

Klinická cytogenetika

Oddělení lékařské genetiky

FN Brno



Odd. lékařské genetiky FN Brno
Pracoviště dětské medicíny

Skladba pracoviště:

poradenská č.: lékaři + zdravotní sestry

laboratorní č.: cytogenetická

postnatální

prenatální

onko

integrovaná lab.



molekulární genetiky

Základní charakteristika oboru

1. **Preventivní**- analýza podílu genet. a vnějších faktorů

-vyhledávání přenašečů,

prevence primární: plánované rodičovství, reprodukce v optimálním věku, prekoncepční péče

prevence sekundární: prenatální dg.

2. **Interdisciplinární** - spolupr. se všemi obory medicíny (neonatology, pediatrie, gynekologie a porodnictví, interna neurologie, psychiatrie, orthopedie, infekční, kardiolog. patolog. anatomie)

3. Nedirektivní (UUT)

4. obor celé rodiny a příbuzných

Přehled výuky klinické cytogenetiky

Vrozené aberace chromosomů

VCA

výskyt, detekce

příprava preparátů

hodnocení karyotypu

indikace k vyšetření

varianty chromosomů

přehled VCA u člověka

rob t, izochromosom

numerické aberace

zápis karyotypu

Získané aberace chromosomů

ZCA

vznik, detekce

příprava preparátů

hodnocení % aberantních buněk

využití

sy.chromosomové instability

nádorová cytogenetika

Historie lidské cytogenetiky

Zač. 20. stol. kultivace lidských tkání

1956- počet lidských chromosomů (Tjio, Levan), výstava

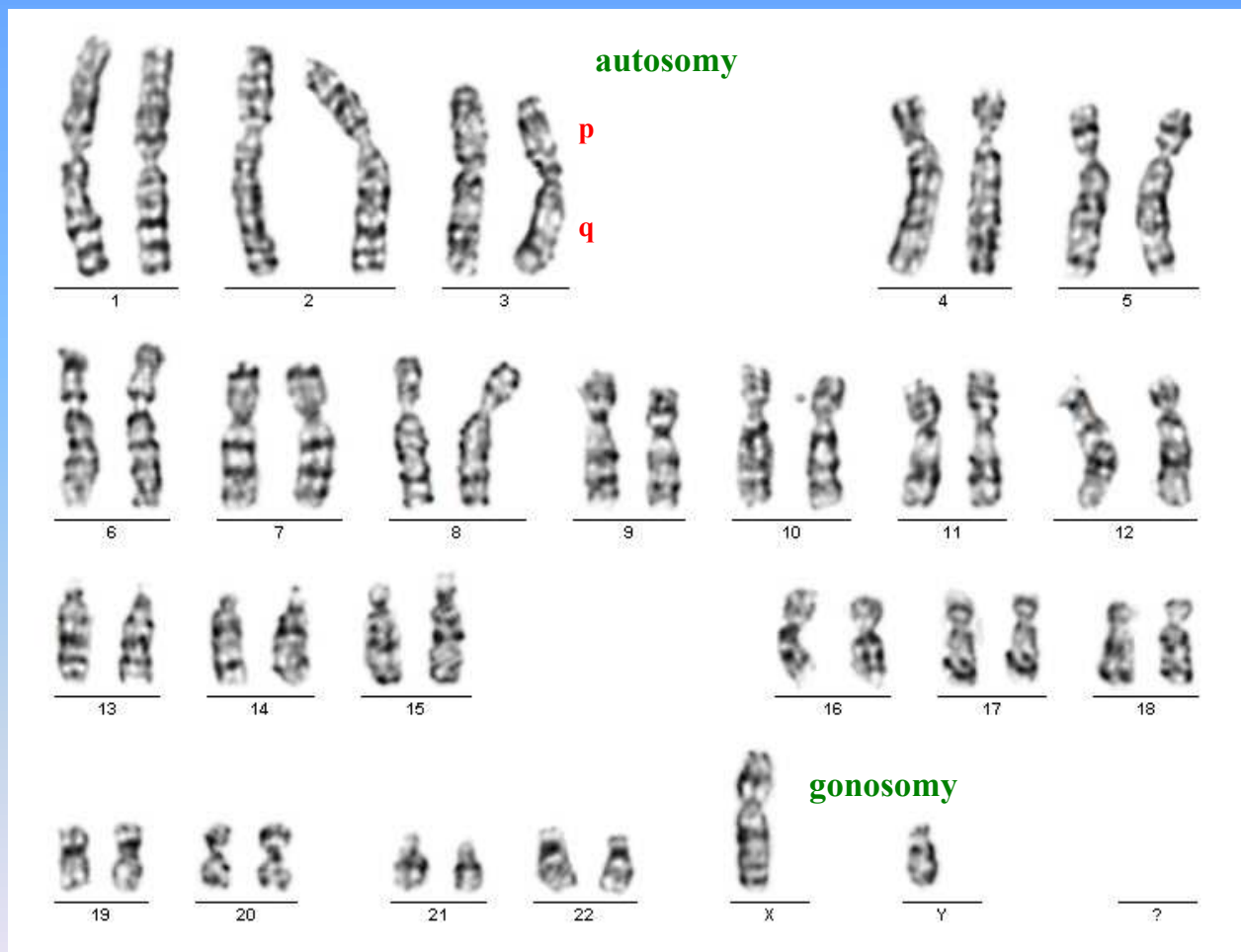
1970- fluorescenční metoda

1971- další pruhovací metody, Paříž karyotyp v dnešní podobě

1985 (95, 2005) - ISCN

1989 - FISH

karyotyp 46, XY



Výskyt chromosomálních aberací v populaci

0,59% dětí se každoročně rodí s CHA: **0,40%** nebalanc.
0,19% balanc.

0,38% CHA gonosomů

0,21% CHA autosomů

vznik: 80% de novo, 20% přenos od rodičů

Výskyt chromosomových aberací ve spontánních abortech

15 - 20% gravidit končí SA

50% SA podmíněno CHA

nejčastější typy CHA:

trisomie 51%

monosomie 19%

triploidie 18%

tetraploidie 6%

moz., přestavby 6%

Příprava mitotických preparátů

materiál: lymphocyty periferní krve - G₀

kožní fibroblasty

odběr: cca 3 ml krve + cca 0,5 ml heparinu, protřepat !!!

kultivace: RPMI + bovinní sérum + PHA

délka kultivace: VCA 72 hod

ZCA 48 hod

zpracování: kolchicin-hypotonizace-fixace-barvení

hodnocení

Indikace k postnatálnímu stanovení karyotypu

1. Podezření na sy. podmíněný VCA (+21, +18, +13, +8, +9
5p-, 4p-, mikroleční sy.)
2. Novorozenci s mnohočetnými vadami postihujícími více systémů
3. Neprospívající kojenci, somat. odchylky, dysmorfie obličeje, změny svalového tonu
4. Psychomotorická retardace +(-) somatické odchylky
5. Anomálie vnitřního a zevního genitálu, poruchy pohlavního vývoje
6. Sterilní a dysfertilní páry (opak. SA)
7. Dárci gamet !!!
8. Partneri před IFV
(děti k adopci)

Cytogenetické barvicí metody

Bandy=pruhy-části chromozomů, které jsou zřetelně odlišeny od sousedních segmentů za použití více metod

Metody diferencující po celé délce:

Q-pruhy: fluorescenční barvení, jasné pruhy=oblasti s DNA bohatou na AT, AT oblasti zvyšují fluorescenci, GC ji potlačují, nevýhoda metody-rychlé blednutí preparátů, foto

G-pruhy: mechanismus nejasný, důl. role Giems. barviva, enzymat. působení trypsinu, afinita u histonů bohatých na arginin, DNA ani proteiny nemizí při působení trypsinu, trvalé preparáty

R-pruhy: reverzní ke G, princip-vysoká teplota (85°C), denaturace proteinů a DNA bohaté na AT, GC oblasti zůstávají v nativní konfiguraci (delece koncových úseků)

Metody selektivní

C-pruhy: barvení konstitutivního heterochromatinu, denaturace NaOH, vyplavení fragmentů DNA z chromosomu do roztoku 2xSSC

NOR: barvení oblastí, které v interfázi tvoří jadérko (nukleolární organizátor jadérka)-mnohonásobné kopie genů pro rRNA, akrocentr. chr., AgNO₃

