# CYTOGENETIKA, CHROMOSOMY

vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno
s podporou projektu OPvK

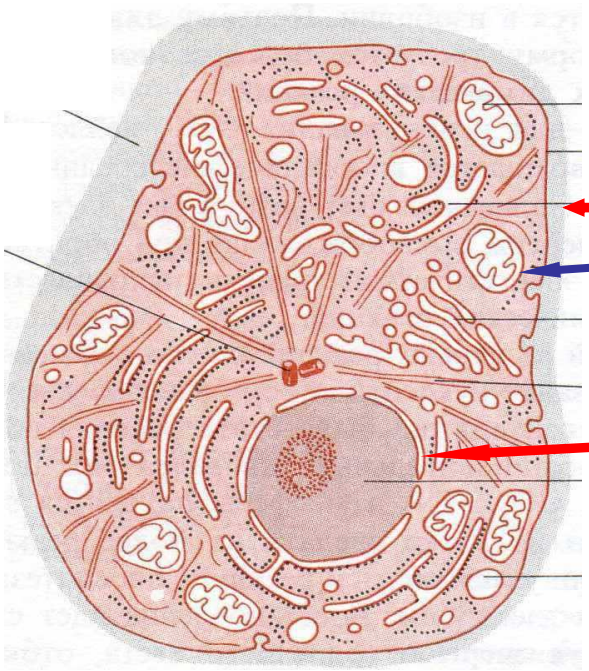
esf evropský sociální fond v ČR
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

**zpracovala Mgr. Hanáková**

# DEFINICE A HISTORIE

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

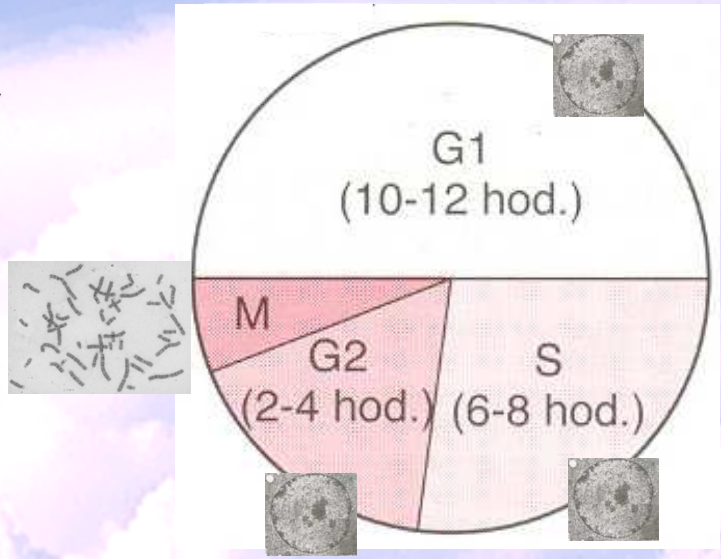
Obr. 1 (Alberts,1986), upraveno

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

# 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 - pouze konstitutivní heterochromatin zůstává trvale kondenzován)
- **M fáze = MITÓZA + cytokineze**
  dělení jádra a následně buňky - **kondenzace chromatinu, vznik chromosomů**, rozchod chromosomů do dceřiných buněk




Obr. 2 (buněčný cyklus) (Nussbaum, 2004), upraveno

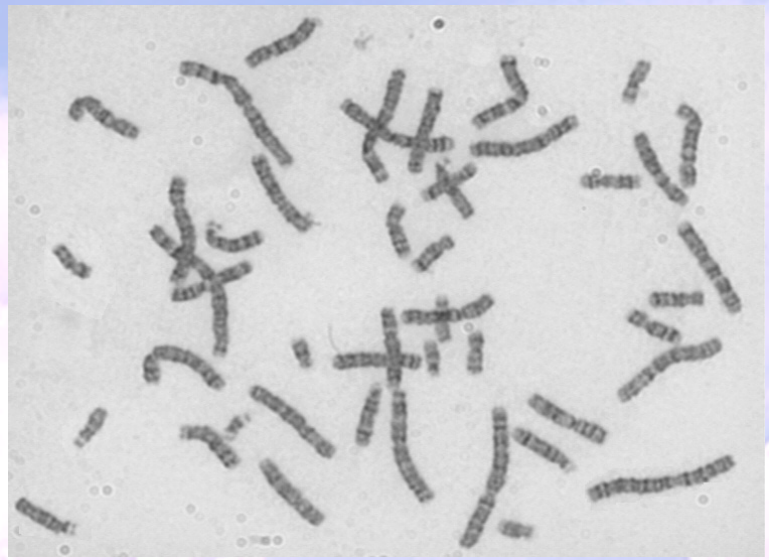
Interfázní jádro (Alberts,1986)
Mitóza (Dokumentace OLG FN Brno)

# ZMĚNA ORGANIZACE GENETICKÉHO MATERIÁLU BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU SOMATICKÝCH BUNĚK

**chromosomy vznikají při buněčném dělení**

**DNA rozptýlená v buněčném jádře (interfáze)**

Obr. 3 (Ham,1983)



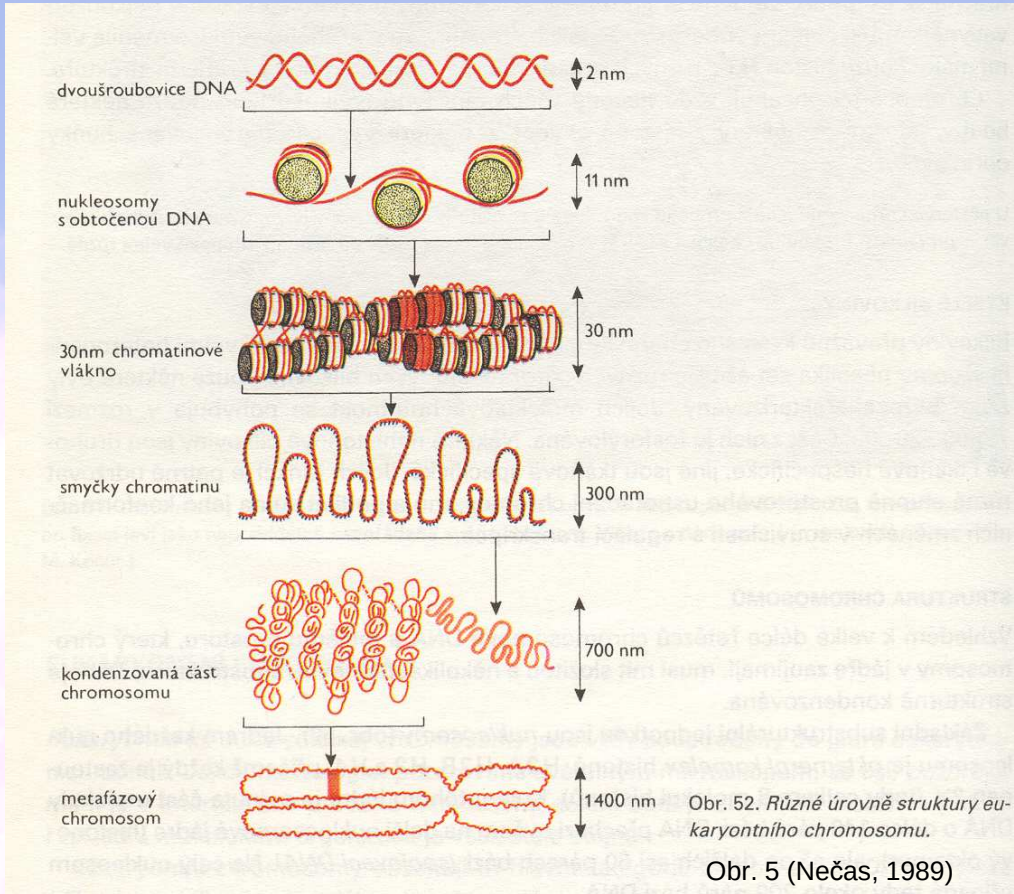
**chromosomy = spiralizované molekuly DNA**
**počet chromosomů člověka = 46**
**(mitóza)**

