1914, kdy T. Boveri formuloval teorii, ve které považuje chromozomové změny v nádorových buňkách za změny odpovědné za maligní zvrát. Tato teorie se později stává základem mutační teorie vzniku nádoru. Skutečným začátkem nádorové cytogenetiky je objev první specifické chromozomové změny, kdy v roce 1960 Nowel a Hungenford našli malý atypický chromozom a nazvali ho podle místa objevu **Philadelphský chromozom (Ph)** u nemocných s chronickou myeloidní leukemií. Teprve v roce 1973 pomocí G-pruhování bylo zjištěno, že tento malý chromozom vzniká přestavbou mezi chromozomy 9 a 22. Dnes na základě molekulárně genetických vyšetření víme, že při translokaci $t(9;22)(q34;q11)$ vzniká fúzní gen **BCR/ABL**, jehož produktem je **chimerický protein**, který je hlavní příčinou tohoto onemocnění (Obr. 7, 8). Od objevu Ph chromozomu bylo postupně nashromážděno mnoho poznatků dokazujících, že získané chromozomové změny, které se vyskytují u onkologických onemocnění, jsou integrální součástí procesu maligní transformace buněk. Doposud byly shromážděny cytogenetické nálezy zahrnující charakteristické početní i strukturní chromozomové abnormality z více než 56 000 nádorových onemocnění, které lze nalézt na internetu v „**Databázi chromozomových aberací u nádorů**“, založené a vedené profesorem Mitelmanem. Více než dvě třetiny z nich jsou změny chromozomů nalezené u pacientů s hematologickými malignitami. Cytogenetická a molekulárně cytogenetická vyšetření hematologických malignit tak mají stále větší význam, neboť slouží k charakterizaci biologických a klinických vlastností těchto onemocnění pro účely upřesnění diagnózy, stanovení prognózy, volby způsobu terapie či

kontrole účinnosti léčby.

Metody klasické cytogenetiky: G - pruhování

Klasické cytogenetické vyšetření je založeno na mikroskopické analýze metafázích chromozomů – hodnotíme strukturu a počet chromozomů. Konečným produktem vždy **karyotyp**. Podmínkou cytogenetického vyšetření je v každém případě dostatečné množství biologického materiálu.

Vyšetřujeme-li karyotyp hematologických malignit, zdrojem materiálu je nejčastěji kostní dřev. Odběr materiálu (1-3 ml kostní dřevě) je prováděn sterilně do připravené zkumavky s obsahem malého množství (0,5 ml) **heparinu**. Zachování sterility při odběru a použití heparinu jsou naprosto zásadní podmínky, protože se jedná o metodu kultivační. Kultivace probíhá v různých kultivačních médiích, nejčastěji *RPMI* v termostatu při 37°C (může to být i *Panserin*, *Cytogen plus* atd. dle nabídky jednotlivých firem, ale se stejnou nutriční hodnotou). Výběr medií závisí na možnostech laboratoře a účelu kultivace. Po 24-hodinové kultivaci (ale i 2 hodiny nebo 48 hodin, podle typu vyšetření a diagnózy) nastává proces zpracování materiálu a **příprava preparátů**.

Nezbytným krokem celého postupu je využití schopnosti působení **kolchicinu** na funkci dělicího vřeténka tj. zastavení procesu buněčného dělení v metafázi. Následuje přidání **hypotonického roztoku** (0,075 M KCl na 10-20 minut), který umožní nabobtnání buňky, zvětšení jejího objemu a rozložení chromozomů v ekvatoriální rovině. Proces fixace buněk zahrnuje 3-4x opakované přidávání **fixačního roztoku** (metanol-kys. octová v poměru 3:1) vždy po odstředění a odsátí supernatantu. Vykapáním buněčné suspenze na předem odmaštěná a důkladně omytá podložní skla získáme cytogenetické preparáty vhodné pro další použití, tj. aplikaci různých barvicích metod, z nichž je nejrozšířenější tzv. G-pruhování. Vlastní G-pruhování chromozomů je založeno na působení proteolytického enzymu **trypsinu** a barvení barvivem **Giemsa-Romanowski**. Princip vzniku stabilních pruhů není dostatečně objasněn a kvalita takto nabarvených preparátů závisí na řadě laboratorních podmínek. Výhodou této cytogenetické metody je především získání stabilních preparátů vhodných k rutinnímu vyšetření s počtem pruhů cca 300-500 na buňku. Rozlišovací schopnost metody se pohybuje kolem 5–10 Mb.

