

# CYTOGENETIKA

## základní pojmy

vytvořilo CMBG FN Brno

zpracovala Mgr. Navaříková

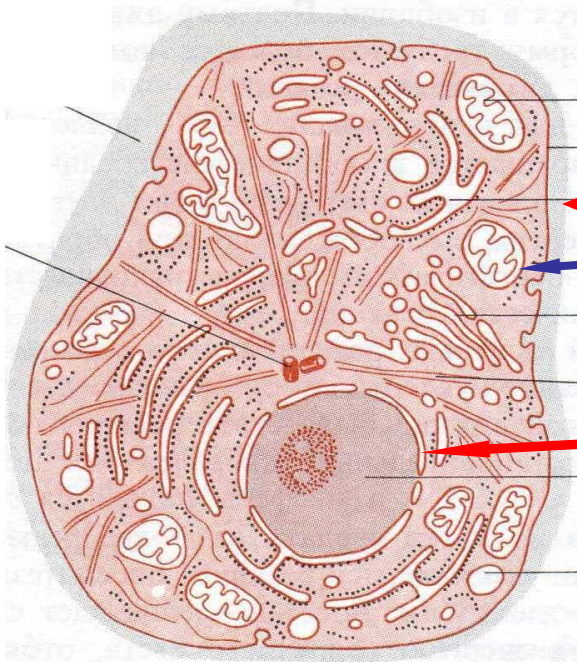


# DEFINICE A HISTORIE

- **klinická cytogenetika** se zabývá analýzou **chromosomů** (jejich počtem a morfologií), jejich segregací v meióze a mitóze a vztahem mezi nálezy chromosomových abnormalit 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  
(DNA v mitochondriích)

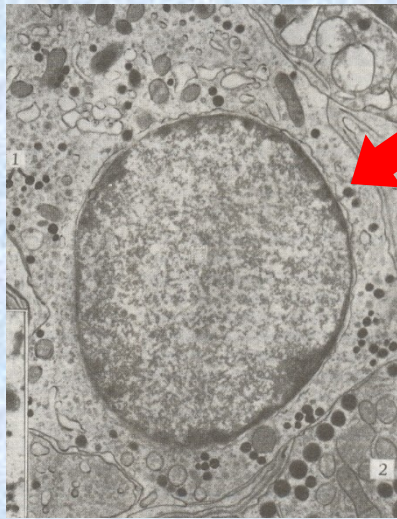
**buněčné jádro**  
(DNA + proteiny + RNA)

klinická **cytogenetika** se zabývá  
analýzou **chromosomů**, které  
vznikají spiralizací molekul DNA  
lokalizovaných **v buněčném jádře**



# ZMĚNA ORGANIZACE GENETICKÉHO MATERIÁLU BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU SOMATICKÝCH BUNĚK

chromosomy vznikají při buněčném dělení



DNA rozptýlená v buněčném jádře  
(interfáze)



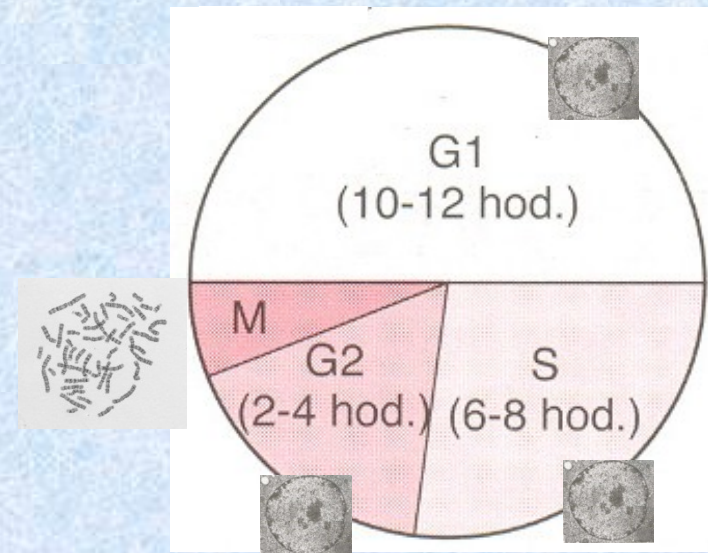
chromosomy = spiralizované molekuly DNA  
počet chromosomů člověka = 46  
(mitóza)



# GENETICKÝ MATERIÁL JÁDRA BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU

Buněčný cyklus **somatických** buněk (interfáze, mitóza, cytokineze)

- **G1, S, G2 fáze = INTERFÁZE**  
nejdelší fáze buněčného cyklu,  
chromatin je **málo kondenzovaný**  
(různé stupně spiralizace)
- **M fáze = MITÓZA + cytokineze**  
dělení jádra a následně buňky -  
**kondenzace chromatinu,**  
**vznik chromosomů,** rozchod  
chromosomů do dceřiných buněk