Obr. 4 (Dokumentace OLG FN Brno)
Schema chromosomu (Nussbaum, 2004)

# 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)

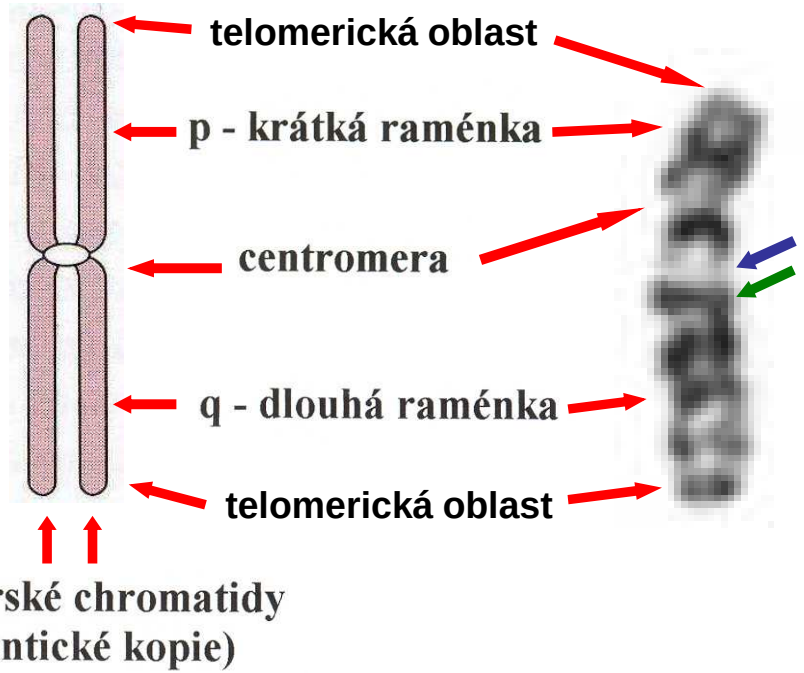



Obr. 52. *Různé úrovně struktury eukaryontního chromosomu.*

Obr. 5 (Nečas, 1989)

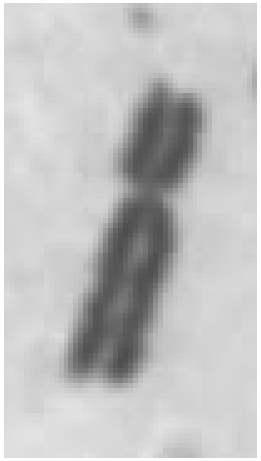
# CHROMOSOMY V PRAXI

schema chromosomu

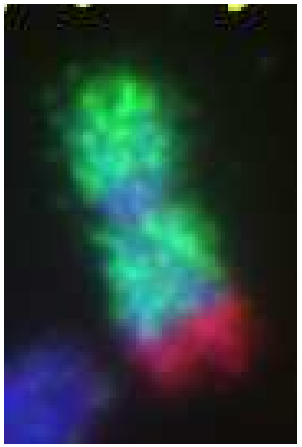



chromosom s G- pruhy

chromosom konvenčně barvený



chromosom metoda FISH



dvouchromatidový metafázní chromosom

Obr. 6
Reálné chromosomy (Dokumentace OLG FN Brno)
Schema chromosomu (Nussbaum, 2004)

# CHROMOSOM

- **centromera** = heterochromatinová oblast (konstitutivní heterochromatin), místo rozdělení krátkých a dlouhých ramének, místo spojení sesterských chromatid, místo tvorby kinetochorů v meióze a mitóze, (primární konstrikce, zaškrcení)

- **telomera** = specifická DNA sekvence na koncích každého chromosomu (každé chromatidy, dvoušroubovice DNA), která zajišťuje integritu chromosomu během buněčného dělení (repetitivní hexamer (TTAGGG)n)

# CHROMOSOMY - KARYOTYP

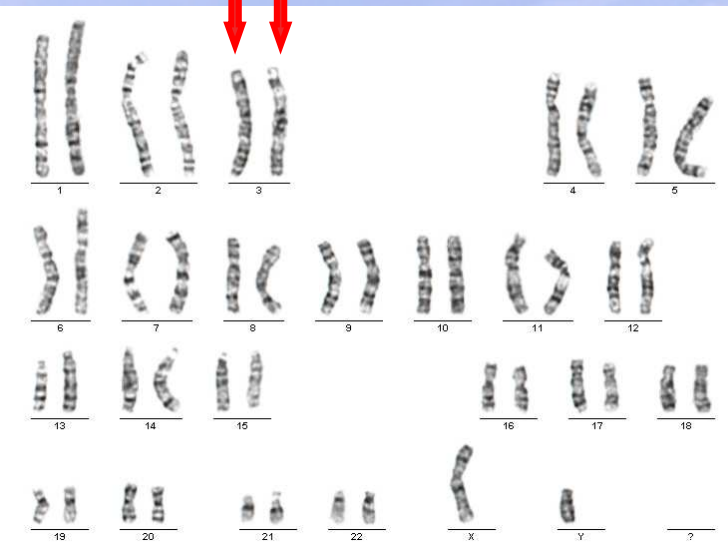
- **karyotyp = utříděný a zhodnocený soubor chromosomů** v somatických buňkách pacienta, v zápisu označujeme **počet chromosomů, typ pohlavních chromosomů** a případné **aberace** (zápis karyotypu např. **46,XY**)

- normální lidský karyotyp se skládá ze **46 chromosomů**, z toho **22 párů autosomů** (nepohlavních chromosomů) a **2 gonosomů** (pohlavních chromosomů)

