

# Poškození genomu na cytogenetické úrovni

***Detekce poškození chromosomů***

***Chromosomové aberace***

***Biologická dosimetrie***

***Bodové mutace***

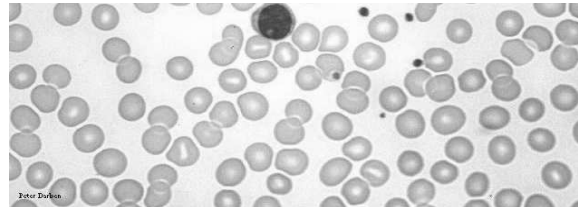
# Fixace a barvení buněk

Centrifuga



*Buňky se oddělí od média, fixují na mikroskopické sklíčko, barví se různým způsobem a prohlížejí se pod mikroskopem*

Mikroskopické sklíčko



Mikroskop



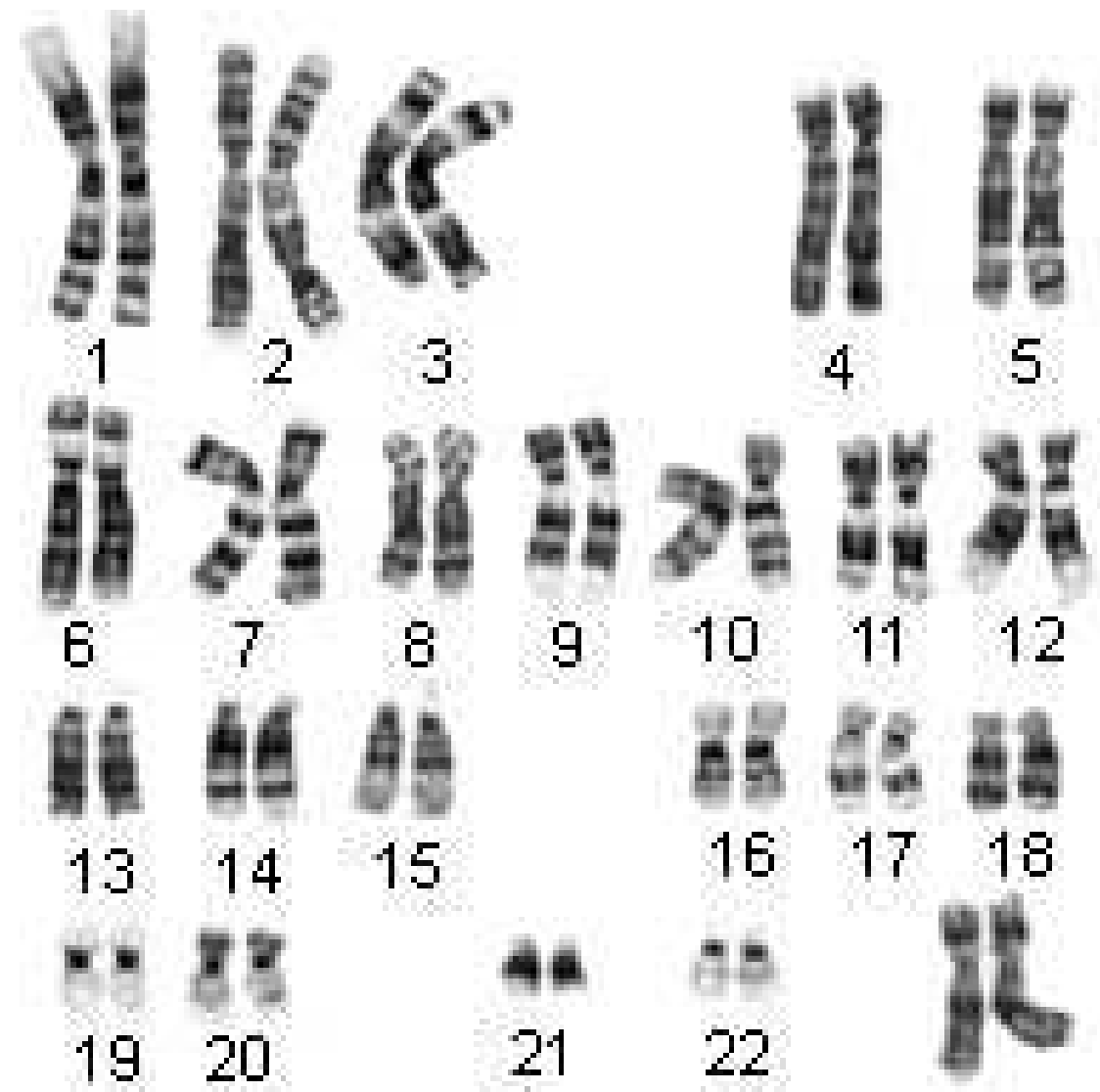
# Klasické barvení chromosomů mitotických chromosomů



# Karyotyp

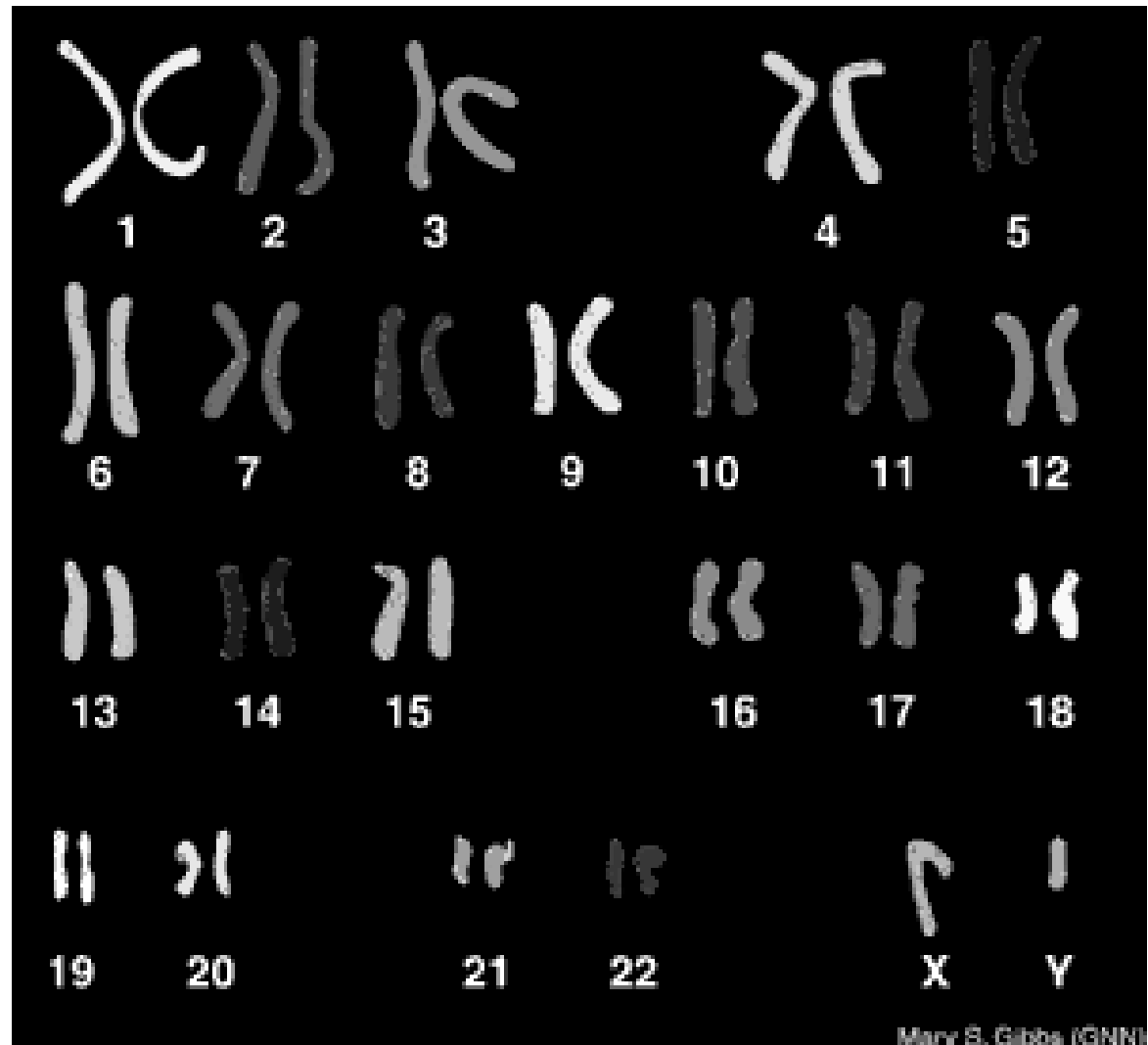
Karyotyp člověka sestává ze 46 chromosomů. Klasicky byl po dlouhou dobu studován pomocí pruhování barvivem Giemsou. Světlejší pruhy odpovídají euchromatinu tmavé heterochromatinu.