SCE: výměny sesterských chromatid, reciproké výměny, nemění morfologii Ch. výměny v homologních místech, mechanismus neznámý, vznik během replik. DNA, vztah k reparaci DNA, nesouvisí se vznikem strukturních aberací
indukce: alkylačními činidly, UV zářením

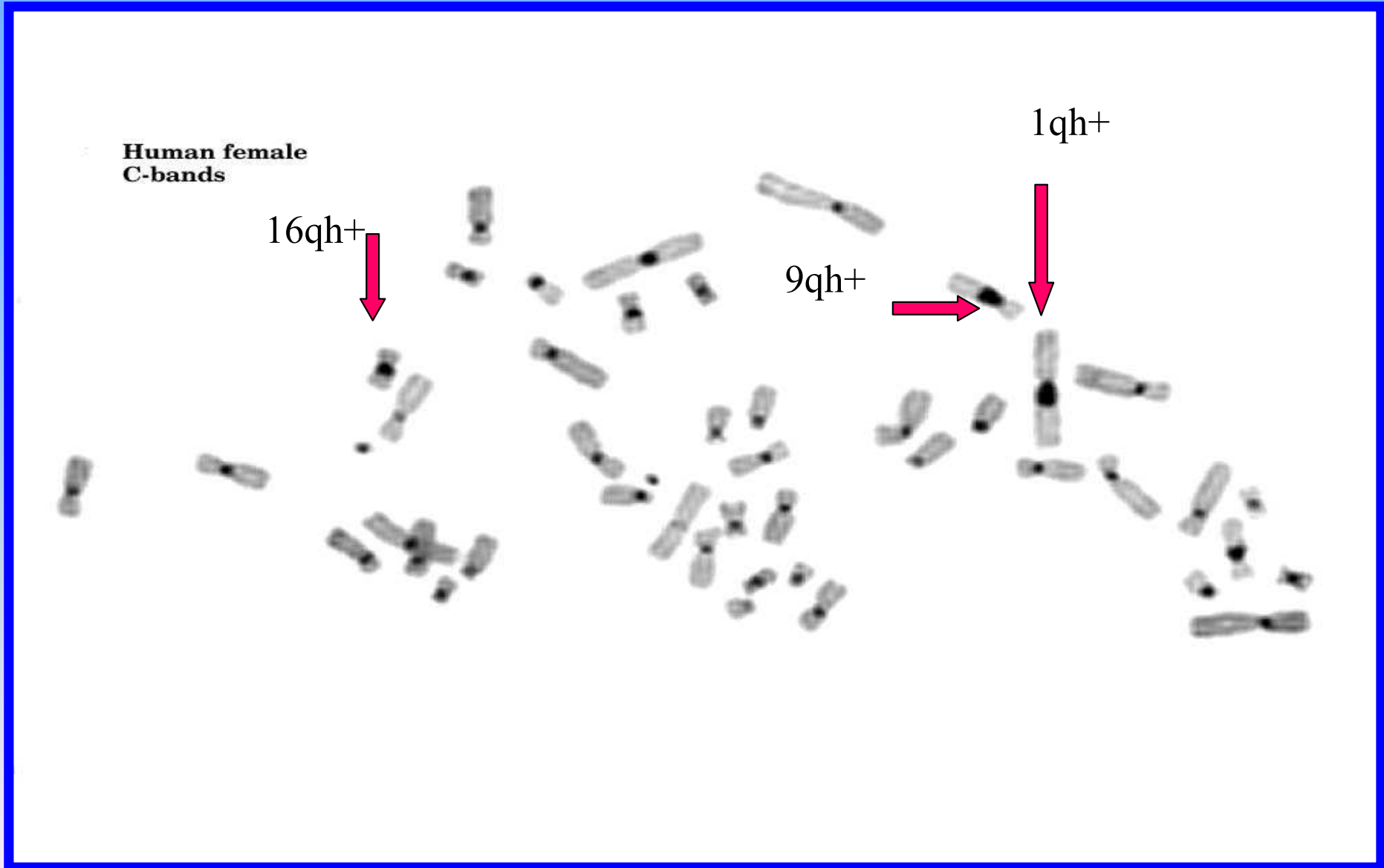
použití: citlivý indikátor mutagenů

výskyt: Bloomův sy.

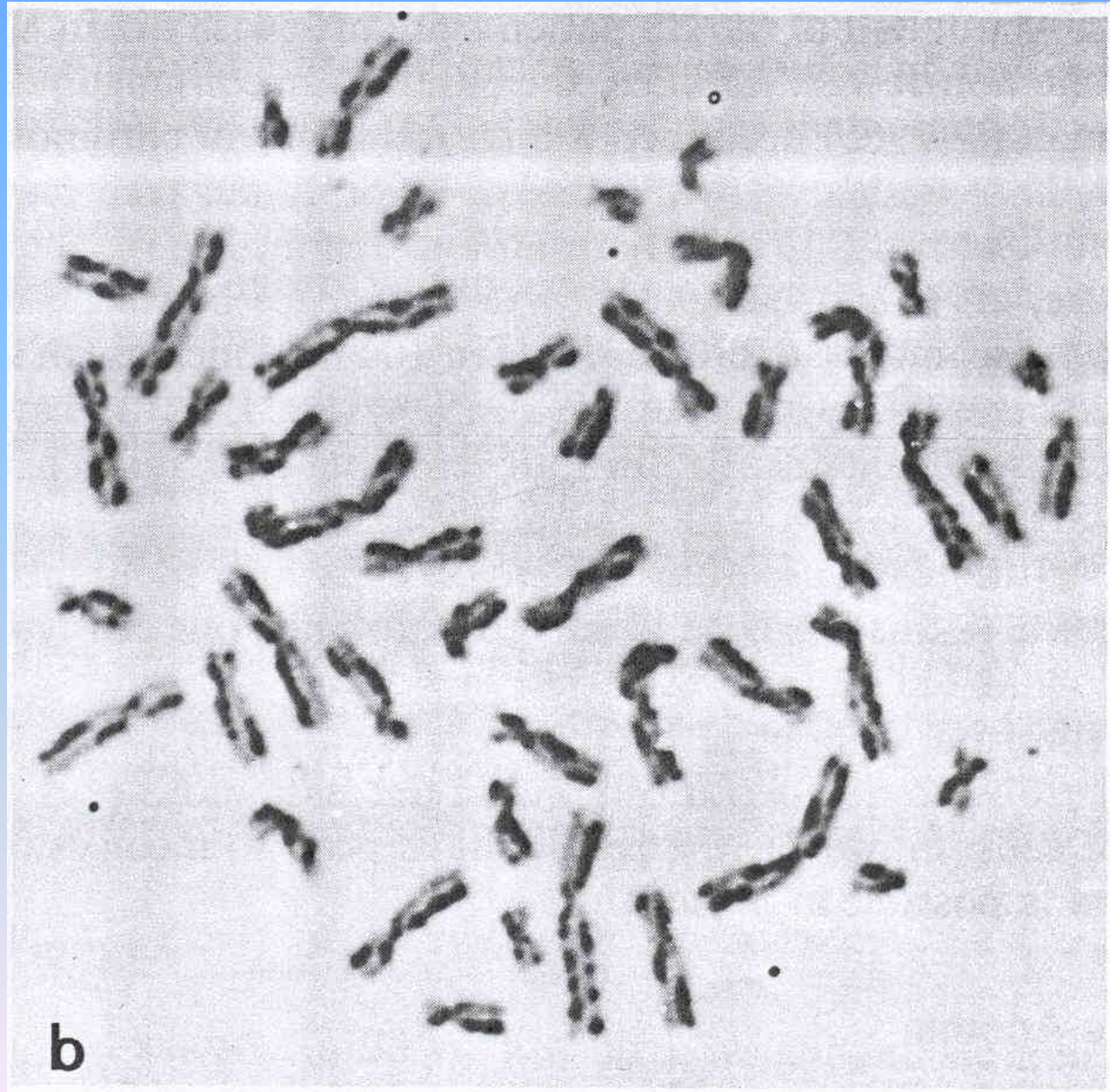
princip metody: inkorporace BrdU 2x buněčný cyklus, afinita fluorescenčního barviva Hoechst 33258

C - pruhy

1qh+, 9qh+, 16qh+



Výměny sesterských chromatid (SCE)



FISH - fluorescenční in situ hybridizace

**Použití sondy komplementární ke sledovanému úseku DNA,
denaturace, hybridizace**

**Sondy značené: radioaktivně (zač. 70. let)
fluorescenčně 1990**

**Typy sond: centromerické, telomerické , celochromosomové
(malovací), genově specifické, multisondy, genomové**

**Hodnocení: fluorescenční mikroskop
počítačová analýza obrazu**

Modifikace FISH

I-FISH: na interfázních jádrech (centromerické, lokus specifické - mikrodelece, přestavby, fuzní geny, amplifikace atd.)