Chromozomy barvené G-pruhovací technikou jsou snímány kamerou připojenou k mikroskopu a karyotyp hodnotíme pomocí počítačové analýzy obrazu. Nalezené odchylky chromozomů jsou popisovány podle mezinárodní nomenklatury ISCN.

Metody molekulární cytogenetiky

Klasická cytogenetická analýza umožňuje pomocí světelného mikroskopu studovat dělicí se buňky v mitóze a stanovit odchylky v počtu a struktuře chromozomů. Nevýhodou této techniky je ovšem skutečnost, že pro potřeby cytogenetických analýz je nutno získat a hodnotit dostatečný počet mitóz s dobře napruhovými chromozomy. Exaktnější identifikace chromozomových změn v karyotypu je možná pomocí metod **molekulární cytogenetiky**, které se intenzivně rozvíjejí od počátku 80. let. Většina konvenčních cytogenetických vyšetření v hematologii bývá proto doplněna vyšetřením **metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)**, která napomáhá zpřesnit cytogenetický výsledek.

Molekulární cytogenetika využívá moderní poznatky molekulární biologie a její metody pro studium struktury, vlastností či poruch chromozomů. Pro lidskou cytogenetiku je z molekulárně biologických metod nejvýznamnější **hybridizace *in situ***. Ta umožňuje zviditelnit sekvence nukleových kyselin přímo na mikroskopických preparátech obsahující morfologicky zachovalé chromozomy, jádra či tkáňové řezy. Molekulární hybridizace *in situ* je založena na použití značené jednořetězcové hybridizační **sondy**, tj. krátkého úseku DNA. Tato sonda se v důsledku komplementarity bází může po denaturaci vázat k cílové sekvenci DNA buněk nacházejících se na mikroskopickém skle. Podle místa, kam DNA sondy hybridizují, je rozdělujeme na **centromerické, celochromozomové a genově specifické**. V současné době se nejčastěji používají sondy přibližně 200-300 kb velké, které jsou konjugovány s některými z fluorochromů (např. SpectrumGreen, SpectrumOrange), a proto se tato technika označuje v praxi jako fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Místa, kam se sonda navázala, můžeme poté identifikovat za použití fluorescenčního mikroskopu. Počet a poloha jednotlivých **fluorescenčních signálů** nás potom informuje o možných početních i strukturních změnách chromozomů. Podle počtu cílových sekvencí, které lze simultánně detekovat na jednom preparátu, rozlišujeme **jednobarevnou** či **vícobarevnou** fluorescenční *in situ* hybridizaci. Velkým přínosem techniky FISH je zejména **cytogenetika interfáze**, která umožňuje pomocí DNA sond odhalovat početní i strukturní odchylky chromozomů v nedělicích se jádrech. To má velký význam při studiu chromozomových změn v buňkách, jež se dlouho či nespolehlivě dělí nebo které je obtížné vykultivovat. Cytogenetika interfáze tak pomohla překonat největší úskalí klasické cytogenetiky – nutnost dostatečného počtu mitóz.

Z praktického hlediska zahrnuje hybridizace sond nukleových kyselin s preparáty chromozomů

tyto obecné kroky: **a) fixaci materiálu a zhotovení kvalitního preparátu** obsahující cílové místo (metafázní chromozomy, interfázní jádra, tkáňové preparáty, celé buňky); **b) přípravu a značení DNA sond** – ve většině případů získáváme DNA sondy značené příslušnými fluorochromy přímo od výrobce. Většina sond bývá dodávána v koncentrované formě, takže se před použitím musí naředit v příslušném hybridizačním pufru; **c) denaturaci sondy a cílového místa** - DNA sonda i cílová DNA musí být před hybridizací denaturovány. Denaturace cílové DNA na mikroskopických preparátech se provádí krátkou inkubací v horkém formamidovém roztoku (70 % formamid); **d) hybridizační reakci mezi sondou a cílovým místem**. Hybridizace závisí na schopnosti denaturované DNA se teplotně renaturovat s komplementárními řetězci DNA. Vlastní hybridizace obvykle probíhá ve vlhké komůrce při teplotách 37 – 42 °C a v závislosti na typu použitých DNA sond se mohou doby hybridizace pohybovat v rozmezí několika hodin až dnů; **e) odmytí** – tj. odstranění nenavázané či nespecificky vázané sondy; **f) barvení pozadí** – barvení pozadí se provádí fluorochromem, jehož emisní spektrum je odlišné od spektra fluorochromu použitého při značení DNA sondy. V praxi se nejčastěji používá barvivo DAPI (4',6- diamidin-2-phenylindol); **g) vyhodnocení a dokumentaci** (mikroskopické pozorování, snímání obrazu a počítačové zpracování fluorescenčních signálů).