Chromosomy se dělí podle velikosti, podle polohy centromery a podle pruhů.

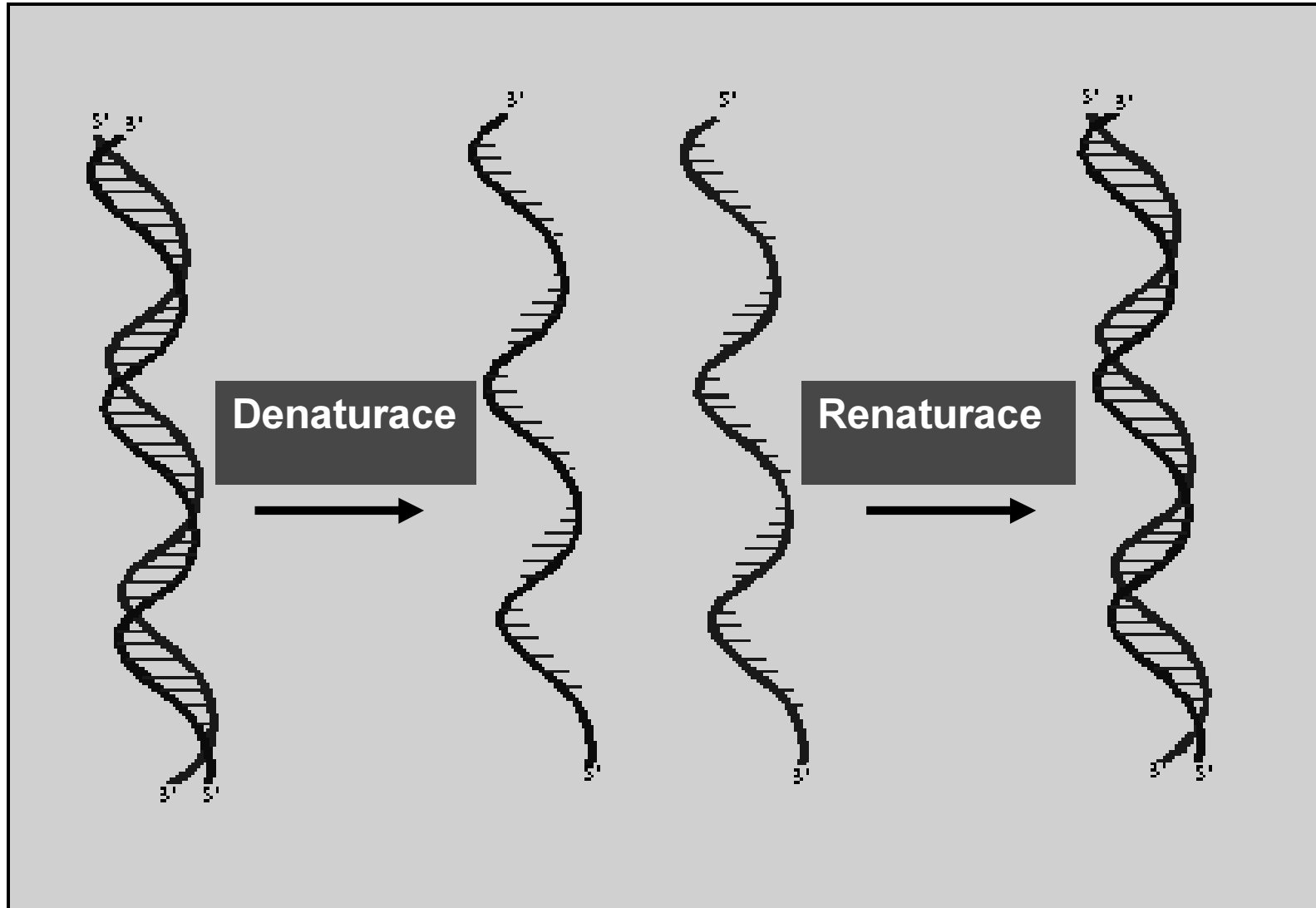


# Karyotyp

Karyotyp člověka sestává ze 46 chromosomů. Pomocí multicolor FISH techniky lze obarvit každý chromosom jinou barvou. Změny genomu lze pak snadno sledovat a detekovat každou aberaci.

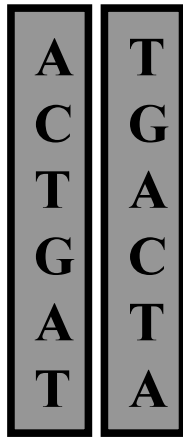


# Denaturate DNA



# Fluorescenční *in situ* Hybridizace (FISH)

Chromosomová DNA



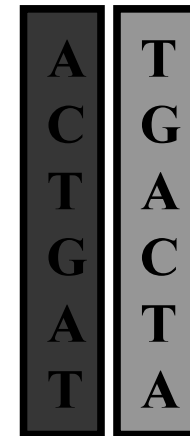
Denaturace



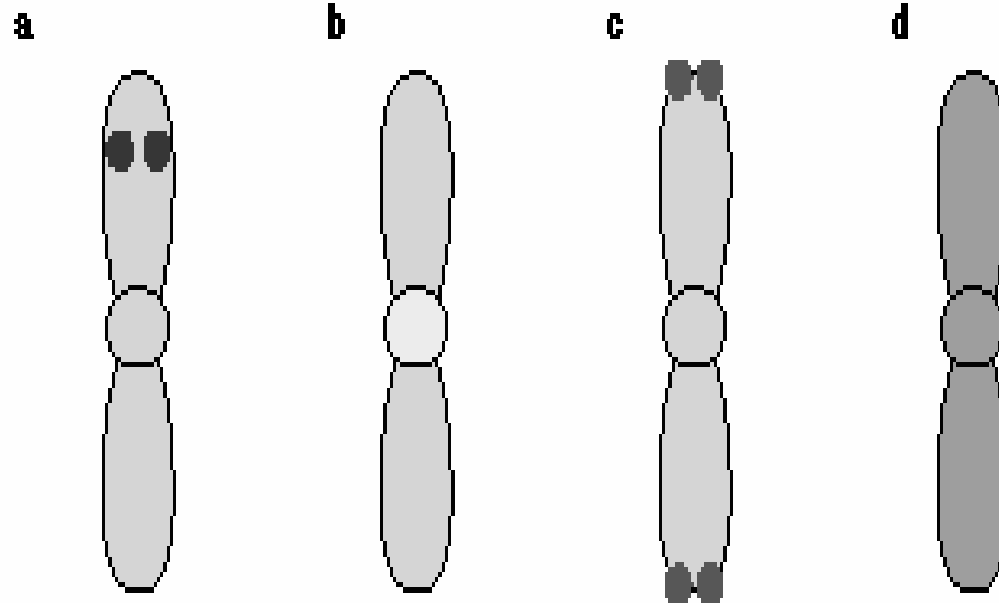
DNA proba (sonda)