M-FISH: mnohobarevná, postupné snímání, filtry, skládání obrazu

SKY: spektrální karyotypování, SKY filtr, jednorázové snímání

M bandy, CGH - využití, rozlišovací schopnost
array CGH - 280 genů (3 000)

$t(2;13)$, $t(4;8)$, $t(6;16)$, $t(8;11)$



Normální karyotyp 46, XY (46, XX)

odchyly od normy → varianty chromosomů
(polymorfismus)



aberrace chromosomů:

strukturní - balancované: inverze, inzerce, reciproké t., Robertson.t.

- **nebalancované:** delece, duplikace, ring, izochomosom

numerické - aneuploidie: monosomie, trisomie, kvadrisomie

- **polyploidie:** triploidie, tetraploidie

Polymorfismus = heteromorfismus

Strukturní varianty bez fenotypového projevu !!!

(zvýšené riziko nondisjunkce ostatních CH v meioze)

konstitutivní heterochromatin - qh⁺

výskyt: 1, 9, 16, Y (3, 4, 13, 22; 12, 17, 21)

9qh⁺ (0,1% popul.) : ↑ frekvence u rodičů dětí s aneuploidií

pericentrické inverze : inv (9qh) 0,2-0,3% popul.

ženy z dysfertilních párů

1, vzácně 3

varianty qh⁺ : 10% rodičů dětí s Down. sy.

Normální karyotyp 46, XY (46, XX)

odchylky od normy → **varianty chromosomů**
(polymorfismus)



aberrace chromosomů:

strukturní - **balancované:** inverze, inzerce, reciproké t.

Robertson.t.

- **nebalancované:** delece, duplikace, ring, izochomosom

numerické - **aneuploidie:** monosomie, trisomie, kvadrisomie

- **polyploidie:** triploidie, tetraploidie

Robertsonovské translokace (RT)

Nejčastější VCA v lidské populaci, 85 - 95% familiární

vznik: fúze akrocentrických CH v oblasti centromery

t(13;14), t(14;21)

balancovaná - fenotypový projev 0, vzácně m. sterilita

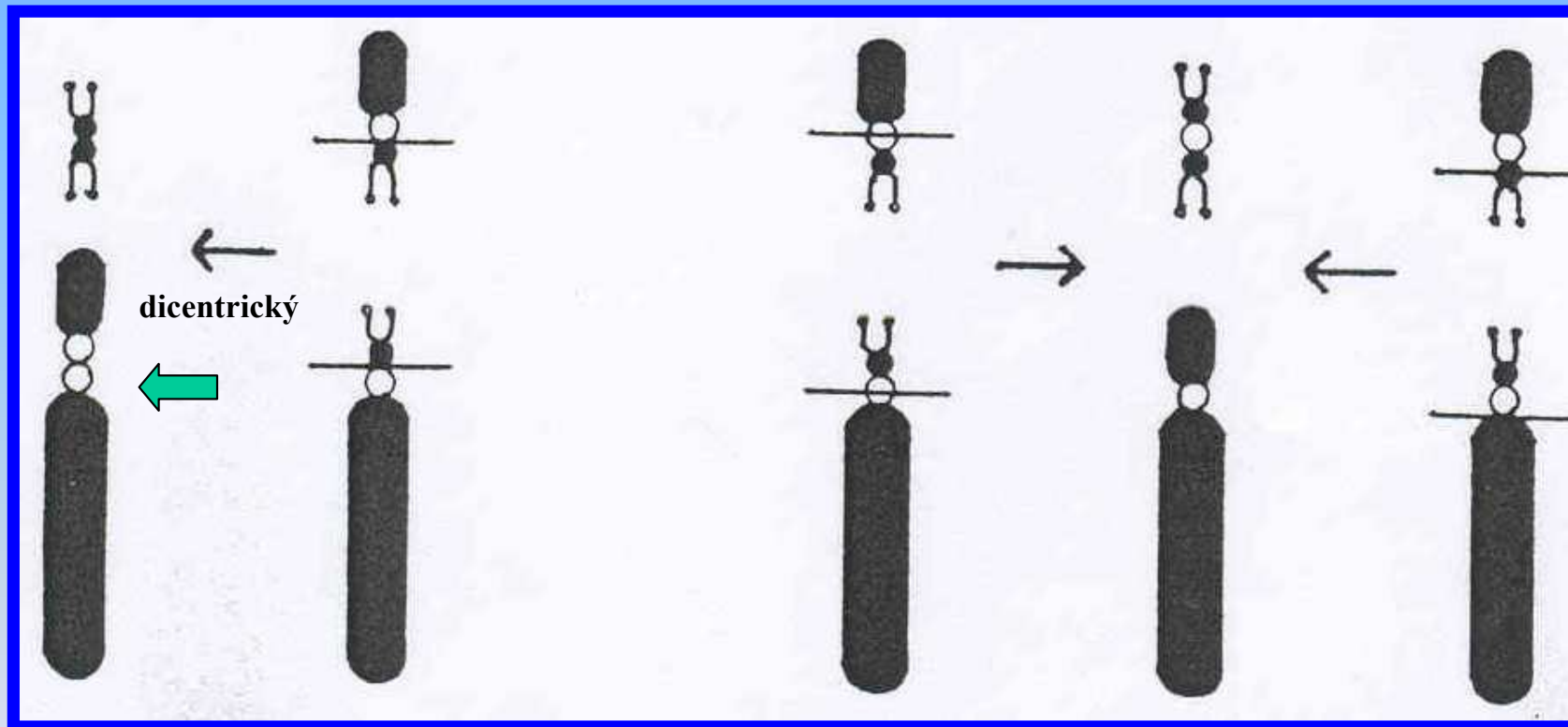
nebalancovaná v potomstvu:

m.Down původem z t(14;21) nebo t(21;22)

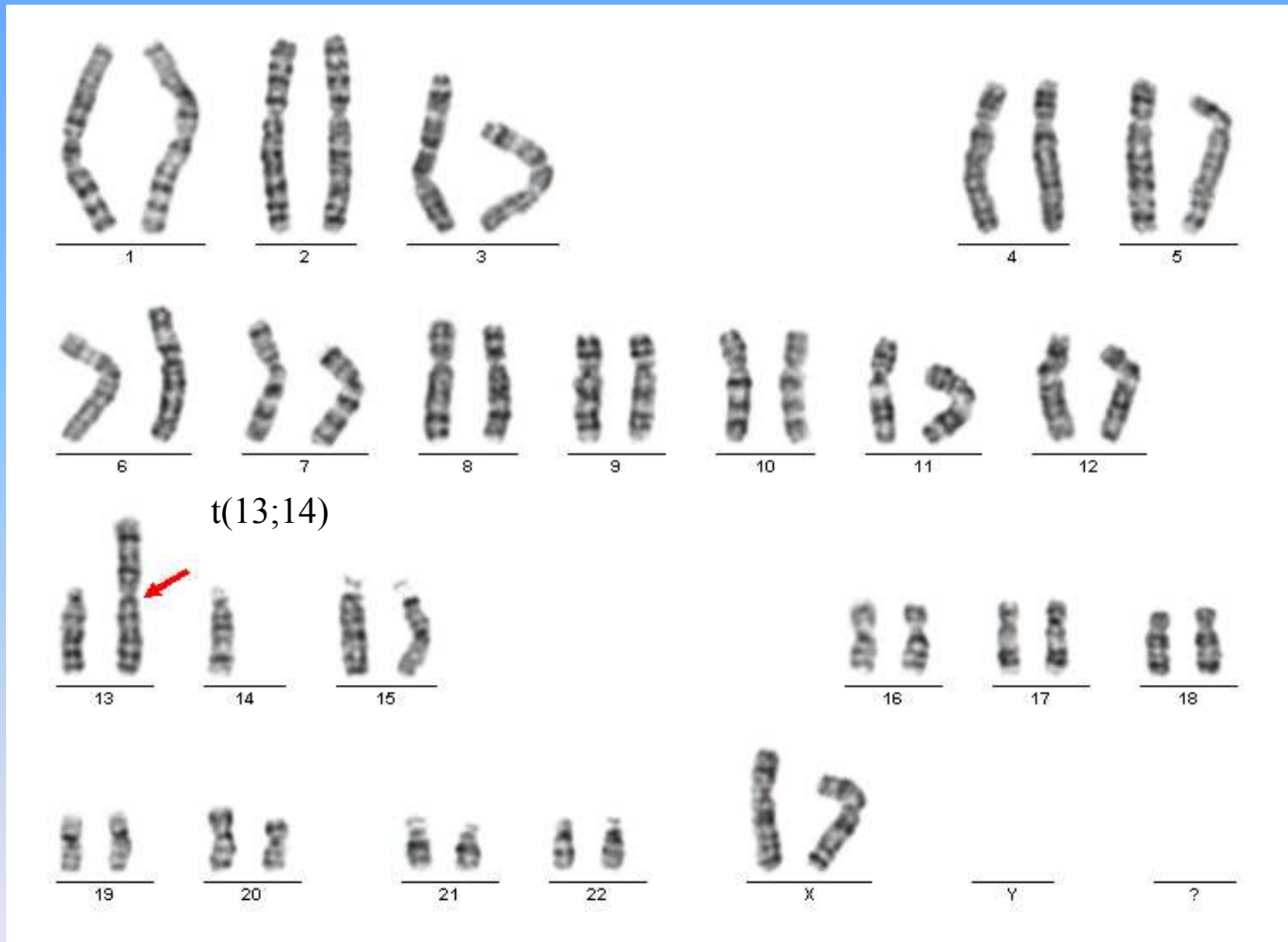
m.Patau t(13;14)