V dnešní době jsou neustále vyvíjeny a zdokonalovány nové postupy a modifikace techniky FISH, které umožňují analyzovat celý genom a hledat změny v počtu a lokalizaci genů či DNA sekvencí a expresi genů v jednom hybridizačním pokusu. Na těchto technikách se spolu s pokroky molekulární biologie stále více podílejí i počítačové analyzátory obrazu vybavené speciálními programy pro cytogenetiku. K těmto metodám patří např. **komparativní genomová hybridizace (CGH)**, která umožňuje detekovat relativní počet kopií jednotlivých sekvencí mezi různými genomy nebo modernější **array-CGH**. Při této technice nevyšetřujeme chromozomy, ale DNA testovaných buněk či tkání, abychom dle intenzity fluorescence na normálních chromozomech po kohybridizaci značené vyšetřované a kontrolní DNA posoudili ztráty či zisky sekvencí DNA na všech chromozomech. Při tomto vyšetření je možné analyzovat v nádorovém genomu až tisíce genů najednou. Obdobně se intenzivně rozvíjejí i techniky, které dovolují barevně odlišit každý chromozomový pár v lidském karyotypu (**mnohobarevná fluorescenční hybridizace *in situ* – mFISH, spektrální karyotypování – SKY**), event. barevně odlišit jednotlivé pruhy na chromozomech (**mBAND – mnohobarevné pruhování**). Tyto nové metody umožňují mnohem detailnější analýzy jednotlivých strukturních chromozomových změn typu

delecí, amplifikací, translokací, inverzí a inzercí a tím podstatně zvyšují význam cytogenetiky jako moderní diagnostické metody v oblasti hematologických malignit.

Citovaná a doporučená literatura:

1. Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W. et al.: The sequence of the human genome. *Science*, 2001, 291, s. 1304-1351.
2. Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B. et al. - International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001, 409 (6822), s. 860-921.
3. Levy, S., Sutton, G., Ng, P.C., et al.: The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol.*, 2007, 5 (10), s. 254-286.
4. Wheeler, D.A., Srinivasan, M., Egholm, M., et al.: The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature*, 2008, 452 (7189), s. 872-877.
5. Pospíšilová Š., Tichý B., Mayer J.: Sekvenování lidského genomu – technologie nové generace. *Časopis lékařů českých*, 2009, 148(7): s. 296-302.
6. Pospíšilová Š., Malinová K., Mráz M., Mayer J.: MicroRNA – malé molekuly s velkým významem (nejen) u hematologických malignit. *Transfuze a hematol. dnes*, 2008, 14, s. 180-187.
7. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: *Molecular Biology of the Cell* (5th edition, 2008), Garland Science, Taylor and Francis Group.
8. Snustad D.P., Peter - Simmons M.J.: *Genetika* (1. vyd. Brno, Masarykova univerzita, 2009),
9. Michalová, K.: *Úvod do lidské cytogenetiky*, IDVPZ Brno, 1999.

Seznam obrázků:

Obr. 1: Člověk – buňky – chromozomy – DNA

Obr. 2: Typy DNA sekvencí v lidském genomu

Obr. 3: Schéma složeného genu

Obr. 4: Základní procesy genové exprese a její regulace

Obr. 5: Základní typy genových mutací v DNA (mutace nesmyslná, tichá, měnící smysl)

Obr. 6: Schéma vzniku Philadelphského chromozomu translokací t(9;22)

Obr. 7: Karyotyp pacienta s CML translokací t(9;22)(q34;q11)

Obr. 8: Detekce Ph chromozomu v interfázních jádrech kostní dřeně pomocí techniky FISH