Hybridizace



# Druhy sond pro FISH



- a) Sondy specifické pro určité geny (sekvence)
- b) Sondy specifické pro repetitivní sekvence v okolí centromer
- c) Sondy specifické pro telomery
- d) "Paintingové" sondy pro celé chromosomy



# Chromosomální aberace

**Numerické aberace:**

**Lidský genom obsahuje 46 chromosomů, 22 párů autosomů a 1 pár pohlavních chromosomů buď XX nebo XY. Euploidní sada chromosomů jich má 23.**

**Polyploidie je pojem, který se vztahuje k násobku euploidního počtu. U člověka je diploidní sada 46 chromosomů, triploidní 69 atd. Polyploidie vzniká v důsledku poruch meiozy apod. Vede ke smrti jedince.**

**Aneuploidie je jakýkoliv počet chromosomů, který není násobkem euploidní sady. Monosomie – je přítomný pouze 1 chromosom z dvojice. Člověk s monosomií by měl 45 chromosomů. Trisomie – jsou přítomny 3 chromosomy určitého typu, u člověka – 47 chromosomů. Všechny autosomální monosomie a trisomie s výjimkou trisomi 13, 18 a 21 vedou ke spontánním potratům. Uvedené trisomie mají za následek těžké poškození organismu (deformity končetin, nervového systému, srdce a mentální retardaci). Trisomie 13 a 18 vede ke smrti brzo po narození. Trisomie 21 je jediná autosomální trisomie, při níž se člověk dožívá dospělého věku. Pravděpodobnost trisomie silně závisí na věku matky – pro 20-letou je četnost 0.05%, pro více než 40 letou je to 3%.**

# Chromosomální aberace

**Numerické aberace:**

**Aneuploidie pohlavních chromosomů jsou čtenější, monosomie X je slučitelná s životem.**

**Monosomie X – Turnerův syndrom – malý vzrůst, záhyby kůže na krku, nedostatečný sexuální vývoj, vyvíjí se recesivní onemocnění vázaná na X chromosom, neboť chybí druhá kopie X chromosomu, která by maskovala účinek chybných alel přítomných v genech.**

**XXY – Klinefelterův syndrom – muži s nedostatečným sexuálním vývojem, sníženým intelektem. Počet X chromosomů může být i větší – nemoc je pak výraznější.**

**XYY syndrom – tento karyotyp byl objeven u vězňů. Výskyt je asi 0.1% v normální populaci, ale u vězňů je to 4.5 %. U tohoto onemocnění pozorujeme sklon k násilí, nižší intelekt.**

**XXX syndrom – klinicky normální, vyšší četnost mentálních retardací a sterility. Více X chromosomů – výraznější manifestace onemocnění.**

# Chromosomální aberace

**Strukturální aberace:** důsledek zlomu a následného špatného spojení nebo ztráty fragmentu – může nastat spontánně při replikaci a může být indukovaná chemicky, ionizujícím zářením a UV zářením. Důsledky vzniku aberace závisí na tom, jak je rozsáhlá, kde na chromosomu a kde ve tkáni vznikne.

**Inverse – rotace** zlomeného chromosomového fragmentu a spojení v obrácené poloze

**Duplikace –** chromosomální segment je opakován

**Translokace –** transfer části chromosomu na nehomologní jiný chromosom.

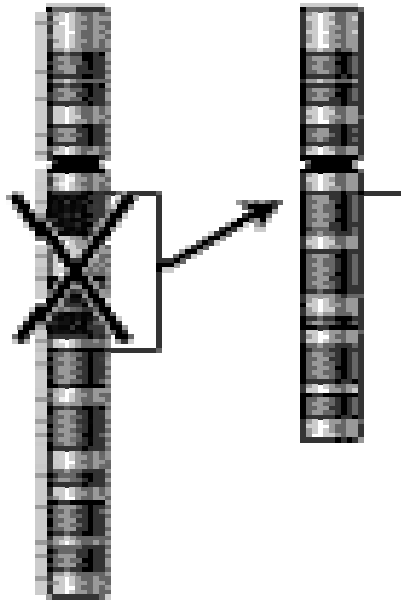
**Reciproká translokace –** bez ztráty genetického materiálu (může a nemusí mít fenotypický projev), může se přenášet z generace na generaci. V meioze může dojít k duplikacím nebo delecím, což vede ke spontánním potratům.

**Robertsonová translokace –** zlom krátkých ramínek dvou chromosomů s následným spojením velkých ramínek a ztrátou fragmentů malých. U chromosomů 14 a 21 - Downův syndrom

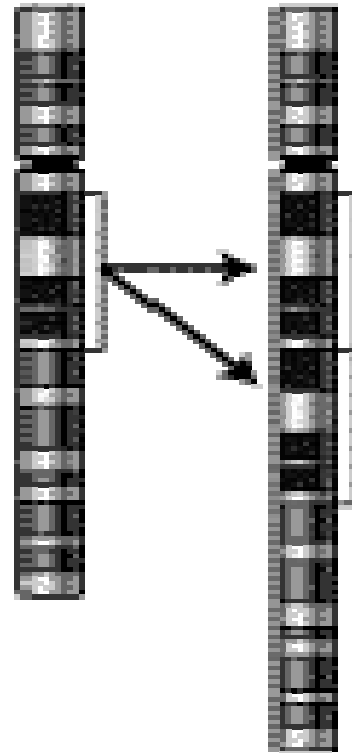
**Delece –** segment chromosomu je ztracen. Pouze malé delece jsou tolerovány (Cri-du-chat syndrom – delece malé části chromosomu 5)