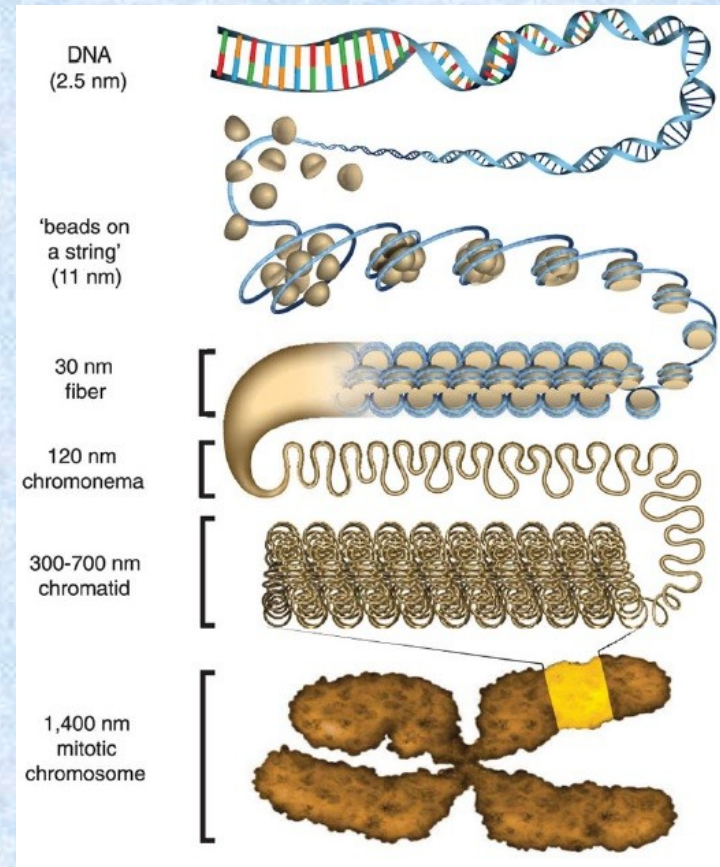
Spiralizované chromosomy v metafázi mitózy vyšetřujeme ve světelném mikroskopu.



# 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**)



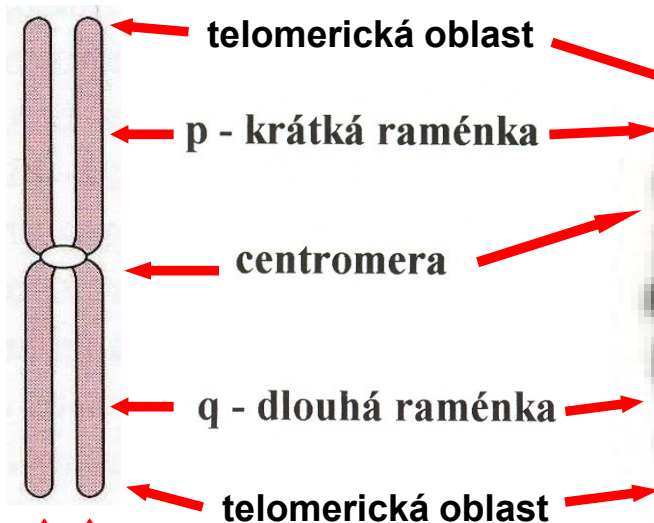
Ou H.D. et.al: ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. Science. 2017 July 28; 357(6349): . doi:10.1126/science.aag0025.

Hierarchical chromatin-folding model.



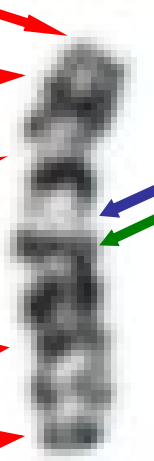
# CHROMOSOMY V PRAXI

schema chromosomu

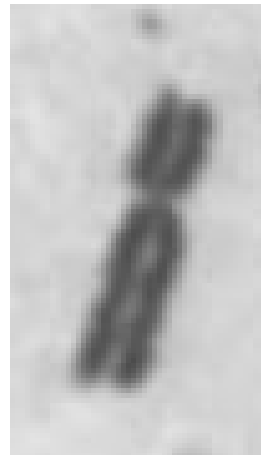


↑ ↑  
sesterské chromatidy  
(identické kopie)