t(14;14), t(15;15), t(22;22) - vždy SA

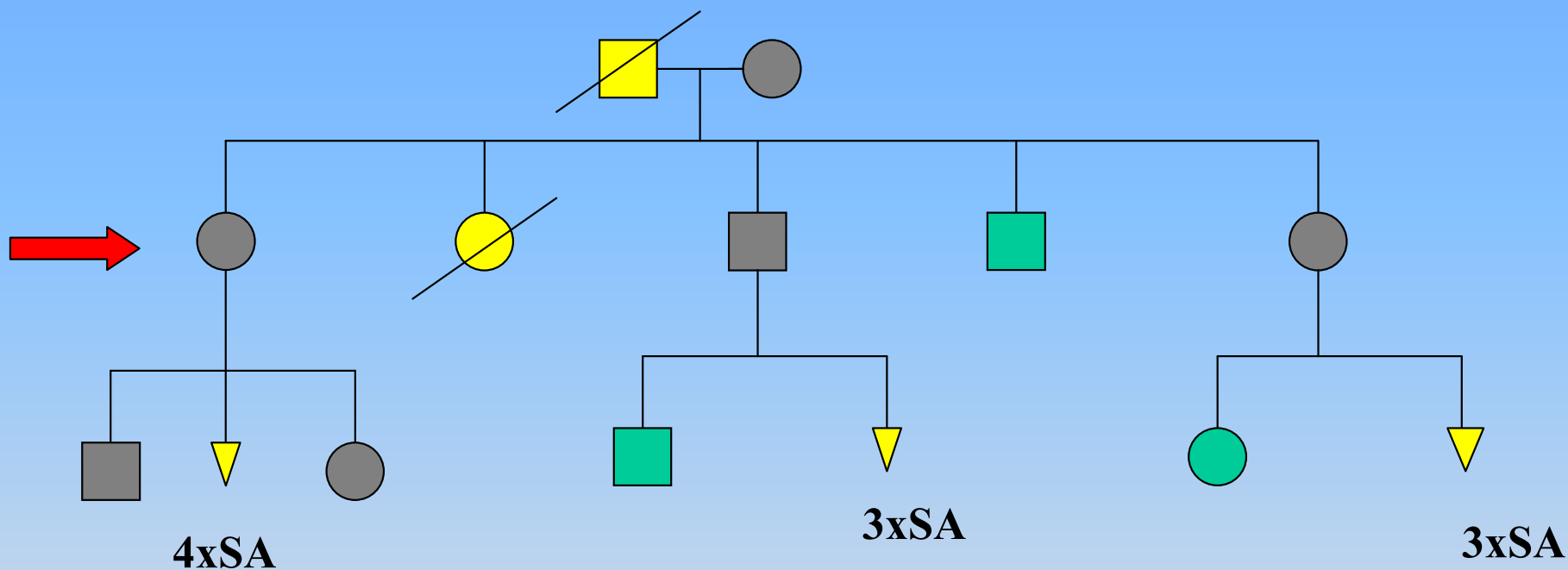
Robertsonovská translokace



Robertsonovská translokace t(13;14)



Rodokmen rodiny s Robertsonovskou translokací t(13;14)