## Types of mutation

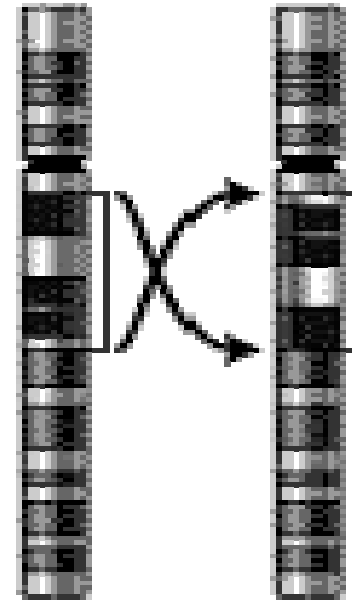
Deletion



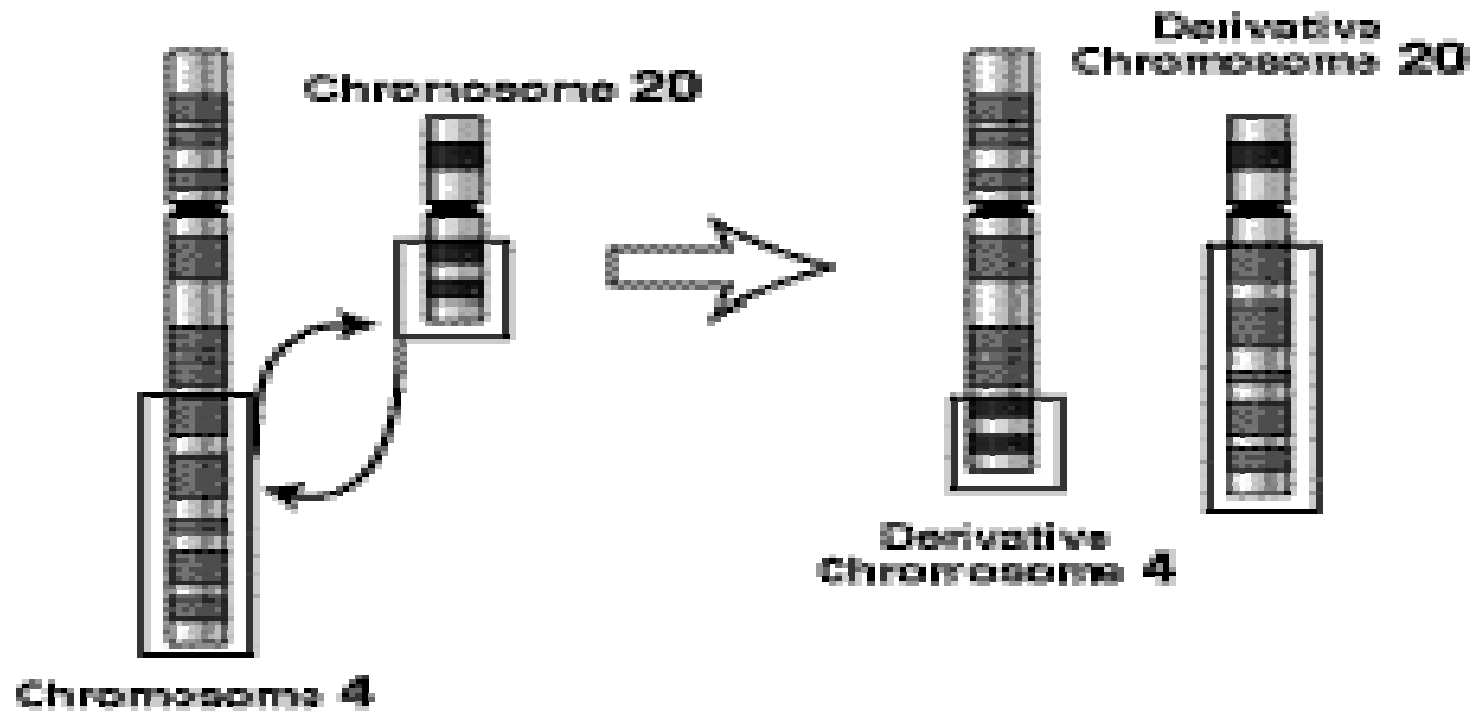
Duplication

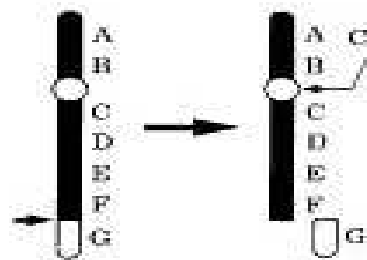


Inversion

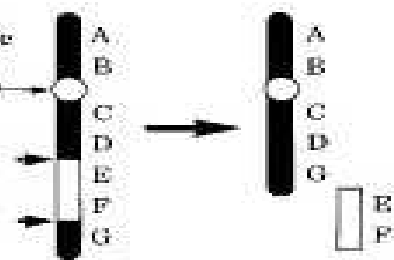


# Translocation

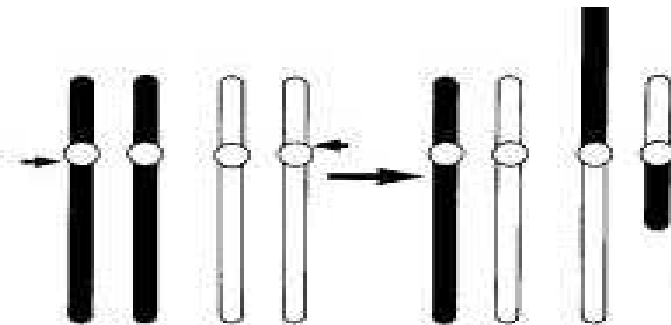




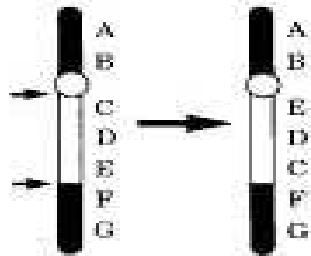
Terminal deletion



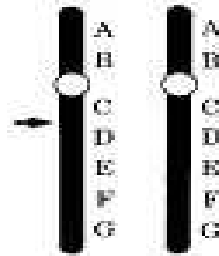
Interstitial deletion



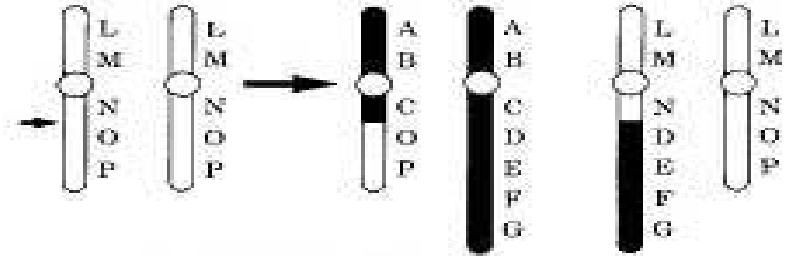
Robertsonian translocation



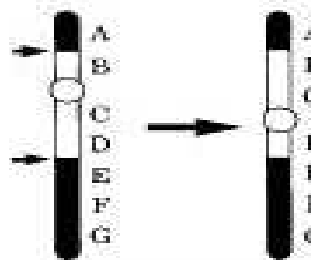
Paracentric inversion



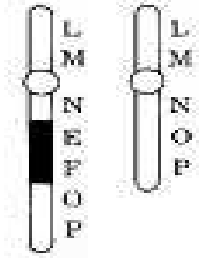
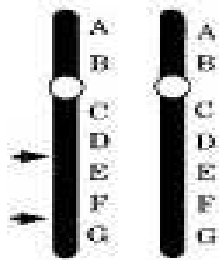
Reciprocal translocation