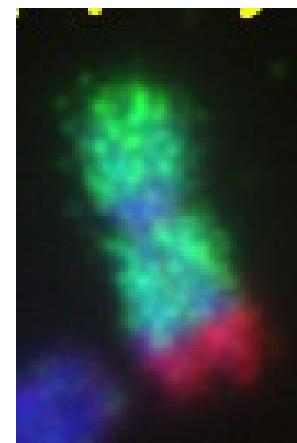
chromosom s G- pruhy



chromosom  
konvenčně barvený



chromosom  
metoda FISH



metafázní chromosom – součástí jsou 2 sesterské chromatidy



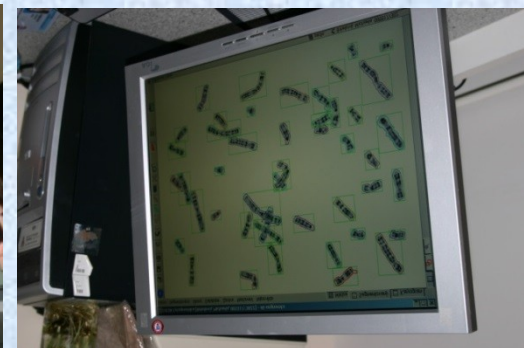
# CHROMOSOM

- **centromera** = heterochromatinová oblast, místo rozdělení krátkých a dlouhých ramének, místo spojení sesterských chromatid, místo tvorby kinetochorů v meióze a mitóze, (primární konstrikce, zaškrvení)
- **telomera** = specifická DNA sekvence na koncích každého chromosomu (každé chromatidy, dvoušroubovice DNA), která zajišťuje integritu chromosomu během buněčného dělení (repetitivní hexamer (TTAGGG)<sub>n</sub>) v komplexu s proteiny





# Světelný mikroskop + systém analýzy obrazu



Chromosomy hodnotíme ve **světelném mikroskopu** při zvětšení 1000x – 1250x za použití imerzních objektivů. Při vyšetření je preparát prosvěcován viditelným světlem.

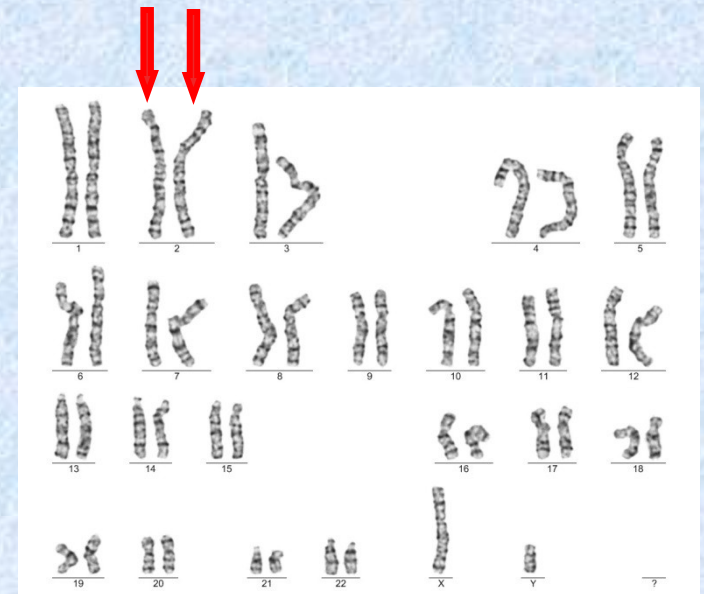
Dokumentaci mitózy a třídění chromosomů, sestavení obrázku – karyogramu provádíme v dokumentačním systému (Lucia, Laboratory Imaging, s r.o.)



# CHROMOSOMY - KARYOTYP

- **karyotyp** = **soubor chromosomů** v somatických buňkách pacienta, který po zhodnocení minimálně 10 mitóz získaných z vyšetřované tkáně charakterizujeme **zápisem** a doplňujeme **karyogramem** (obrázkem vytvořeným z nasnímaných chromosomů z jedné mitózy, které jsou utříděné do párů a skupin). Zápis karyotypu pacienta souhrnně vyjadřuje karyotyp všech zhodnocených mitóz v jeho vyšetřované tkáni. V zápisu označujeme **počet chromosomů**, **pohlavní chromosomy** a případné **patologické změny** (zápis karyotypu pacienta, jehož karyogram je vpravo, je **46,XY**)
- normální lidský karyotyp se skládá ze **46 chromosomů**, z toho je **22 párů autosomů** (nepohlavních chromosomů) a **2 gonosomy** (pohlavní chromosomy)

chromosomový pár  
(homologní chromosomy)



obrázek karyotypu - karyogram  
= utříděný a zhodnocený soubor  
chromosomů jedné buňky