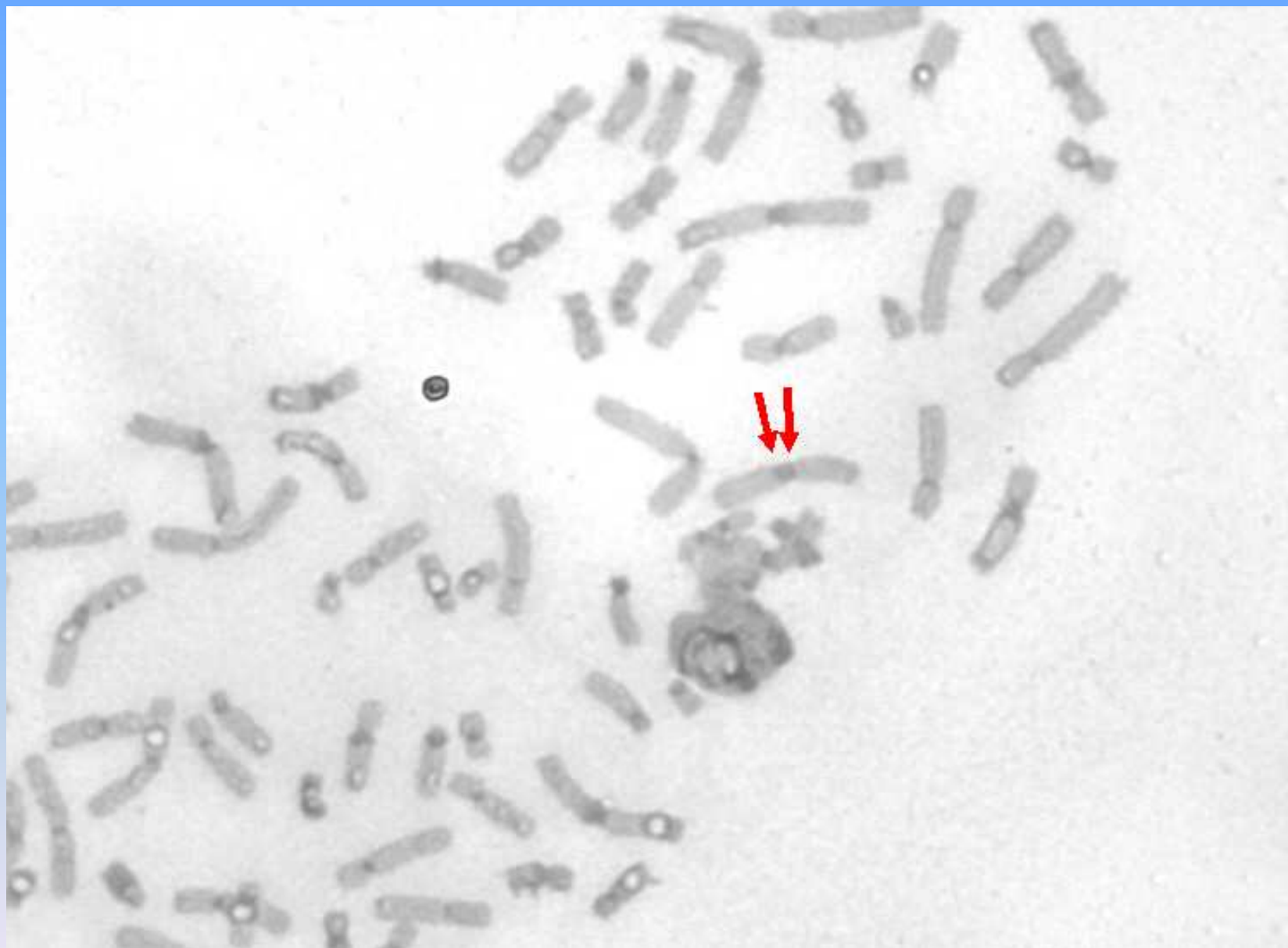


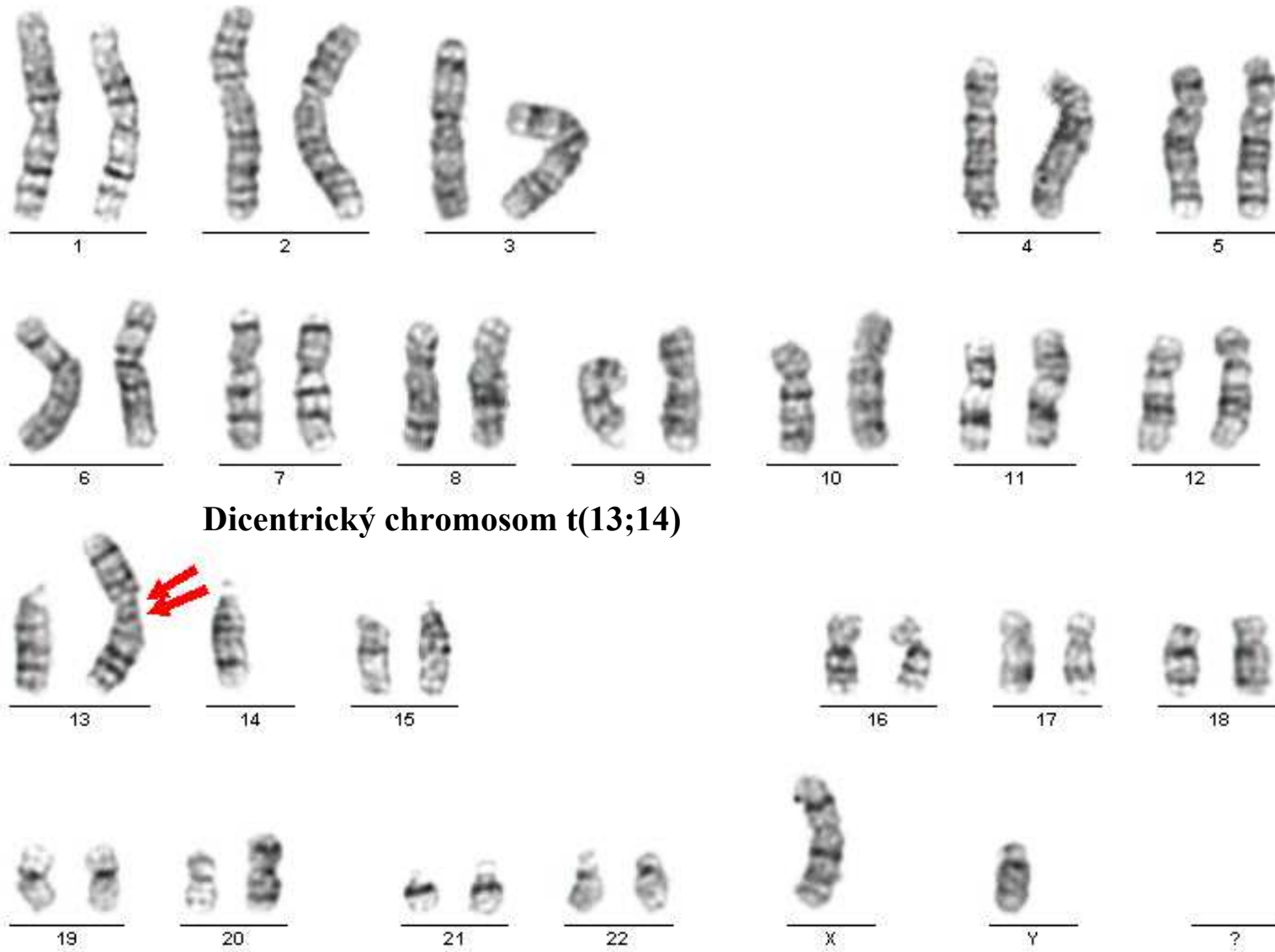
t(13;14)