- chromosomový pár je tvořen **homologními** chromosomy, z nichž jeden je zděděn od otce a druhý od matky, nepárové chromosomy jsou **nehomologní** (somatické diploidní buňky)

chromosomový pár
(homologní chromosomy)

Obr. 7 (Dokumentace OLG FN Brno)




obrázek karyotypu - karyogram
= utříděný a zhodnocený soubor chromosomů jedné buňky, který charakterizuje i chromosomy v ostatních buňkách pacienta ve vyšetřované tkáni

# ZÁPIS KARYOTYPU

46,XX - normální ženský karyotyp

46,XY - normální mužský karyotyp

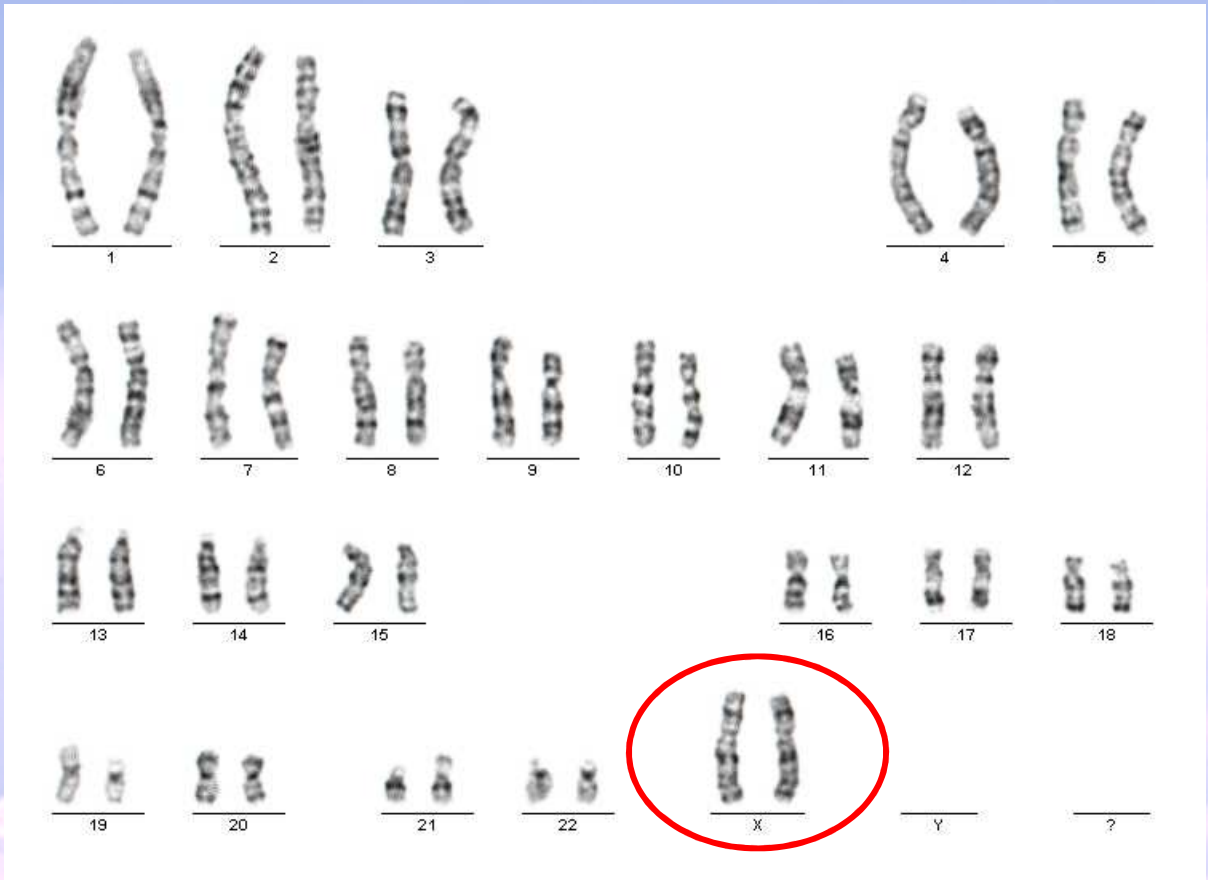
počet chromosomů v buňkách pacienta

typ pohlavních chromosomů

# KARYOTYP
# normální mužský karyotyp
# 46,XY

Obr. 8 (Dokumentace OLG FN Brno)

# KARYOTYP
# normální ženský karyotyp
# 46,XX

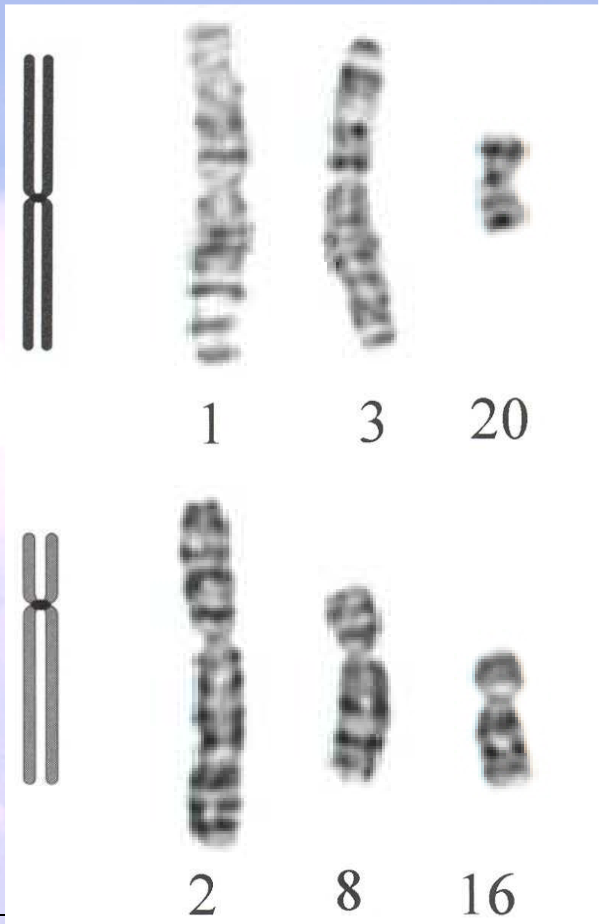



Obr. 9 (Dokumentace OLG FN Brno)

# CHROMOSOMY - třídění chromosomů podle umístění centromery

- **metacentrické chromosomy**
  centromera téměř nebo úplně uprostřed, tedy krátká a dlouhá raménka jsou (téměř) stejně dlouhá

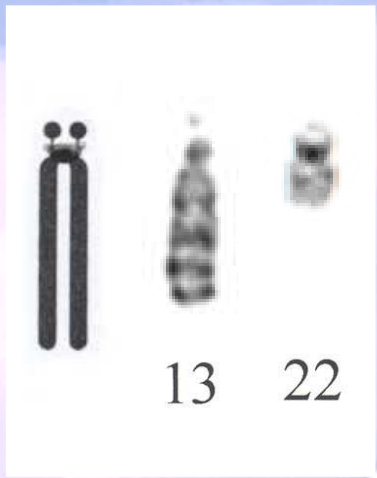
- **submetacentrické chromosomy**
  centromera mimo střed chromosomu, p a q raménka jsou jasně délkově odlišena