Insertion



Pericentric inversion



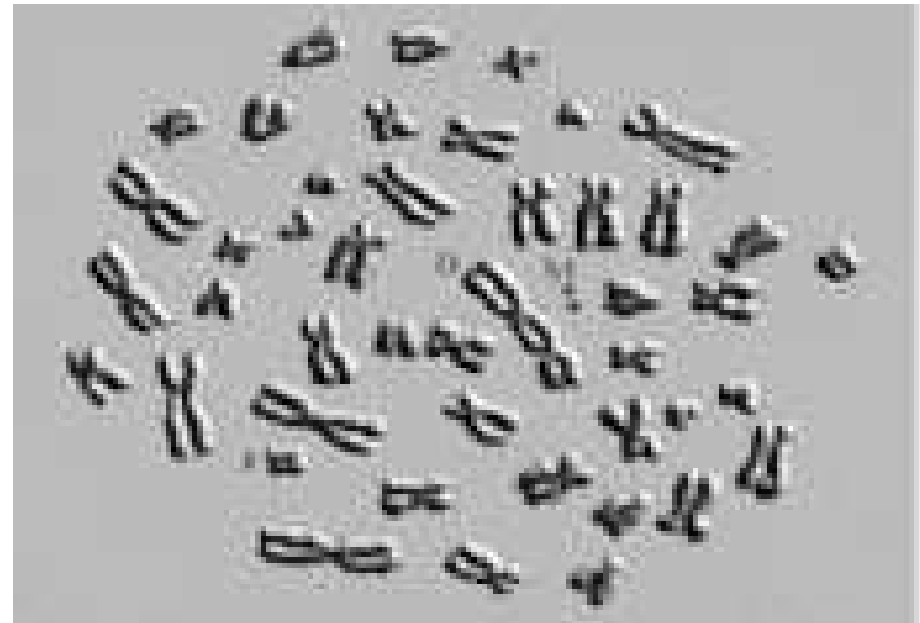
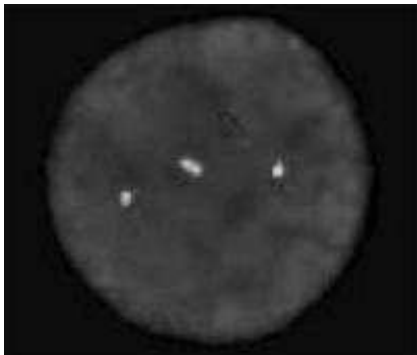
# Vznik aberací

**Detekce aberací (standardní experiment):**

- 1) izolace lymfocytů (odběr od donora, centrifugace a separace na ficolu, příprava na ozařování)**
- 2) resuspendování do média, stimulace k dělení, kultivace 48-72 h, zastavení cyklu colcemidem, hypotonický roztok, fixace kyselinou octovou a metanolem, kapání na vymražené sklíčko, BUdR – lze odlišit první mitózu (světlá a tmavá část chromatidy)**
- 3) barvení (Giemsa nebo FISH) pozorování pod mikroskopem, vyhledání mitóz a jejich vyhodnocení**

**Na obrázku je příklad aberace typické pro záření – dicentrik se dvěma páry fragmentů.**

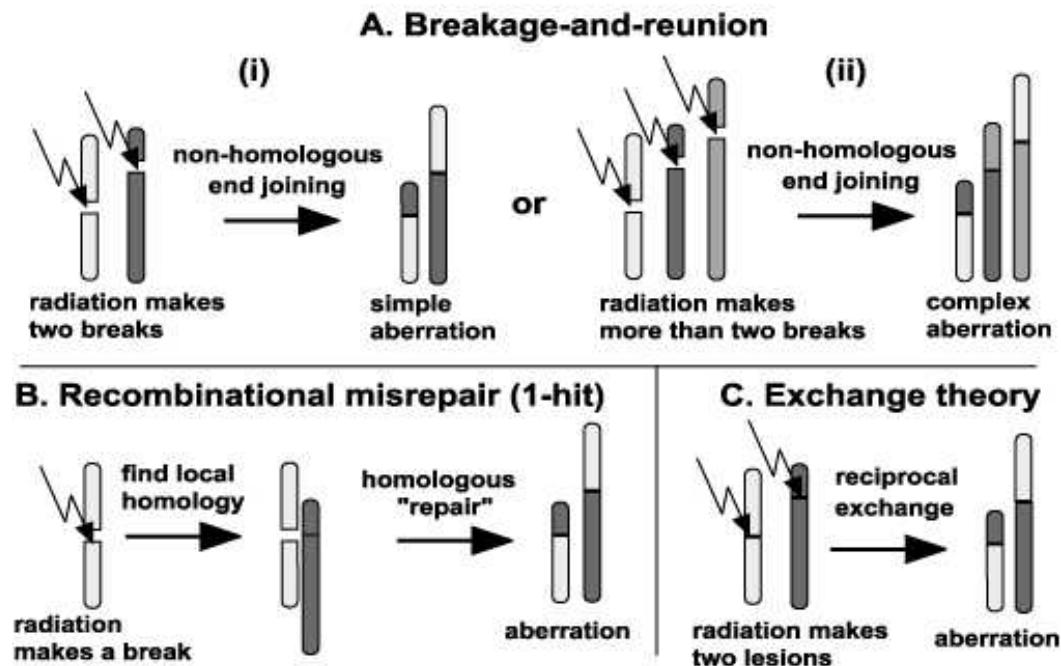
**Dole – translokace v interfázi.**



# Vznik aberací

Mechanismy vzniku výměn.

- 1) NHEJ – nehomologní spojení konců DSB
- 2) Rekombinační chybná reparace
- 3) Ze dvou poškození (nemusí to být DSB) vznikne rekombinační reparací výměnná aberace

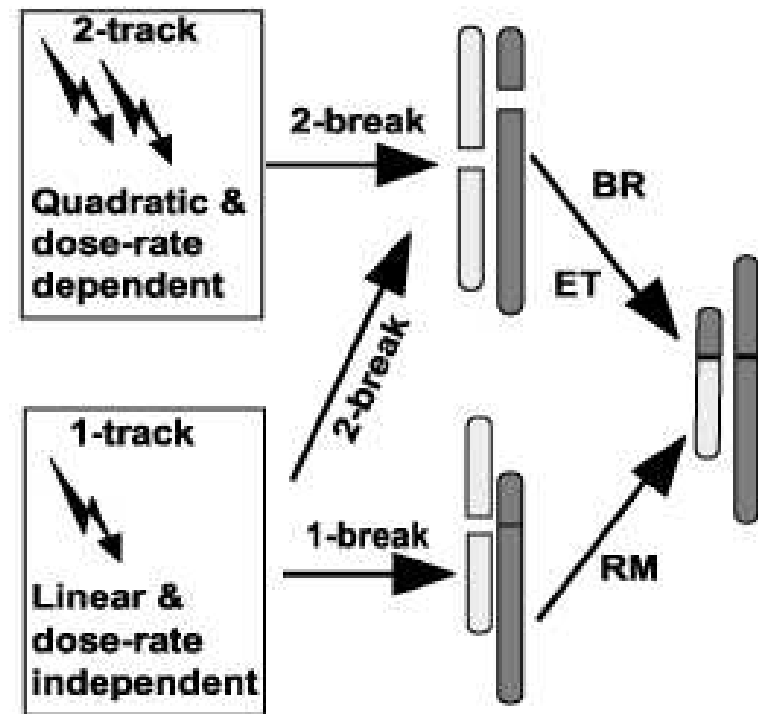
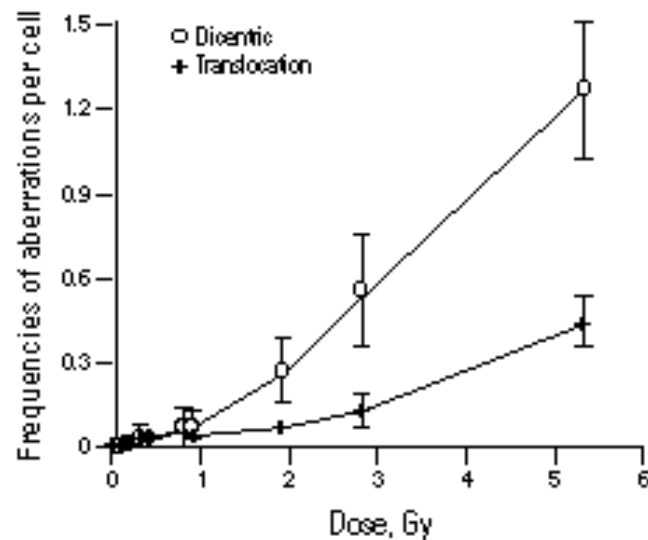