normální karyotyp
nevyšetřený karyotyp

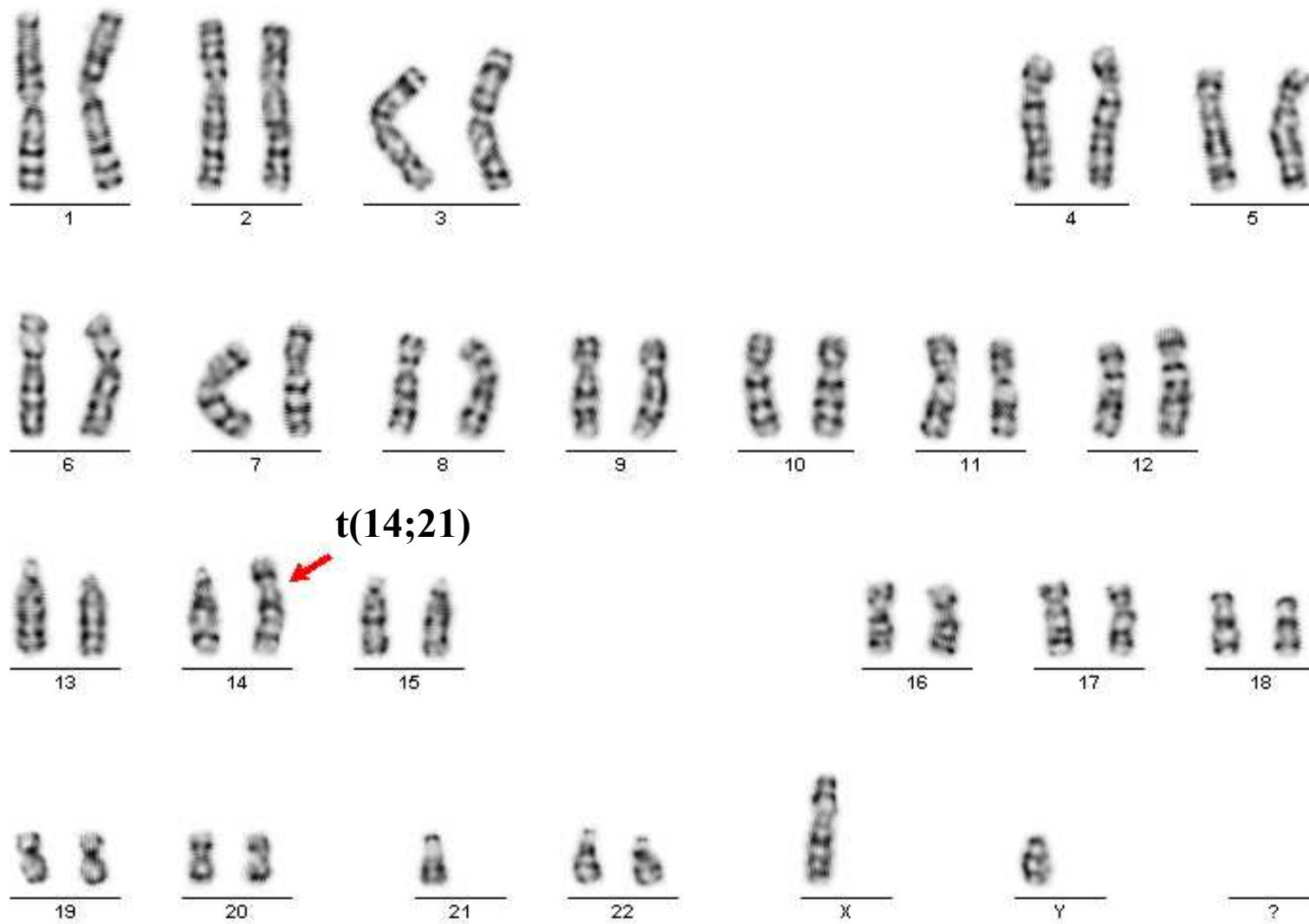


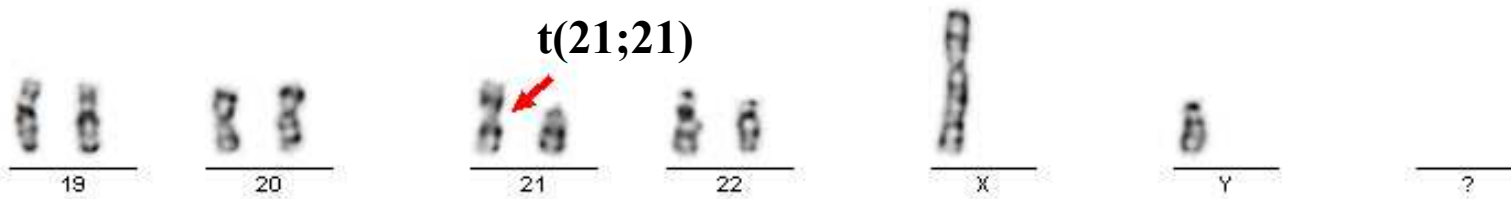
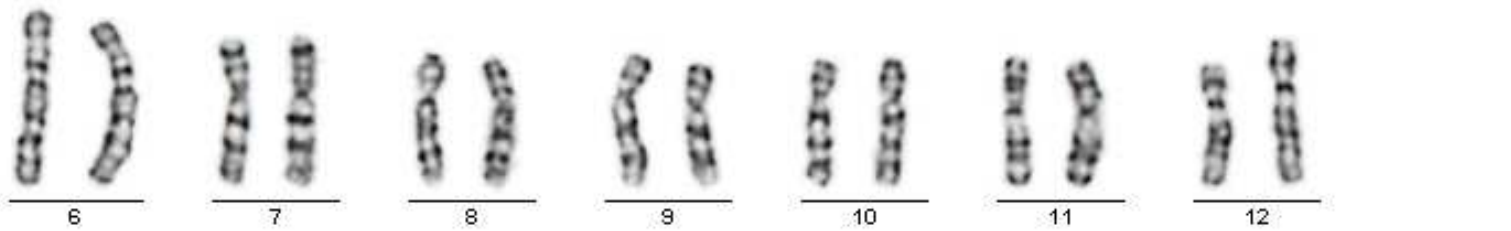
Dicentrický chromosom C pruhy





Dicentrický chromosom t(13;14)





t(21;21)

Normální karyotyp 46, XY (46, XX)

odchyly od normy → **varianty chromosomů**
(polymorfismus)

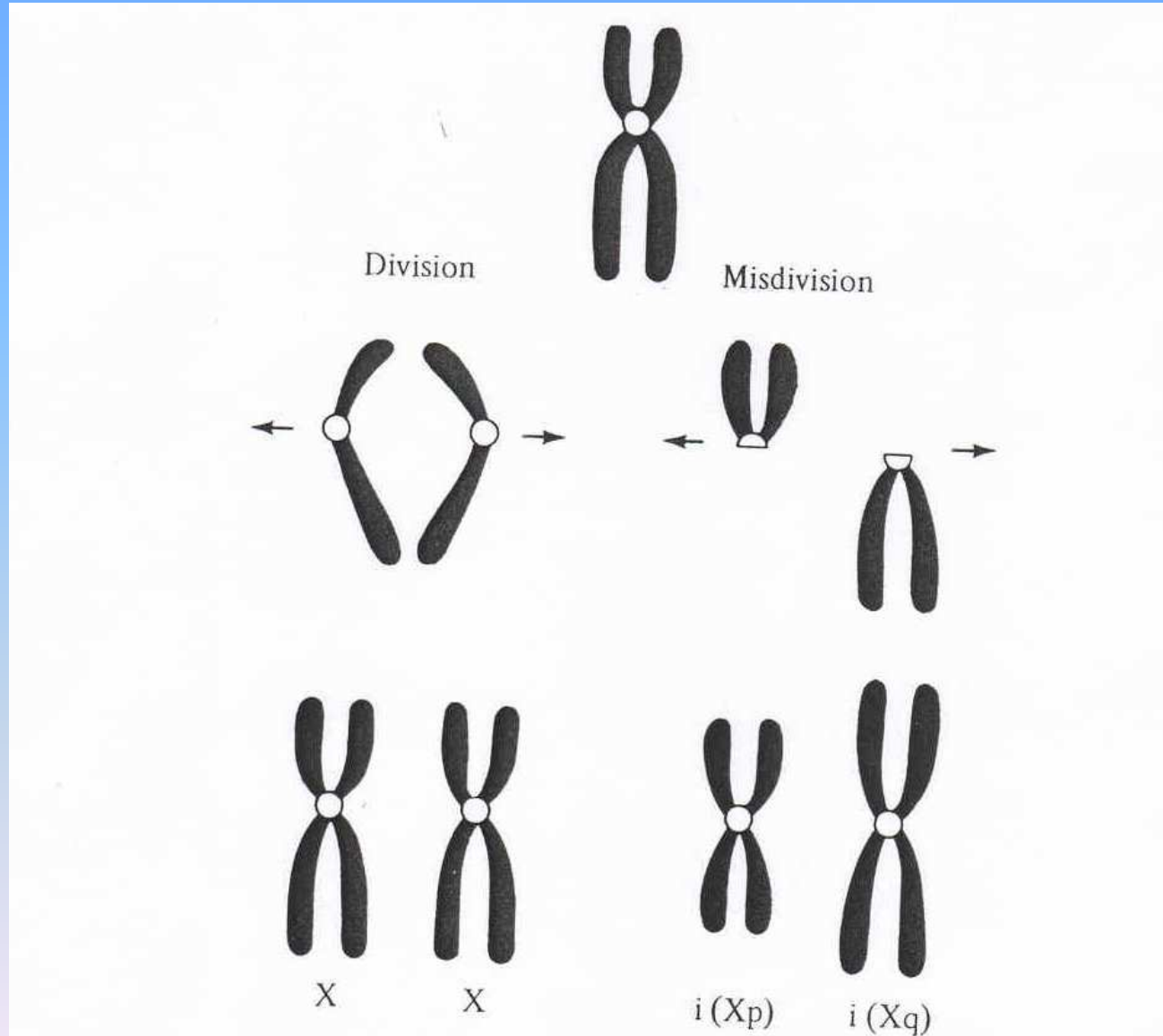


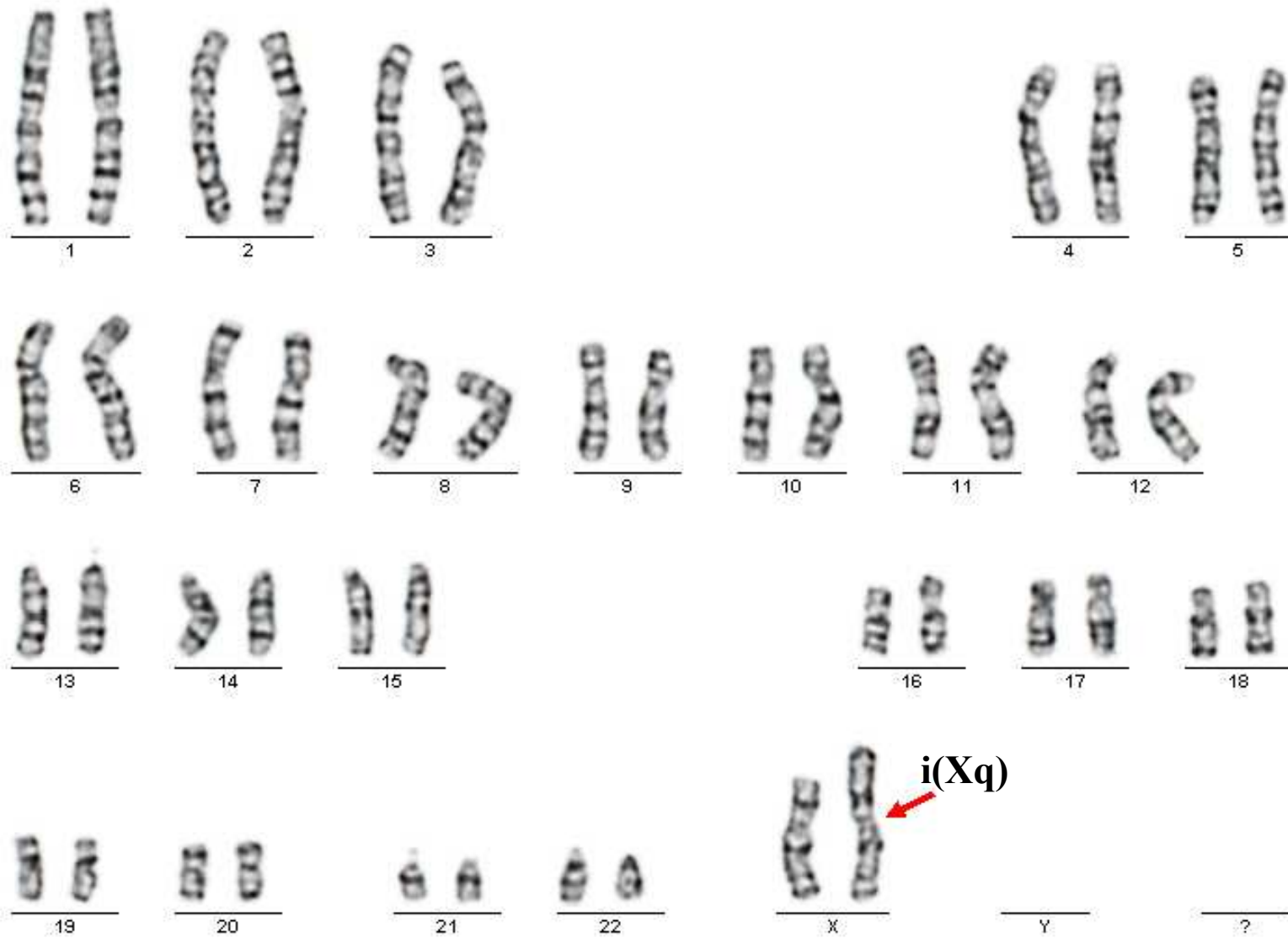
aberrace chromosomů:

strukturní - **balancované:** inverze, inzerce, reciproké t., Robertson.t.
- **nebalancované:** delece, duplikace, ring,
izochromosom

numerické - **aneuploidie:** monosomie, trisomie, kvadrisomie
- **polyploidie:** triploidie, tetraploidie

Izochromosom i(Xq)





Hypotézy klinických projevů balancovaných translokací

Mikrodelece v místě zlomu

zlom v oblasti genu - funkční recesivní alela

poziční efekt - onkologická onemocnění, aktivace protoonkogenu

Př.:CML, translokací 9q na 22q fuzní gen bcr/abl, aktivace protoonkogenu abl (9q)

Normální karyotyp 46, XY (46, XX)

odchyly od normy → **varianty chromosomů**
(polymorfismus)



aberrace chromosomů:

strukturní - balancované: inverze, inzerce, reciproké t., Robertson.t.

- **nebalancované:** delece, duplikace, ring, izochomosom

numerické - **aneuploidie:** monosomie, trisomie, kvadrisomie

- **polyploidie:** triploidie, tetraploidie

Chromozom X

Metacentrický, řada C, fakultativní heterochromatin,
pozdní S-fáze,

inaktivace: náhodná, 16. den, ireversibilní, 2Xneživotasch.

reaktivace: oocyty- transkribce, párování
maligní bb. - důvod nejasný

inaktivační centrum - Xq13 (chybí-netvoří se Barrovo t.)

aktivní oblasti: Xpter (4geny vždy aktivní), Xp11, Xp11-13
(časná replikace)

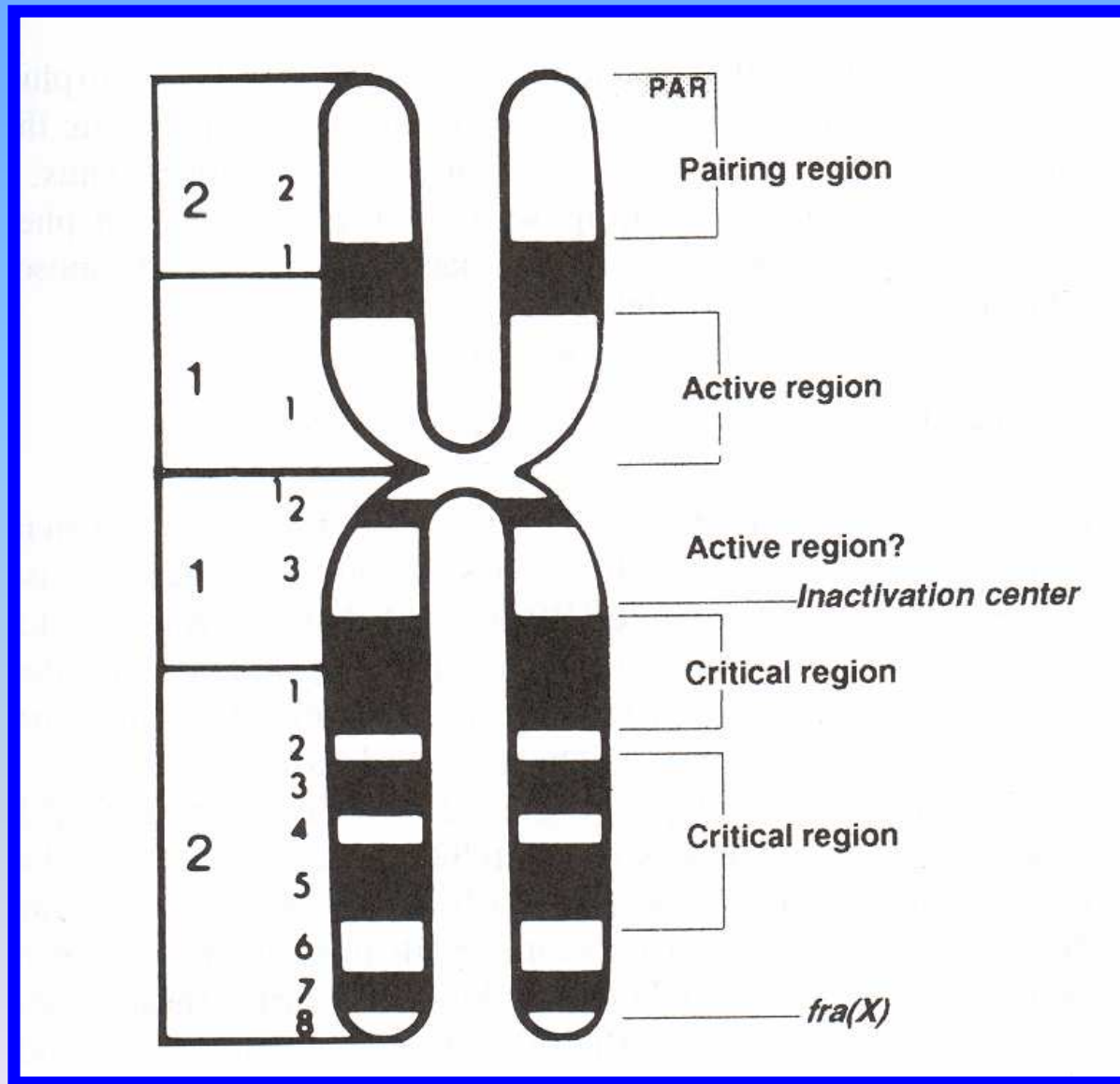
kritická oblast(Xq21-26)-Z“= gonadální dysgeneze

Z“ mimo = norm. pohl.vývoj

ženy s **bal t(X;A)**- aberantní je aktivní, inaktivní je
norm. X

nebal t(X;A)-aberantní inaktivní (nejč. 21, 22)

Chromozom X



Chromozom Y

Malý akrocentrický

Yp determinace pohlaví (**SRY**)