Obr. 10
Schemata chromosomů (Nussbaum, 2004)
Reálné chromosomy (Dokumentace OLG FN Brno)

# CHROMOSOMY - třídění chromosomů podle umístění centromery

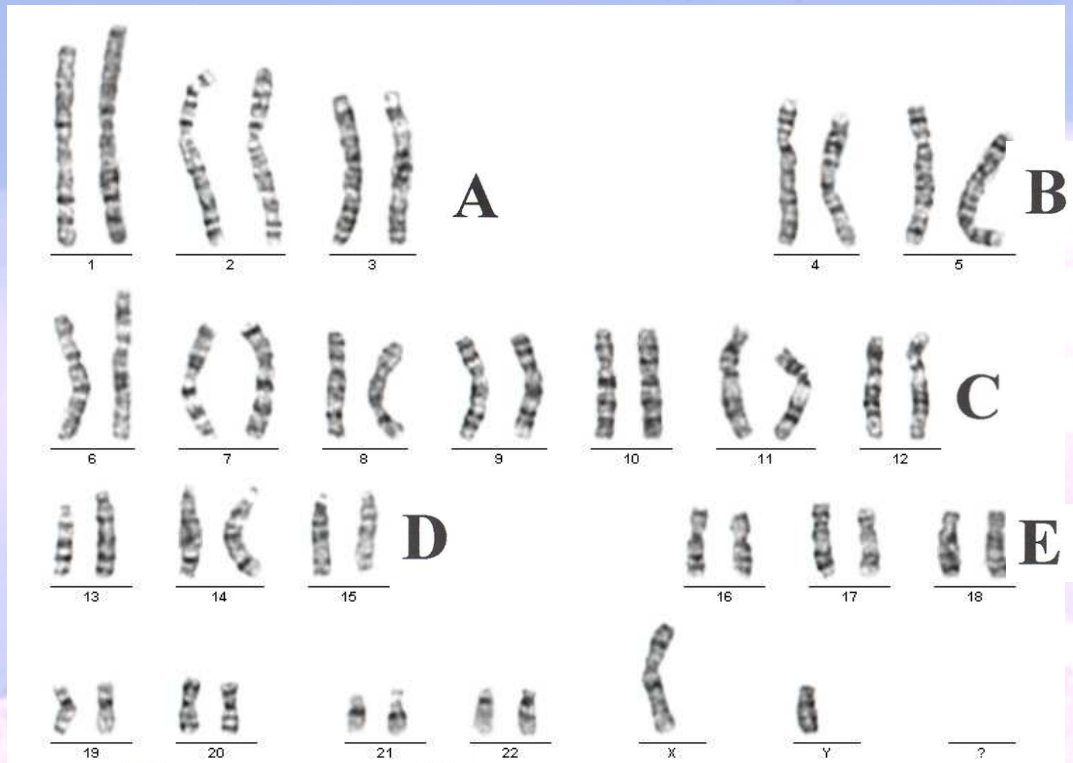
- **<u>akrocentrické chromosomy</u>**
  centromera je umístěna velmi blízko jednomu konci;
  od <u>krátkých ramének</u> jsou odškrceny <u>satelity</u> (malé výrazné části chromatinu);
  místo odškrcení = <u>sekundární konstrikce</u> (tenké stopky);
  (sekundární konstrikce obsahuje kopie genů kódujících rRNA = organizátor jadérka)




Obr. 11
Schema chromosomu (Nussbaum, 2004)
Reálné chromosomy (Dokumentace OLG FN Brno)

# CHROMOSOMY - třídění chromosomů do skupin podle velikosti a pozice centromery

## normální mužský karyotyp 46, XY



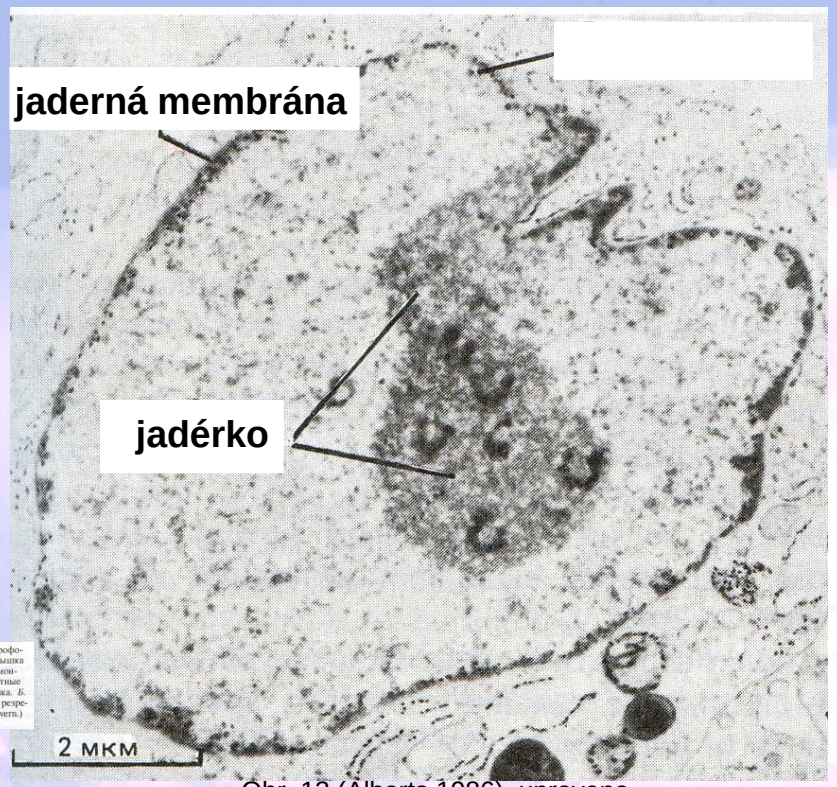

Obr. 12 (Dokumentace OLG FN Brno)

Pohlavní chromosomy:

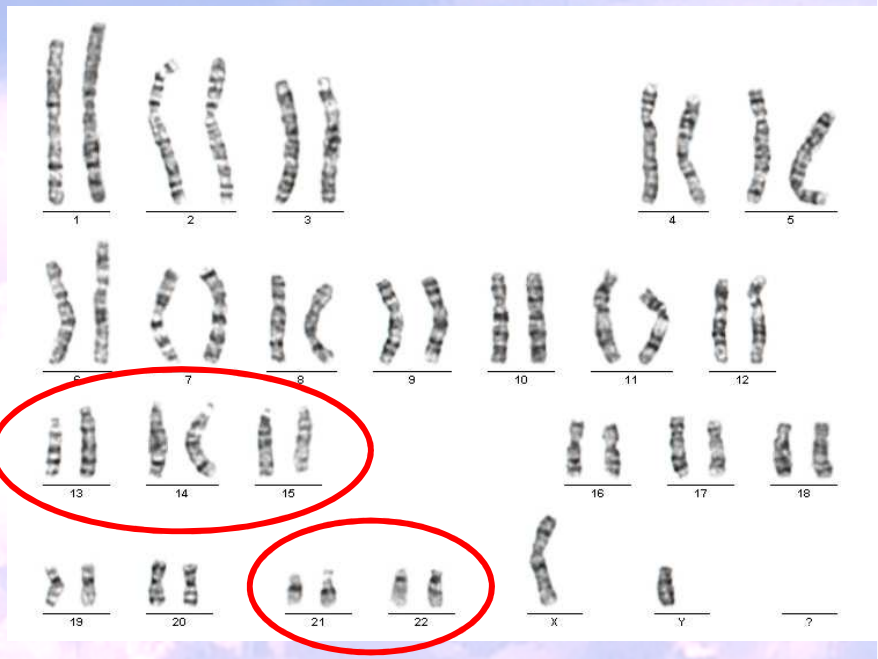
- chromosom X – podle velikosti a polohy centromery lze zařadit do **skupiny C**
- chromosom Y – velikostně se nejvíce blíží chromosomům skupiny G. Významný rozdíl mezi chromosomy 21, 22 a chromosomem Y je však ten, že chromosomy 21 a 22 mají satelity a chromosom Y na p raménčích **nenese satelity**.

# 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 konstrikce akrocentrických chromosomů
- **je přítomno v interfázním jádře, mizí v mitóze**




Obr. 13 (Alberts,1986), upraveno

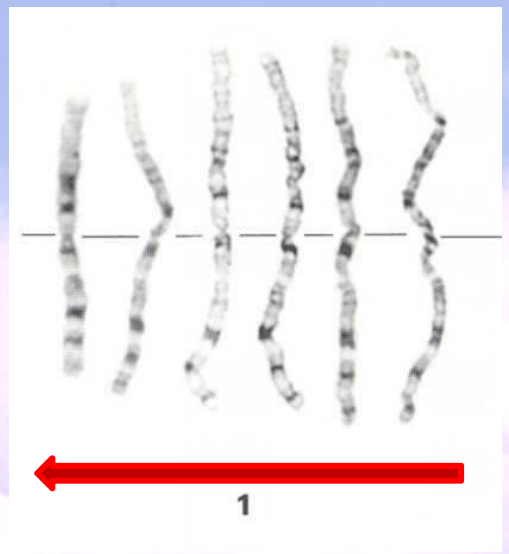


Obr. 14 (Dokumentace OLG FN Brno)

# STANOVENÍ POČTU PRUHŮ V HAPLOIDNÍ SADĚ CHROMOSOMŮ

Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

# Spiralizace chromosomů v mitóze




Různé délky chromosomů (chromosom č. 1) – závisí na stupni spiralizace chromosomů a zpracování suspenze buněk
- v různých mitózách se nacházejí chromosomy odlišné délky

400 pruhů 550 pruhů 850 pruhů

v haploidní sadě chromosomů

# Kritéria pro posouzení počtu pruhů v haploidní sadě

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

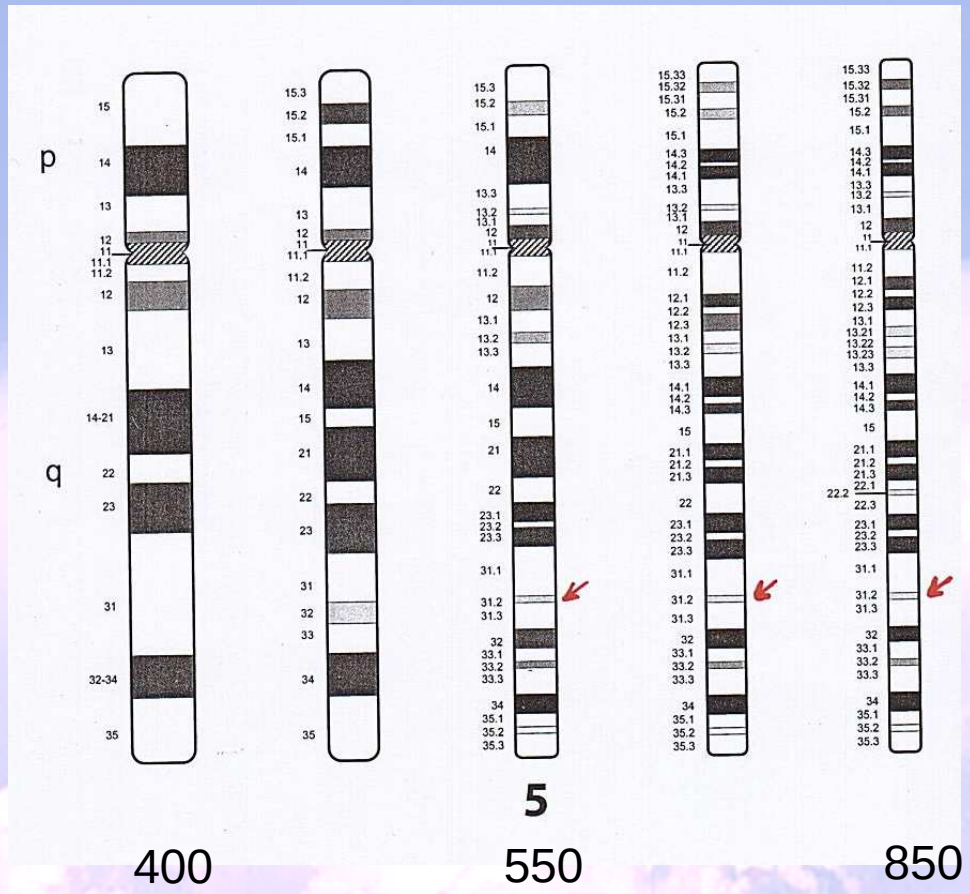
| | |
|---|---|
| **0** | No banding |
| **1** | Identification of some chromosomes by morphology and major landmarks |
| **2** POOR<br><300 band | Unequivocal identification of chromosomes due to major landmarks |
| **3**<br>300 band | 2 dark bands on 8p (8p12 & 8p22)<br>3 dark bands on 10q (10q21,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