# ZÁPIS KARYOTYPU

46,XX - normální ženský karyotyp

46,XY - normální mužský karyotyp

počet chromosomů v buňkách pacienta

typ pohlavních chromosomů



# KARYOTYP

## normální mužský karyotyp

### 46,XY



# KARYOTYP

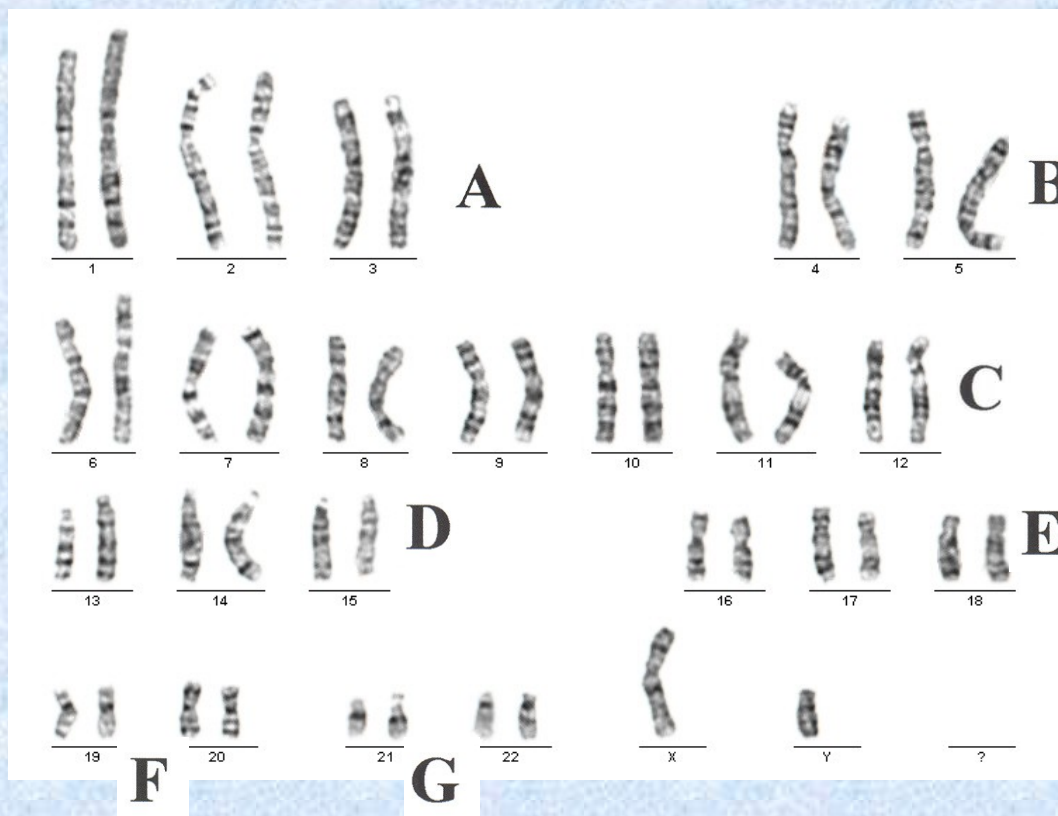
## normální ženský karyotyp

### 46,XX



# CHROMOSOMY - třídění do skupin

podle velikosti a centromerického indexu  
normální mužský karyotyp 46, XY



**Centromerický index (CI)** – na základě této veličiny dělíme lidské chromosomy na metacentrické, submetacentrické a akrocentrické.

CI se vypočítá jako poměr délky krátkých ramen chromosomu (p) vůči délce celého chromosomu (součtu délek krátkého a dlouhého raménka p+q)

$$CI = p/(p+q)$$

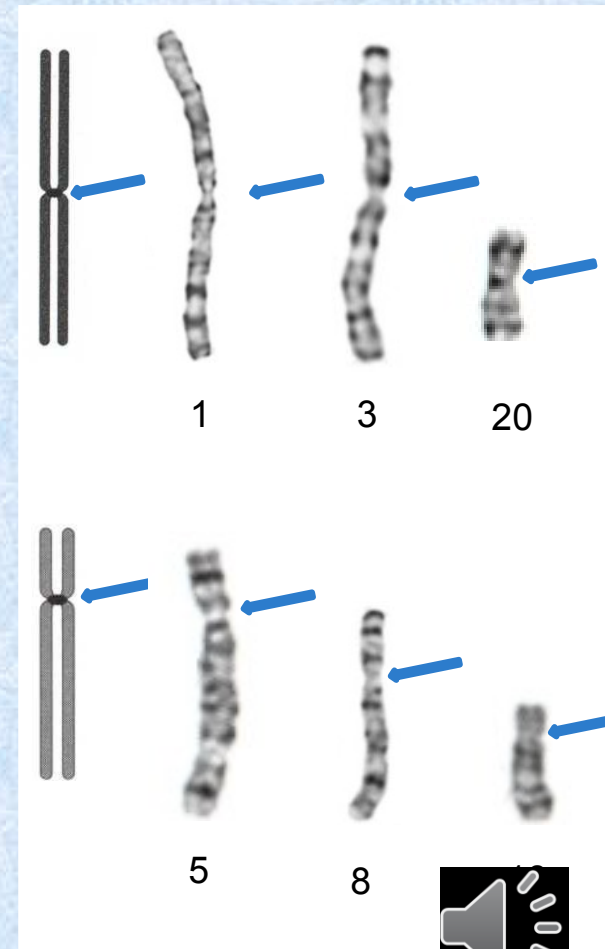


Pohlavní chromosomy: Chromosom X řadíme do **skupiny C**, chromosom Y do **skupiny G**