# Vznik aberací

Dávkové závislosti. Pro mechanismy 1 a 3 dostáváme kvadratické závislosti na dávce, pro mechanismus 2 dostaneme lineární závislost. Dávkové závislosti se dají popsat lineárně-kvadratickou funkcí

$$X = \alpha D + \beta D^2$$

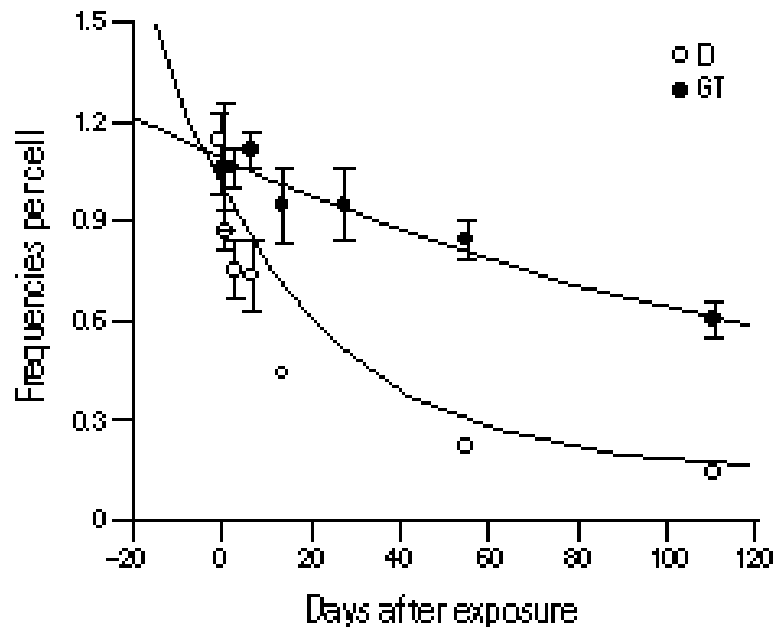


# Vznik aberací

**Kinetika vzniku a dávkové závislosti vzniku chromosomálních aberací:**

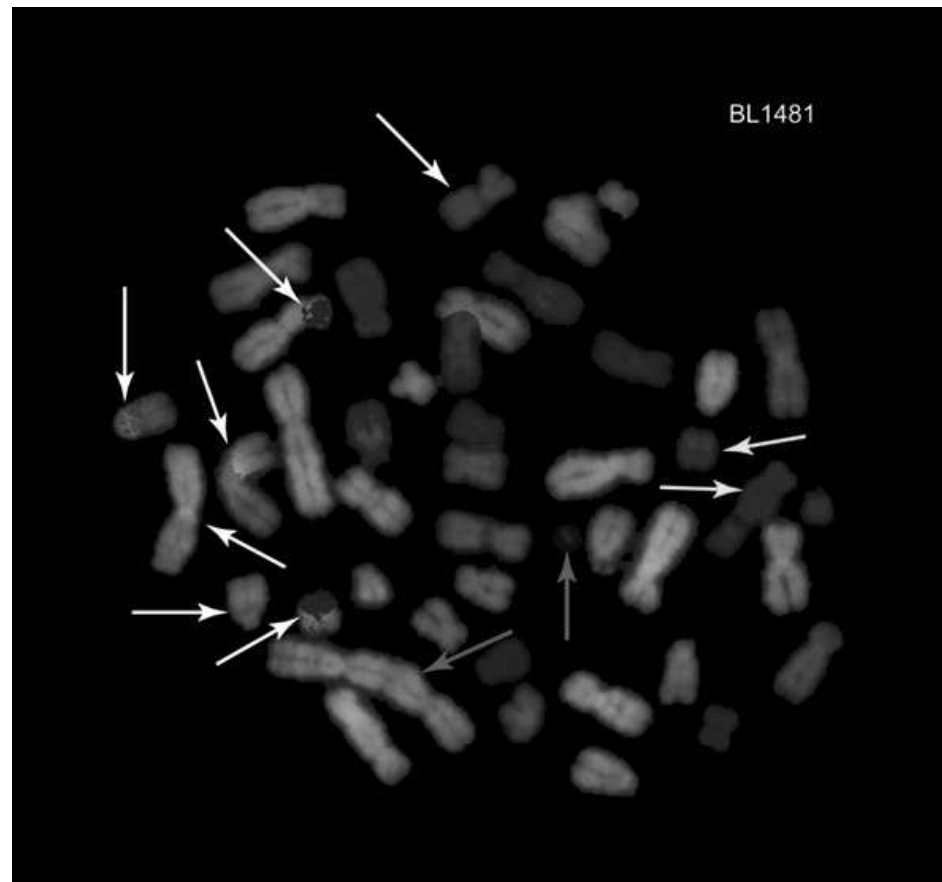
**aberace vznikají velmi krátce po působení mutagenu, což lze prokázat PCC technikou. Tato technika spočívá ve fúzi mitotické buňky s G1-buňkou, v níž chromosomy předčasně zkondenzují.**

**Aberace v lymfocytech v krvi s časem mizí. Pokles počtu dicentriků je daleko rychlejší než pokles počtu translokací.**



# Vznik aberací

**Komplexní přestavby. Často vznikají velmi komplexní přestavby chromosomů. Dříve je nebylo možné pozorovat, nyní se dají zachytit pomocí FISH techniky. Tyto změny nejsou slučitelné s dalším životem buňky.**