# Kritéria pro posouzení počtu pruhů v haploidní sadě

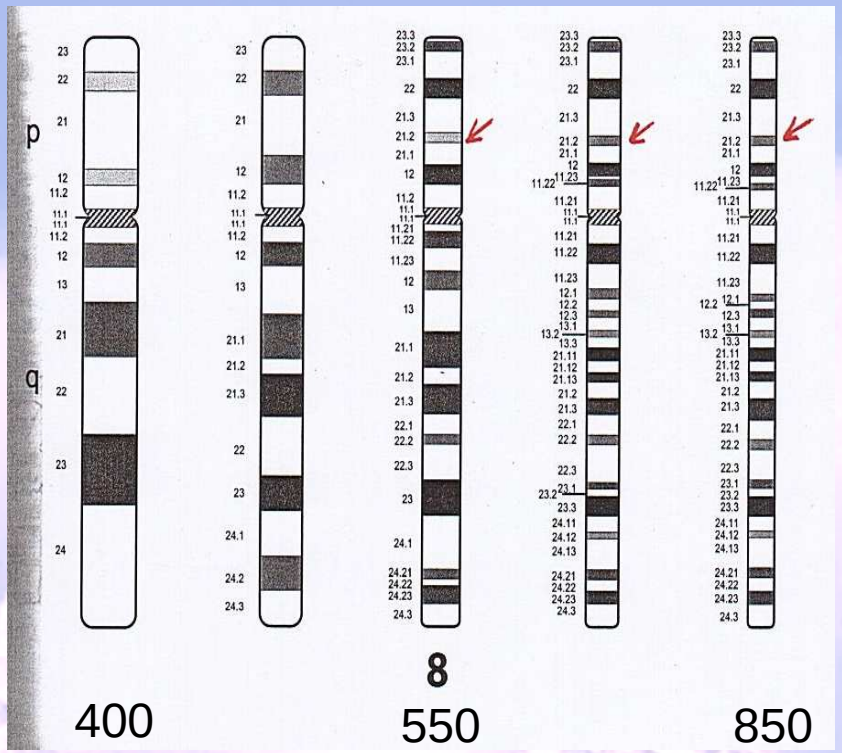
| | |
|---|---|
| **6** GOOD<br>550 band | 5q31.2 distinct<br>8p21.2 visible<br>2 dark bands on 11pter (11p15.2 & 11p15.4)<br>22q13.2 distinct |

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.

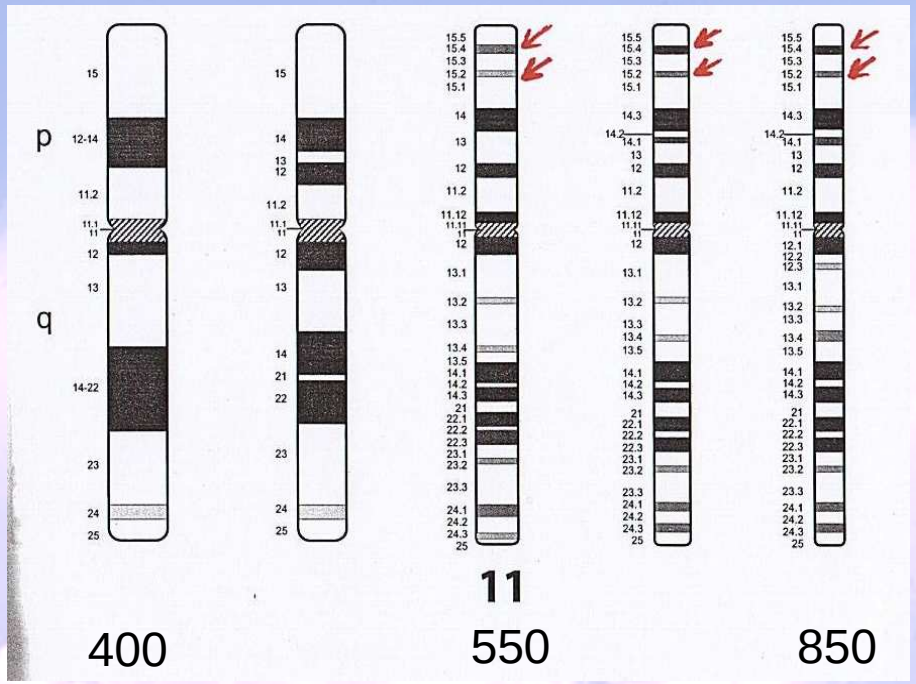
# Kritéria pro posouzení počtu pruhů v haploidní sadě



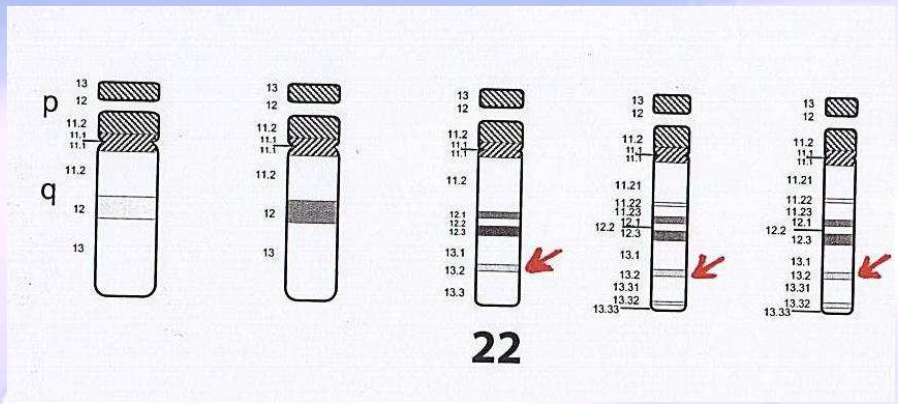
# Kritéria pro posouzení počtu pruhů v haploidní sadě



# Kritéria pro posouzení počtu pruhů v haploidní sadě



# Kritéria pro posouzení počtu pruhů v haploidní sadě




400 550 850

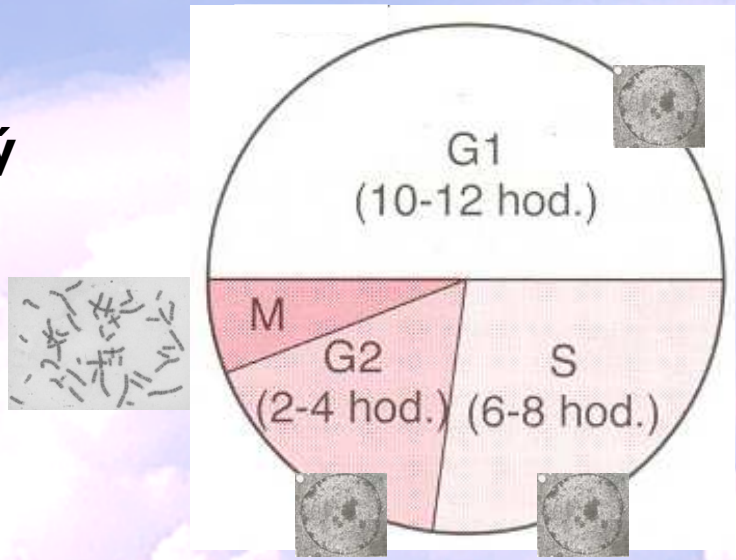
# GENETICKÝ MATERIÁL JÁDRA BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU

Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

# 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 - pouze konstitutivní heterochromatin zůstává trvale kondenzován)
- **M fáze = MITÓZA + cytokineze**
  dělení jádra a následně buňky - **kondenzace chromatinu, vznik chromosomů**, rozchod chromosomů do dceřiných buněk



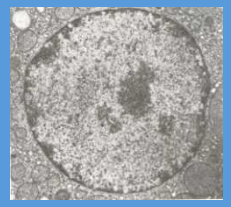

Obr. 17
Buněčný cyklus (Nussbaum, 2004), upraveno
Interfázní jádro (Alberts, 1986)
Mitóza (Dokumentace OLG FN Brno)

# JADERNÝ MATERIÁL

pojmy **chromatin** a **chromosomy** - týkají se téhož jaderného materiálu,
chromosomy jsou tvořeny chromatinem

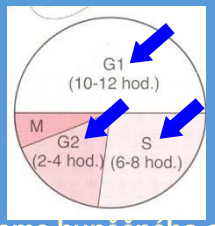
- **chromatin** – komplex molekul DNA a proteinů - různé stupně spiralizace
- **chromosom** – jednotlivé molekuly DNA + proteiny -
  spiralizované **v mitóze,** despiralizované v interfázi
  - tvořen 1 nebo 2 chromatidami v závislosti na fázi buněčného cyklu
- **chromatida** = 1 kontinuální molekula dvouvláknové DNA
  ve vazbě s chromosomovými proteiny
  spiralizované **v mitóze,** despiralizované v interfázi

jádro v interfázi



Obr. 18 (Alberts, 1986)

# CHROMATIN
## v interfázi




schema buněčného cyklu
- interfáze, upraveno

Obr. 19 (Nussbaum, 2004)

- **euchromatin** - dekondenzovaná forma chromatinu
  - **transkripčně aktivní chromatin** (přepis genů do RNA)
- **heterochromatin** - kondenzovaná forma chromatinu
  - **transkripčně inaktivní chromatin** (ale replikace probíhá)

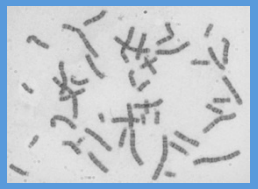
**konstitutivní heterochromatin**

- zůstává v kondenzovaném stavu a nepřepisuje se do RNA v průběhu celého buněčného cyklu (i v interfázi) ve všech buňkách a ve všech vývojových stádiích organismu
- **transkripčně trvale inaktivní**
- **centromery**, - **chromocentra** = oblasti konstitutivního heterochromatinu v interfázi

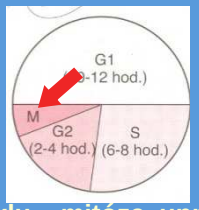
**fakultativní heterochromatin**

- **může přecházet ze stavu heterochromatinu do stavu euchromatinu**
- 1 z chromosomů **X** v buňkách **samic savců** je tvořen euchromatinem, 2. heterochromatinem. Na počátku vývoje jedince jsou oba euchromatinové, v rané fázi embryogeneze dochází k inaktivaci jednoho chromosomu.

# CHROMOSOMY
## v mitóze

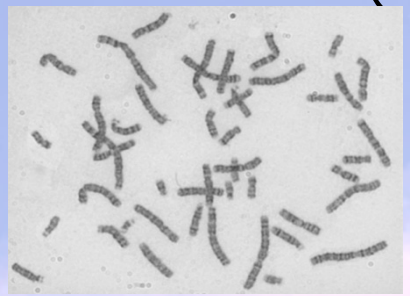


Obr. 20 (Dokumentace OLG FN Brno)

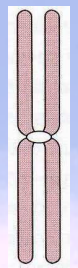



schema buněčného cyklu – mitóza, upraveno
Obr. 21 (Nussbaum, 2004)

- **vyšetřujeme** chromosomy, které jsou tvořeny dvěma chromatidami (v metafázi nebo prometafázi mitózy)



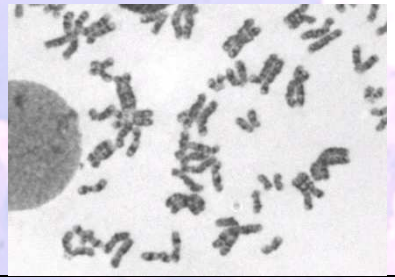
Obr. 22 (Dokumentace OLG FN Brno)



Obr. 23 Schema chromosomu (Nussbaum, 2004)

mitóza - metafázní chromosomy, tvořené dvěma chromatidami

- v anafázi mitózy se chromatidy každého chromosomu rozcházejí k opačným pólům dělícího vřeténka - každý chromosom je tvořen jednou chromatidou (chromosomy v této podobě **nevyšetřujeme**)



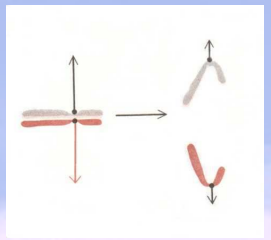
Obr. 24 (Dokumentace OLG FN Brno)

Obr. 25 Schema chromosomu (Nussbaum, 2004)

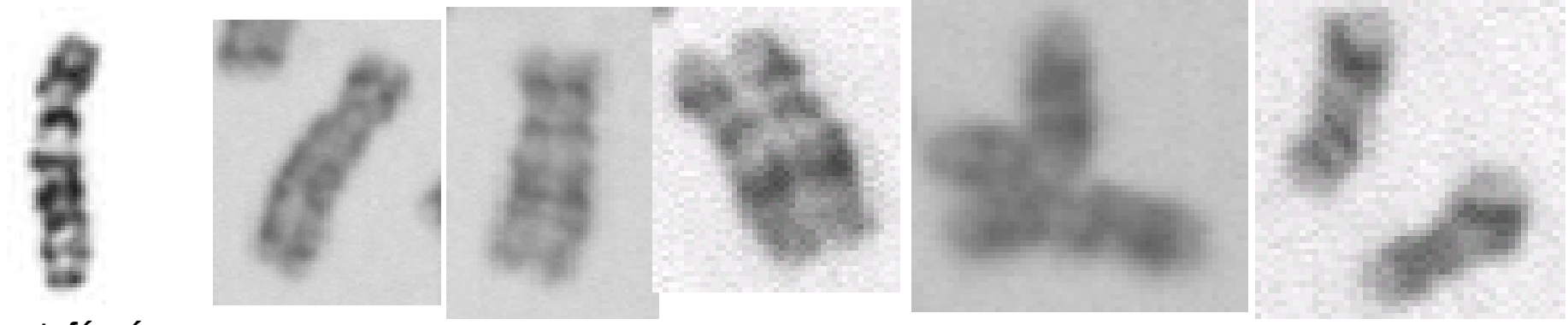
mitóza - anafázní chromosomy, po rozchodu chromatid k pólům dělícího vřeténka jsou tvořeny jednou chromatidou