# CHROMOSOMY - třídění podle umístění centromery (centromerického indexu CI)

- **metacentrické chromosomy**  
centromera blízko středu chromosomu  
nebo uprostřed, krátká a dlouhá raménka  
jsou přibližně stejně dlouhá
- **submetacentrické chromosomy**  
centromera mimo střed chromosomu, p a  
q raménka jsou jasně délkově odlišena

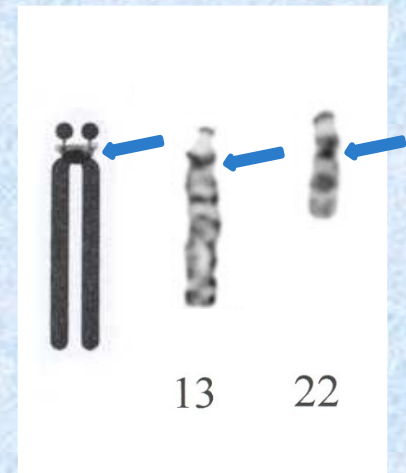
Poloha centromery označena modrou šipkou



# CHROMOSOMY - třídění podle umístění centromery (centromerického indexu CI)

- **akrocentrické chromosomy** - centromera je umístěna velmi blízko jednomu konci chromosomu, ale není úplně na konci, chromosom nese krátká i dlouhá raménka

1) Pro chromosomy 13, 14, 15, 21, 22 platí:  
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 NOR  
nucleolus organizer region)



Poloha centromery označena modrou šipkou

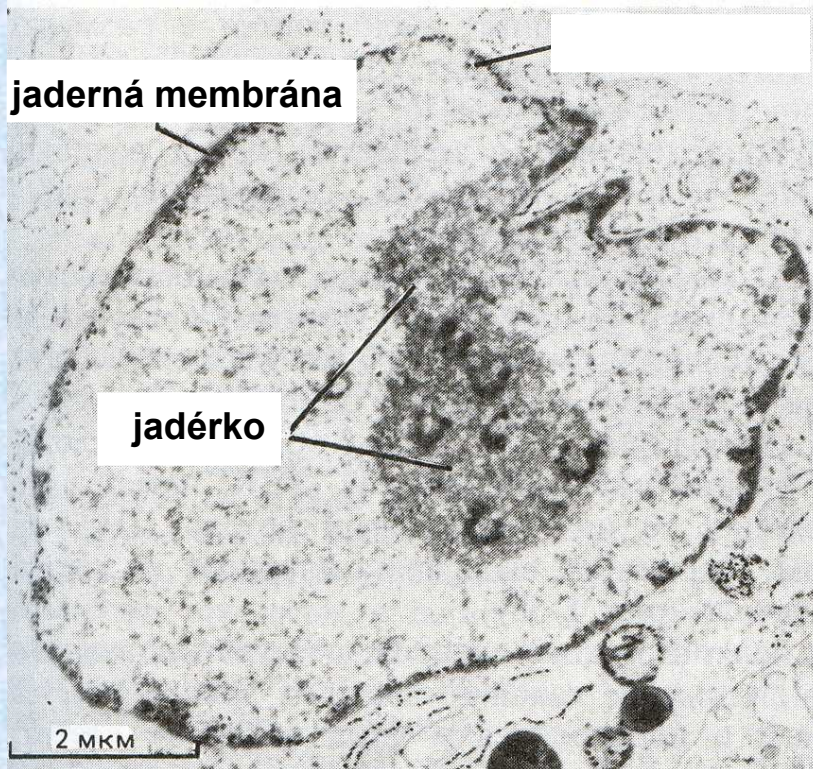
2) K akrocentrickým chromosomům řadíme na základě centromerického indexu i chromosom Y, i když narozdíl od chromosomů 13, 14, 15, 21, 22 nenese na krátkých raménkách satelity