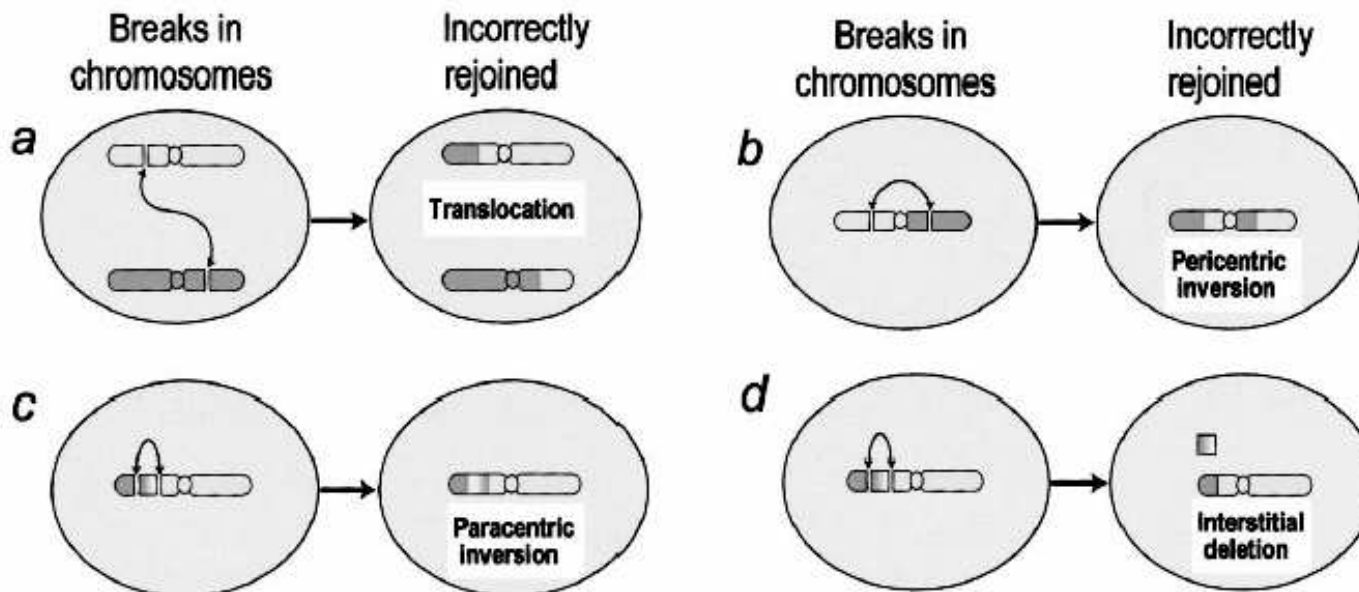


# Vznik stabilních aberací

Intrachromosomální aberace. Multicolor FISH se dá použít pro bandování uvnitř chromosomů (dříve se nedalo). Bylo zjištěno, že radiace zanechává dlouhodobě změny v podobě stabilních intrachromosomálních aberací.

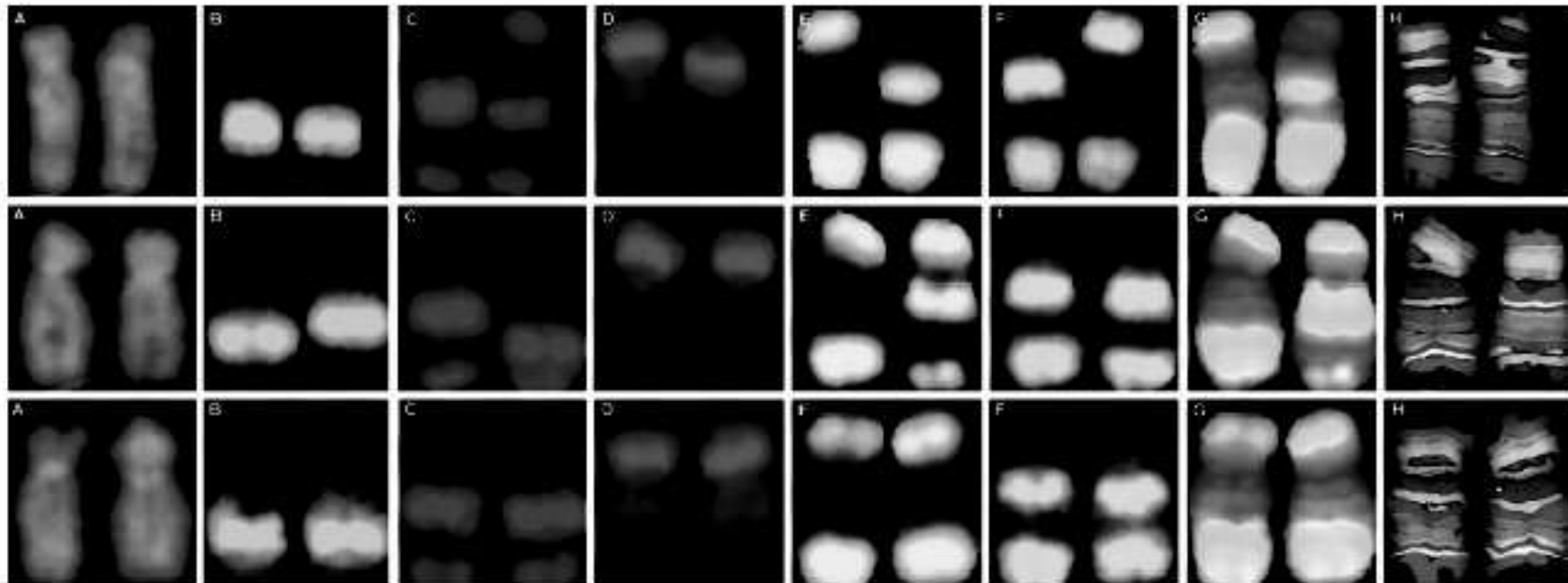
Pracovníci ozáření před mnoha lety při práci s plutoniem mají v krvi aberace v lymfocytech – více než polovina lymfocytů nese přestavby (>6 Mb). Počty těchto přestaveb koreluje s dávkou na kostní dřeň.

Tyto aberace lze registrovat po dlouhé době, mají nízké pozadí a metoda má velkou citlivost.