# CHROMOSOMY - metafáze a anafáze mitózy

chromosomy - rozchod sesterských chromatid v anafázi mitózy



Obr.26 (Alberts, 1986)



**metafázní dvouchromatidový chromosom**

**průběh rozchodu chromatid**

**dva jednochromatidové chromosomy**

Obr. 27 Reálné chromosomy (Dokumentace OLG FN Brno)

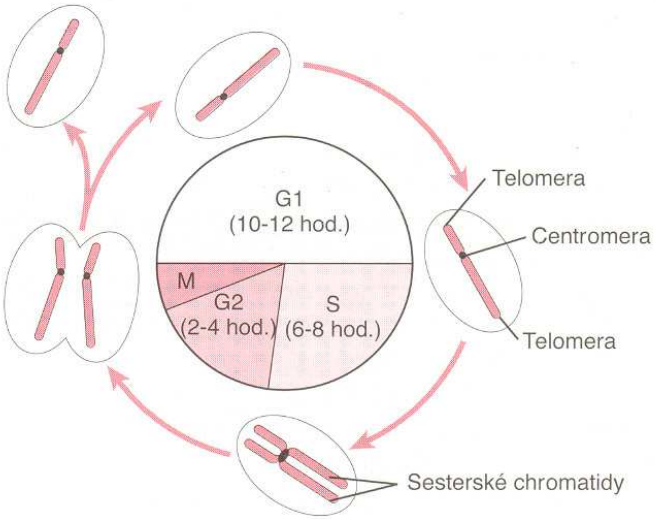
# CHROMOSOMY / CHROMATIDY

## Chromosom tvořen 1 chromatidou
## NEBO
## Chromosom tvořen 2 chromatidami

**Chromosom je tvořen 1 chromatidou (1 molekulou DNA):**

- konec anafáze mitózy (chromosom spiralizován)
- telofáze mitózy, cytokineze
- G1 fáze interfáze (chromosom despiralizován)
- do počátku S fáze interfáze (chromosom despiralizován)

**S fáze interfáze** - replikace (zdvojení) molekul DNA - chromatidy, které se nacházejí v despiralizovaném stavu, jsou zdvojeny, vznik sesterských chromatid, vzájemně identických kopií v rámci každého chromosomu;
každý chromosom je tvořen dvěma chromatidami



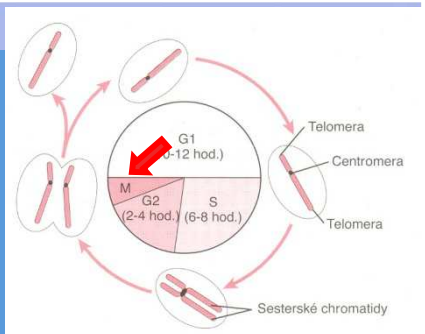

**Obrázek 2.1** Typický mitotický cyklus, popsaný v textu. Vyznačeny jsou telomery, centromery a sesterské chromatidy.

Obr. 28 (Nussbaum, 2004)

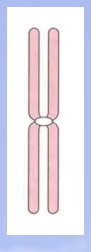
**Chromosom je tvořen 2 chromatidami (2 identickými molekulami DNA):**

- konec S fáze interfáze (despiralizované)
- G2 fázi interfáze (despiralizované)
- profáze, prometafáze a metafáze mitózy - postupná spiralizace chromosomů
- počátek anafáze mitózy - chromosomy jsou tvořeny 2 chromatidami, během této fáze mitózy dochází k podélnému dělení centromery a rozchodu sesterských chromatid každého chromosomu k protilehlým pólům jádra, na konci anafáze jsou chromosomy tvořeny 1 chromatidou

# MITÓZA



Obrázek 2.1 Typický mitotický cyklus, popsaný v textu. Vyznačeny jsou telomery, centromery a sesterské chromatidy.



profáze ➡ prometafáze ➡ **metafáze**

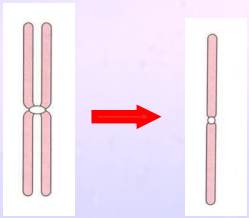
– postupné zkracování molekul DNA (chromosomů) v důsledku **spiralizace**

Obr. 30 Schema chromosomu (Nussbaum, 2004)

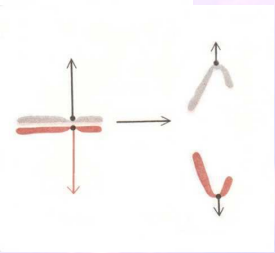
Obr. 29 (Nussbaum, 2004)

Obr. 31 (ISCN 1995)

- anafáze – oddělení sesterských chromatid chromosomů v centromeře, segregace k protilehlým pólům jádra (46 chromosomů ➡ 92 chromosomů)

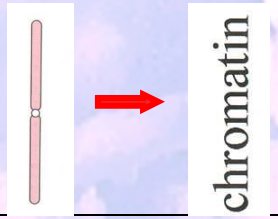


Obr. 32 Schema chromosomu (Nussbaum, 2004)



Obr. 33
(Alberts, 1986)

- telofáze – počátek dekondenzace chromosomů, tvorba jaderného obalu kolem dceřinných jader
- cytokineze – rozdělení cytoplazmy původně mateřské buňky




Obr. 34 Schema chromosomu (Nussbaum, 2004)

# Doporučená literatura

1) Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F.: Klinická genetika, Triton, 6. vydání, 2004, ISBN 80-7254-475-6

# Použitá literatura

## Text:


1) Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F.: Klinická genetika, Triton, 6. vydání, 2004, ISBN 80-7254-475-6
2) Kuglík P.: Vybrané kapitoly z cytogenetiky, Masarykova univerzita v Brně, 1. vydání, 2000, ISBN 80-210-2334-1
3) Rosypal S., Rosypalová A., Vondrejs V.: Molekulární genetika. SPN Praha, 2. přepracované a doplněné vydání, 1989, ISBN 80-04-23117-9
4) Therman E., Susman M.: Human Chromosomes, Structure, Behavior, and Effects, Springer – Verlag, Third edition, 1993, ISBN 0-387-97871-2


## Obrázky:


1) Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F.: Klinická genetika, Triton, 6. vydání, 2004, ISBN 80-7254-475-6
2) ISCN 1995, Mitelman (ed), S. Karger, Basel 1995, ISBN 3-8055-6226-8
3) Alberts a kol.: Molekulární biologie buňky, překlad do ruského jazyka, „Mir" 1986
4) Nečas a kol.: Biologie – učebnice pro lékařské fakulty, 2. přepracované a rozšířené vydání, Avicenum, Zdravotnické nakladatelství, 1989
5) Ham: Histologie, překlad do ruského jazyka, „Mir" 1983