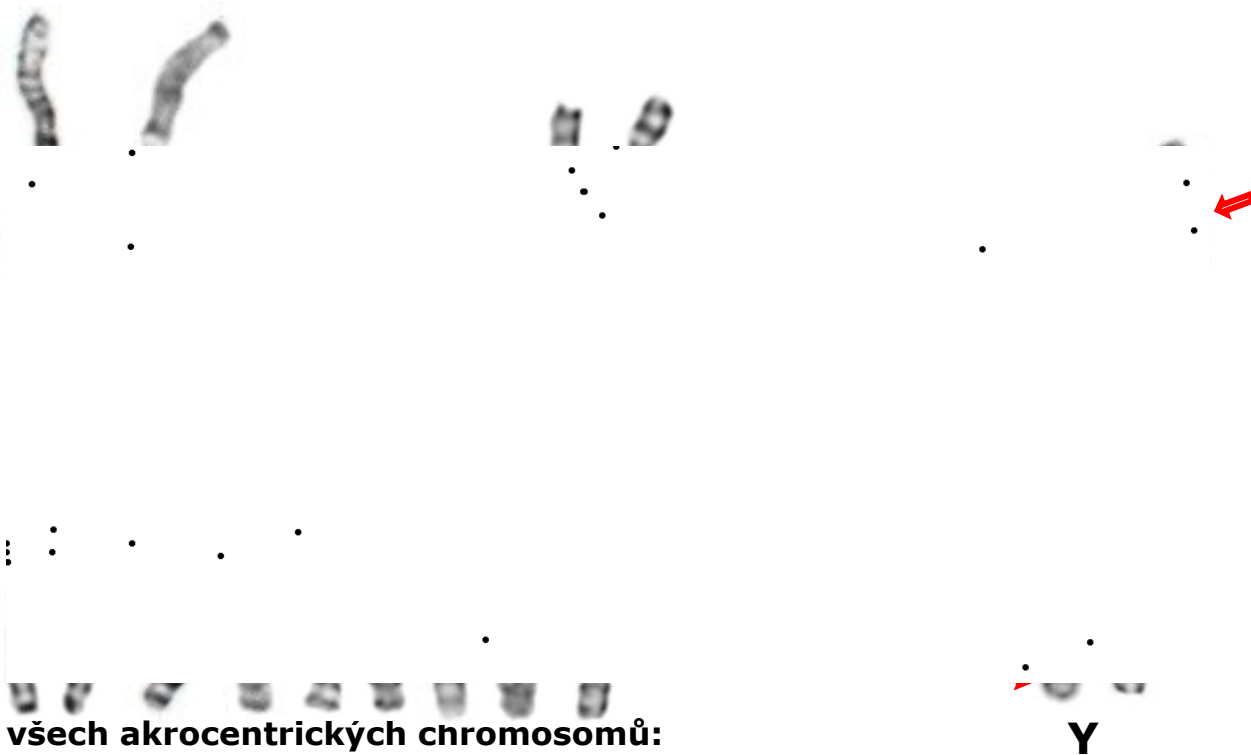


# JADÉRKO

- difuzní struktura v jádře, která není ohraničena membránou
- dochází v ní k syntéze podjednotek ribosomů (ribosomy – bílkovinné struktury, které se účastní syntézy bílkovin v cytoplazmě) – geny pro syntézu lokalizovány v oblasti sekundární konstriktce akrocentrických chromosomů
- **je přítomno v interfázním jádře, mizí v mitóze**



# VARIANTY NORMY – není patologie!

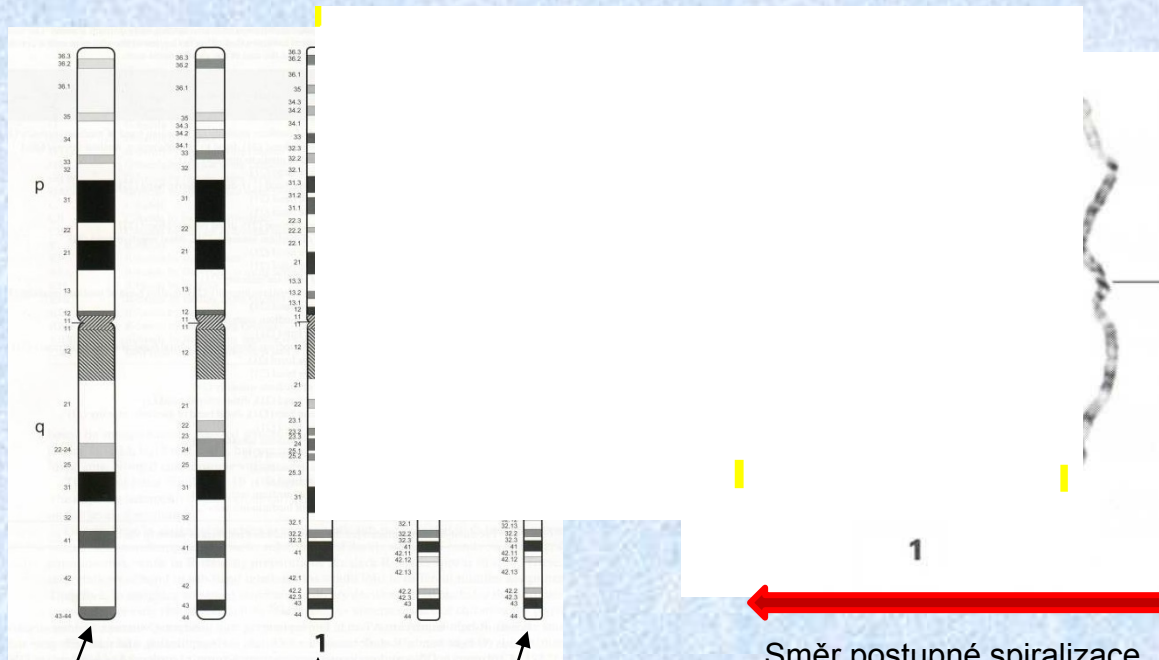


U všech akrocentrických chromosomů:  
**13,14,15,21,22**

**Y**



# Spiralizace chromosomů v mitóze



400 pruhů

550 pruhů

850 pruhů

v haploidní sadě chromosomů  
(bphs – bands per haploid set)