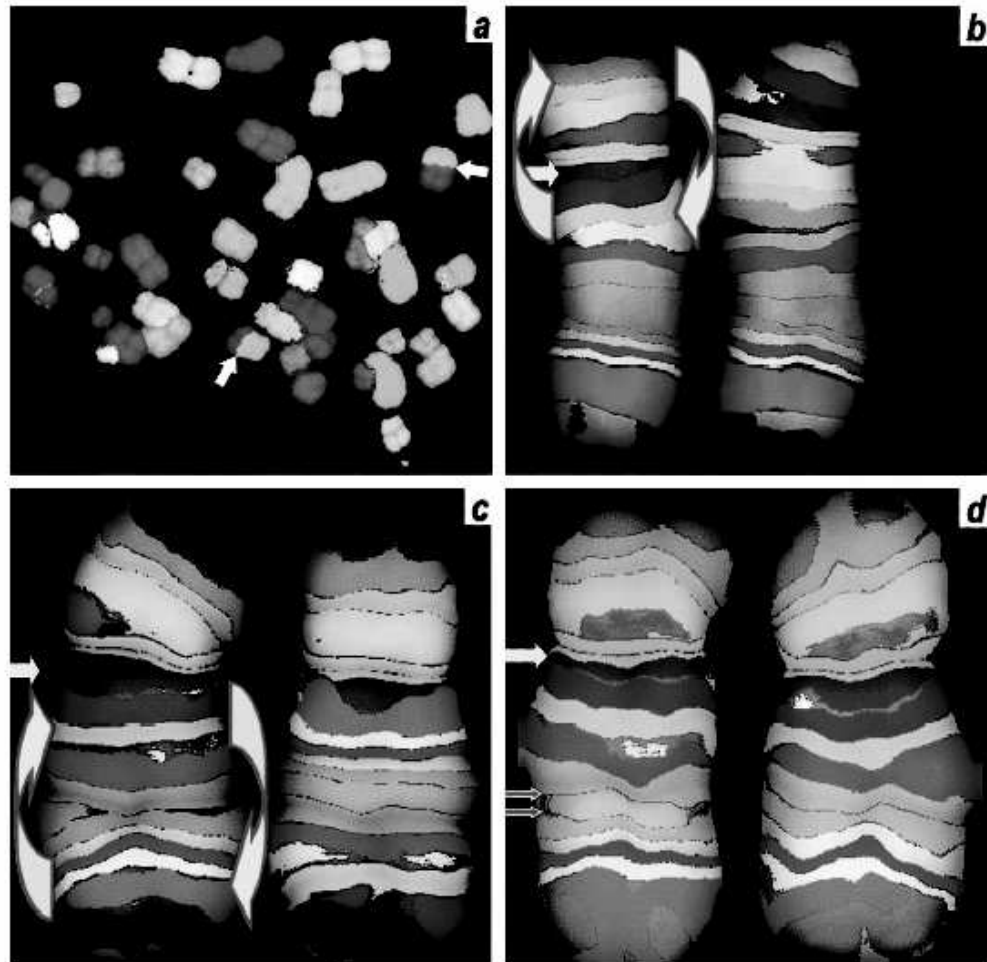
# Vznik aberací

Multicolor FISH se dá použít pro bandování uvnitř chromosomů. Na obrázku je použito 6 fluorochromů (DAPI, FITC, Gold, Texas Red, Cy5 a Aqua). Složený obraz se dále analyzuje tak, aby jednotlivé oblasti byly lépe rozlišitelné (přiřazují se pseudobarvy).



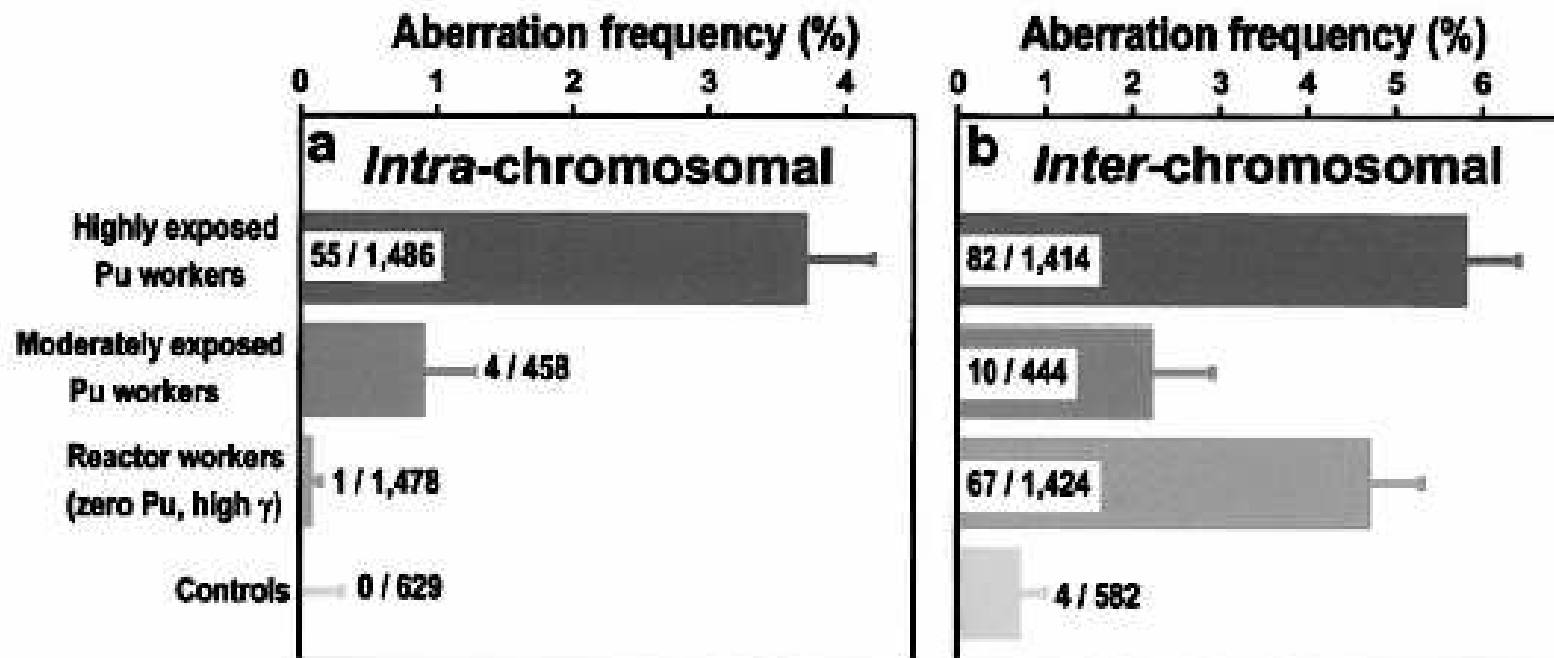
# Vznik aberací po ozáření

Multicolor FISH u pracovníků s plutoniem (Majak). V krvi byla detekována komplexní přestavba spočívající v inter- a současně intrachromosomální výměně. U řady těchto pracovníků došlo ke vzniku nádorů na plicích nebo kostí, tento pracovník byl relativně zdravý.



# Vznik aberací

Intra- a interchromosomální aberace. Pracovníci s Pu nesou v krvi intra-chromosomové přestavby, zatímco pracovníci  $\gamma$ -zářením nesou interchromosomové přestavby. Vidíme, že v kontrole prakticky nejsou detekovány intra-chromosomové přestavby.



# **Biologická dosimetrie mutagenů**

**Biologická dosimetrie – cytogenetická analýza lymfocytů – od počátku 70. let používána, standardizována – existují kalibrační křivky počtu dicentriků na dávce. Předpokládá se souvislost s nádory. Aberace jsou indukovány širokým spektrem jiných klastogenů.**

**FISH technika očividně rozšířila možnosti detekce různých druhů aberací, jednak o stabilní aberace, což umožňuje biologickou dosimetrii i po dlouhé době po ozáření a jednak o intrachromosomové aberace, které jsou typické pro hustě ionizující záření.**

**Problémy – závislost pozadí na věku, individuální citlivost k ozáření, vznik klonů, které je nutno detekovat a vyloučit.**



# Vznik bodových mutací

**Přímé a zpětné mutace. U přímých mutací dochází ke ztrátě funkčního proteinu v důsledku změny genetického kódu. Tyto mutace lze detekovat na vhodných půdách, např. mutace  $lac^+ \rightarrow lac^-$  lze detekovat na půdě s tetrazoliem, mutace v  $lacI$  genu (což je represor  $lac$  systému) lze detekovat na půdě s X-galem, což je substrát pro  $\beta$ -galaktosidázu. Defekt v  $lacI$  genu vede ke vzniku konstitutivní mutace a syntéze galaktosidázy i bez přítomnosti laktózy. X-gal způsobuje modré zbarvení mutovaných buněk. Tato metoda je vhodná pro detekci malého počtu mutací, neboť modré kolonie jsou vidět na pozadí velkého počtu bílých kolonií. Při pozorování pod mikroskopem lze detekovat několik mutovaných kolonií na  $10^5$  normálních (bílých) kolonií.**

**U zpětných mutací se používají půdy, na kterých původní buňky nerostou (např. pro bakterie s defektem v syntéze histidinu se použije minimální půda bez histidinu. Protože pro fixaci mutací je potřeba, aby se buňky alespoň několikrát podělily, přidává se nepatrné množství aminokyseliny.**