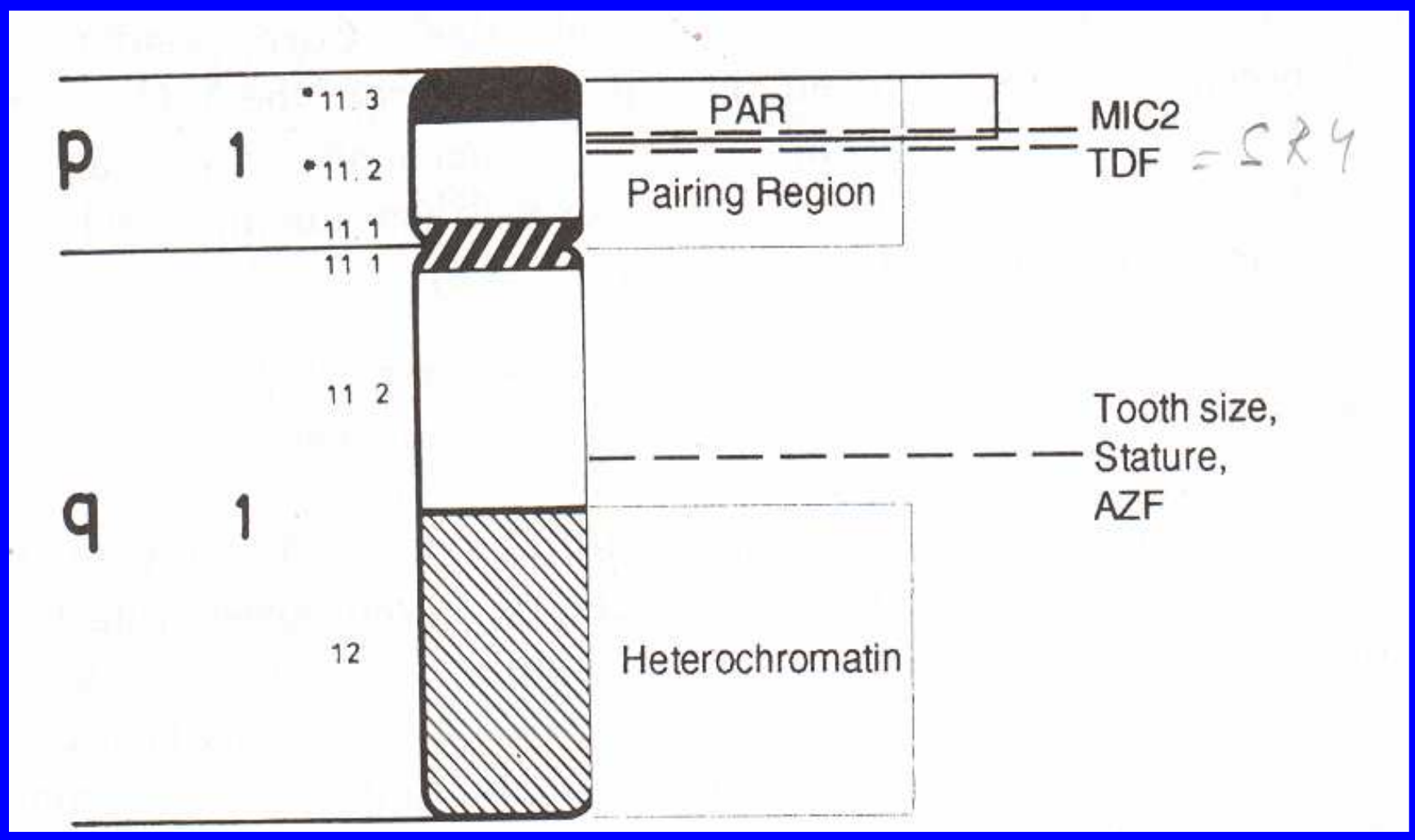
Ypter-párovací obl. s Xp v meioze

Yq polymorfismus - variabilita velikosti

patologie: del(Yp); i(Yp); 46,XX,male

46,XY, female

Chromosom Y



Zápis karyotypu

46,XX

46,XY

46,XX, 9qh+

46,XX,inv(9qh)

46, X,Yqh+

47,XX,+21

47,XX,+18

45,X !!!

46,X, i(Xq)

46,X,del(Xp)

45,XX, der(13;21)(q10;q10)

46,XX, der(13;21)(q10;q10), +21

46,XX, t(2;5)(q21;q31)

Získané chromosomové aberace

materiál: lymfocyty periferní krve, G₀ 1000-1500 D
kultivace 48 hod, zpracování jako při karyotypování
barvení - konvenční metoda !!!!

Hodnocení: počet aberantních bb. / 100 hodnocených

typy aberací: zlomy chromatidové a chromozomové

acentrické fragmenty

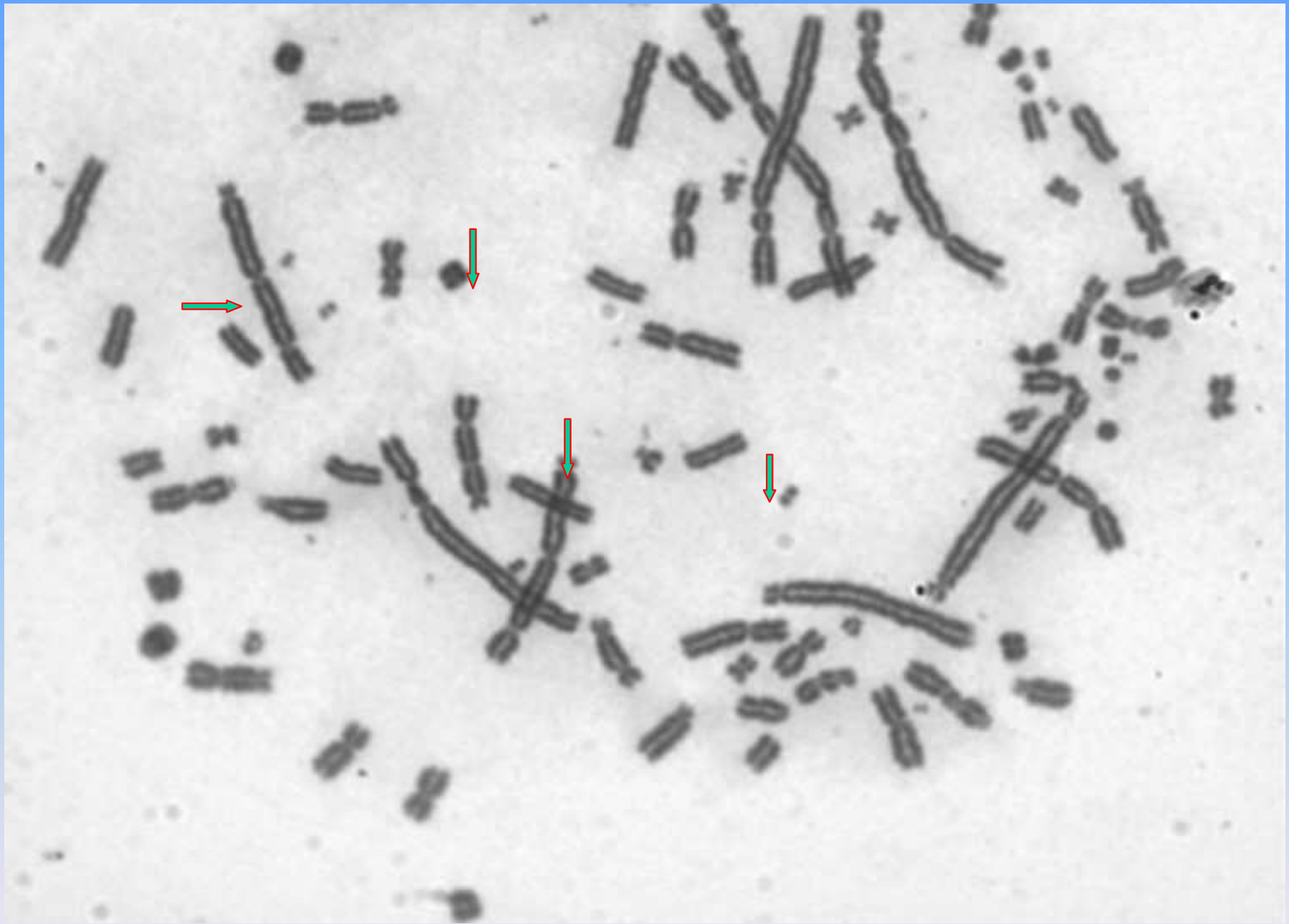
di- a tricentrické Ch

kruhové Ch

hodnocení nálezů:

→5% bez závěru, opakování=riziko

rozdíly v hodnocení jednotlivců a skupin



ZCA – využití

Monitorování působení mutagenů

fyzikální, chemické, biologické

Zátěž z pracovního a životního prostředí

Syndromy s chromosomovou instabilitou

Cytogenetické nálezy u onkologických pacientů

Syndromy s chromosomovou instabilitou

Defekty v reparačních mechanismech

Chakteristika: dědičnost AR

Přecitlivělost na mutageny

Vznik zlomů s následnou přestavbou

Zvýšený výskyt maligních onemocnění

Xeroderma pigmentosum	1:250 000
Fanconiho anemie	1:350 000
Ataxia teleangiectasia	1:30-50 000
Bloomův sy.	omezen na urč.etnika
Cockaynův sy.	velmi vzácný
.....a další	