IDIOGRAMY pro chromosom 1

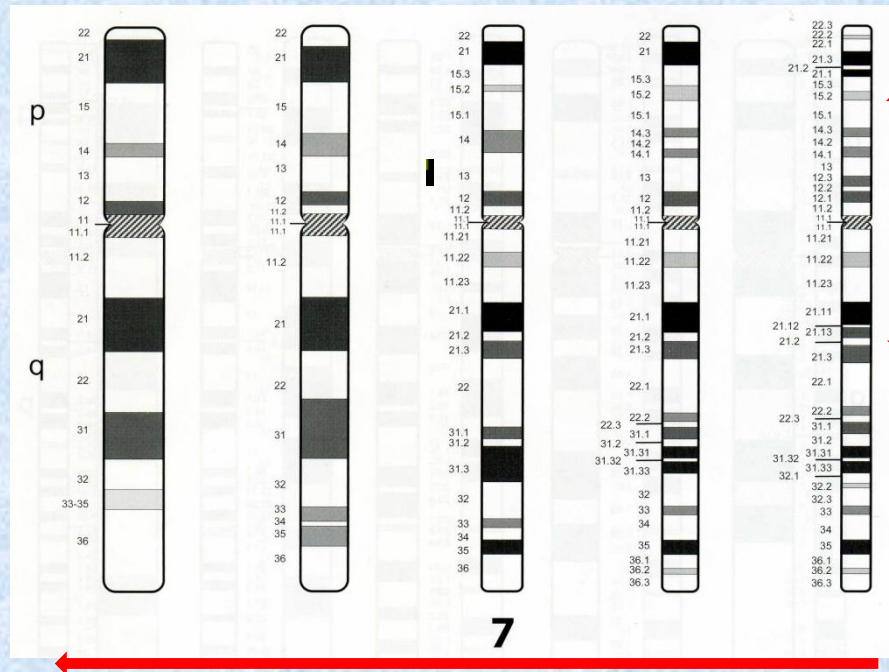
Směr postupné spiralizace  
chromosomů během mitózy



# IDIODRAMY

## číslování pruhů na chromosomech

- pruhu na každém raménku jsou očíslovány vzestupně od centromery k telomeře
- s postupnou kondenzací chromosomu během mitózy se zmenšuje počet pruhů
- číslo pruhu umožňuje jednoznačnou identifikaci každého pruhu



Směr číslování pruhů  
(od centromery k telomeře)



# Kritéria pro posouzení počtu pruhů v haploidní sadě chromosomů

Association for Clinical Cytogenetics  
GENERAL BEST PRACTICE GUIDELINES (2007) v1.02

## 1.2 TABLE 1. G- BANDING EVALUATION SCORE

At least three of the criteria to be obtained to apply banding scores 3-9

<b>0</b>	No banding
<b>1</b>	Identification of some chromosomes by morphology and major landmarks
<b>2 POOR</b> <300 band	Unequivocal identification of chromosomes due to major landmarks
<b>3</b> 300 band	2 dark bands on 8p (8p12 & 8p22) 3 dark bands on 10q (10q21, 10q23, 10q25) 20p12 visible 22q12 distinct
<b>4 MODERATE</b> 400 band	3 dark bands on mid-4q (q22-28) 3 dark bands mid-5q (5q14, 5q21, 5q23) 2 dark bands on 9p (9p21 & 9p23) 13q33 distinct
<b>5</b> 500 band	7q33 & 7q35 distinct 3 dark bands on 11p (11p12, 11p14, 11p15.4) 14q32.2 distinct 4 dark bands on 18q (18q12.1, 18q12.3, 18q21.2, 18q22)
<b>6 GOOD</b> 550 band	5q31.2 distinct 8p21.2 visible 2 dark bands on 11pter (11p15.2 & 11p15.4) 22q13.2 distinct
<b>7</b> 700 band	2p25.2 distinct 2q37.2 distinct 10q21.1 and 10q21.3 resolve 17q22-q24 resolves into 3 dark bands
<b>8 EXCELLENT</b> 850 band	4p15.31 & 4p15.33 distinct 5p15.32 distinct 11q24.1 and 11q24.3 distinct 19p13.12 and 19p13.2 distinct
<b>9</b> 900 band	11p14.1 visible 20p12.1 & 20p12.3 distinct 22q11.22 distinct 22q13.32 distinct
<b>10</b>	Banding Resolution higher than level 9 with additional bands to those seen at the 900bphs level (ISCN 2005)[3] seen consistently on both homologues.



# STANOVENÍ POČTU PRUHŮ V HAPLOIDNÍ SADĚ CHROMOSOMŮ

**bphs** –  
bands per haploid set

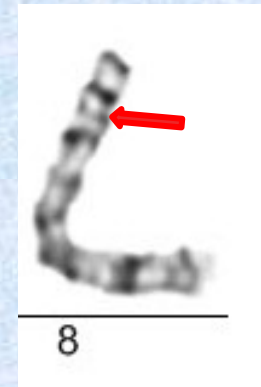
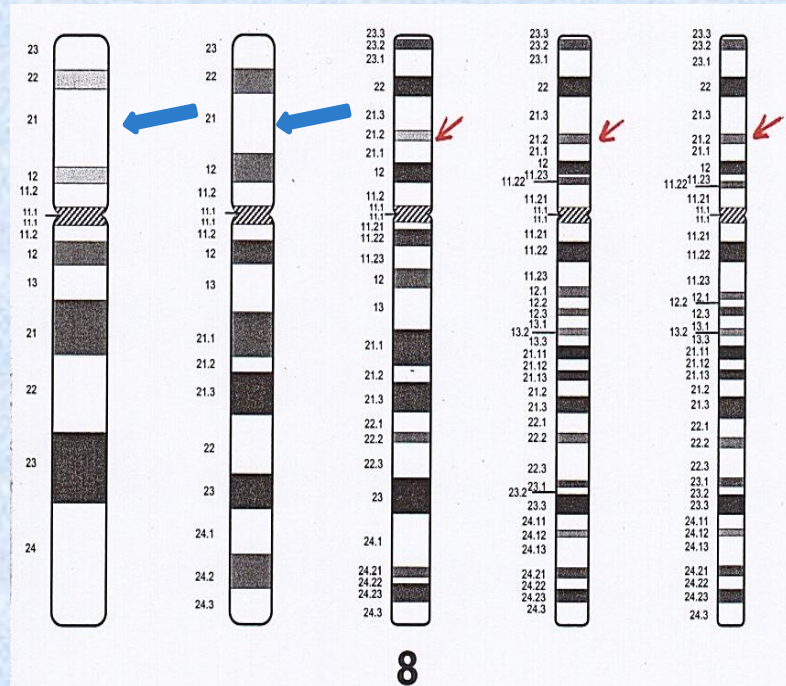
Při analýze karyotypu u pacientů je třeba pracovat s dostatečně dlouhými chromosomy aby mohly být odhaleny menší strukturní aberace, jejichž velikost je na hranici rozlišovací schopnosti metody G-pruhování chromosomů (5-10Mb). Chromosomy v mitóze by měly být tak dlouhé aby počet proužků v haploidní sadě chromosomů byl alespoň 550.

V praxi není možné počítat v každé mitóze všechny proužky na každém chromosomu, proto byl vypracován jiný systém pro posouzení délky chromosomů. Jestli naše mitóza, se kterou pracujeme, má alespoň 550 pruhů, zjistíme následujícím způsobem. Tabulka 1.2 na předchozí stránce zahrnuje výčet proužků na konkrétních chromosomech, které je třeba v preparátu vidět, aby bylo možné usuzovat na konkrétní délku chromosomů. Na následujících stránkách je patrné, že proužky, které jsou v tabulce uvedené jako rozlišovací pro délku 550 pruhů, nejsou patrné na kratších chromosomech.

Systém analýzy obrazu, program Lucia, počítá počet pruhů na chromosomech automaticky, ale tento počet je pouze orientační.



# Kritéria pro posouzení počtu pruhů v haploidní sadě chromosomů



Modrou šipkou označen světlý pruh p21 – nepřítomnost tmavého pruhu p21.2 na příliš krátkém chromosomu 8. Červenou šipkou je označen tmavý pruh p21.2, který je přítomen na dostatečně dlouhých chromosomech 8.



# TYPY CHROMOSOMOVÝCH ZMĚN, které lze laboratorně vyšetřit

- VYŠETŘENÍ **VROZENÝCH CHROMOSOMOVÝCH ZMĚN** – prenatální a postnatální vyšetření **konstitučního karyotypu**  
konstituční karyotyp se **nemění** v průběhu života pacienta
- VYŠETŘENÍ **ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ** (vznikajících v důsledku působení mutagenních faktorů prostředí na člověka) – postnatální vyšetření  
**% aberantních buněk**  
lze snížit % aberantních buněk na normu vitamínovou léčbou
- VYŠETŘENÍ **ZÍSKANÝCH CHROMOSOMOVÝCH ABNORMALIT** (u onkologických onemocnění)  
vyšetření z nádorové tkáně **karyotypu maligních klonů**  
(toto téma bude předmětem prezentace přednášejícího z onkocytogenetické laboratoře)





Kontakt pro dotazy: [Navarikova.Marta@fnbrno.cz](mailto:Navarikova.Marta@fnbrno.cz)