

# Základy klinické cytogenetiky

Hanáková M.



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# Shrnutí přednášky

- základní pojmy klinické cytogenetiky - chromozom, mitóza, karyotyp, třídění chromozomů
- metody klasické cytogenetiky – odběr materiálu, kultivace, zpracování, pruhování, barvení
- vrozené chromozomové aberace, meióza a poruchy v meióze, získané chromozomové aberace, příklady využití v klinické cytogenetice
- metody molekulární cytogenetiky, příklady využití v klinické cytogenetice
- nádorová cytogenetika
- preimplantační genetická diagnostika



# Základní pojmy klinické cytogenetiky



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# DEFINICE A HISTORIE

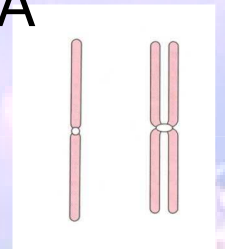
- **klinická cytogenetika** se zabývá analýzou **chromozomů** (jejich počtem a morfologií), jejich segregací v meióze a mitóze a vztahem mezi nálezy chromozomových aberací a fenotypovými projevy.
- **vznik moderní lidské cytogenetiky** se datuje od roku 1956, kdy Tjio a Levan vyvinuli efektivní metodiky chromozomální analýzy a stanovili, že normální počet lidských chromozomů je **46**.



# JADERNÝ MATERIÁL

pojmy **chromatin** a **chromozomy** - týkají se téhož jaderného materiálu, odlišnost ve stupni spiralizace v závislosti na fázi buněčného cyklu

- **chromatin** – komplex DNA s chromozomovými proteiny a RNA (pojem používaný pro **interfázi**)
- **chromozom** – chromatin spiralizovaný **v mitóze**
- **chromatida** = 1 kontinuální molekula dvoušroubovicové DNA ve vazbě s chromozomovými proteiny a RNA (spiralizovaná **v mitóze**)



Jestliže chceme vysledovat osud chromatid chromozomu v interfázi, hovoříme o "chromatidách" i v despiralizované podobě. Chromozom se skládá z 1 nebo 2 chromatid (v různých fázích spiralizace) v závislosti na fázi buněčného cyklu

# CHROMATIN

- **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 ve všech buňkách a ve všech vývojových stádiích organismu
- transkripčně trvale inaktivní
- **centromery**, - **chromocentra** = oblasti konstitutivního heterochromatinu v interfázi

## **fakultativní heterochromatin**

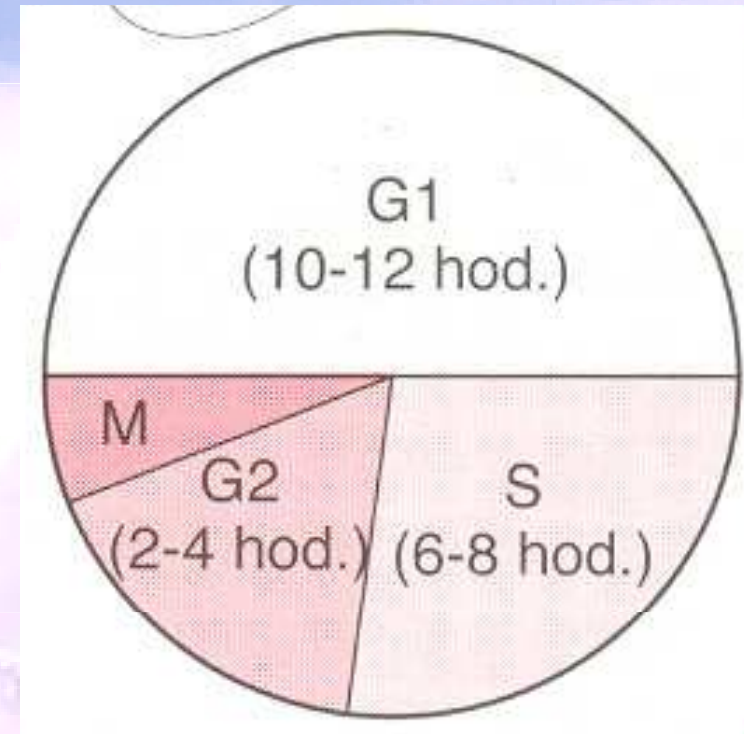
- může přecházet ze stavu heterochromatinu do stavu euchromatinu



# CHROMATIN A CHROMOZOMY BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU

buněčný cyklus **somatických** buněk  
(interfáze + mitóza)

- **G1, S, G2 fáze = INTERFÁZE**  
nejdelší fáze buněčného cyklu,  
chromatin je **málo kondenzovaný**  
**nebo dekondenzovaný**  
(pouze konstitutivní  
heterochromatin zůstává trvale  
kondenzován)
- **M fáze = MITÓZA**  
buněčné dělení –  
**kondenzace chromatinu,**  
vznik chromozomů

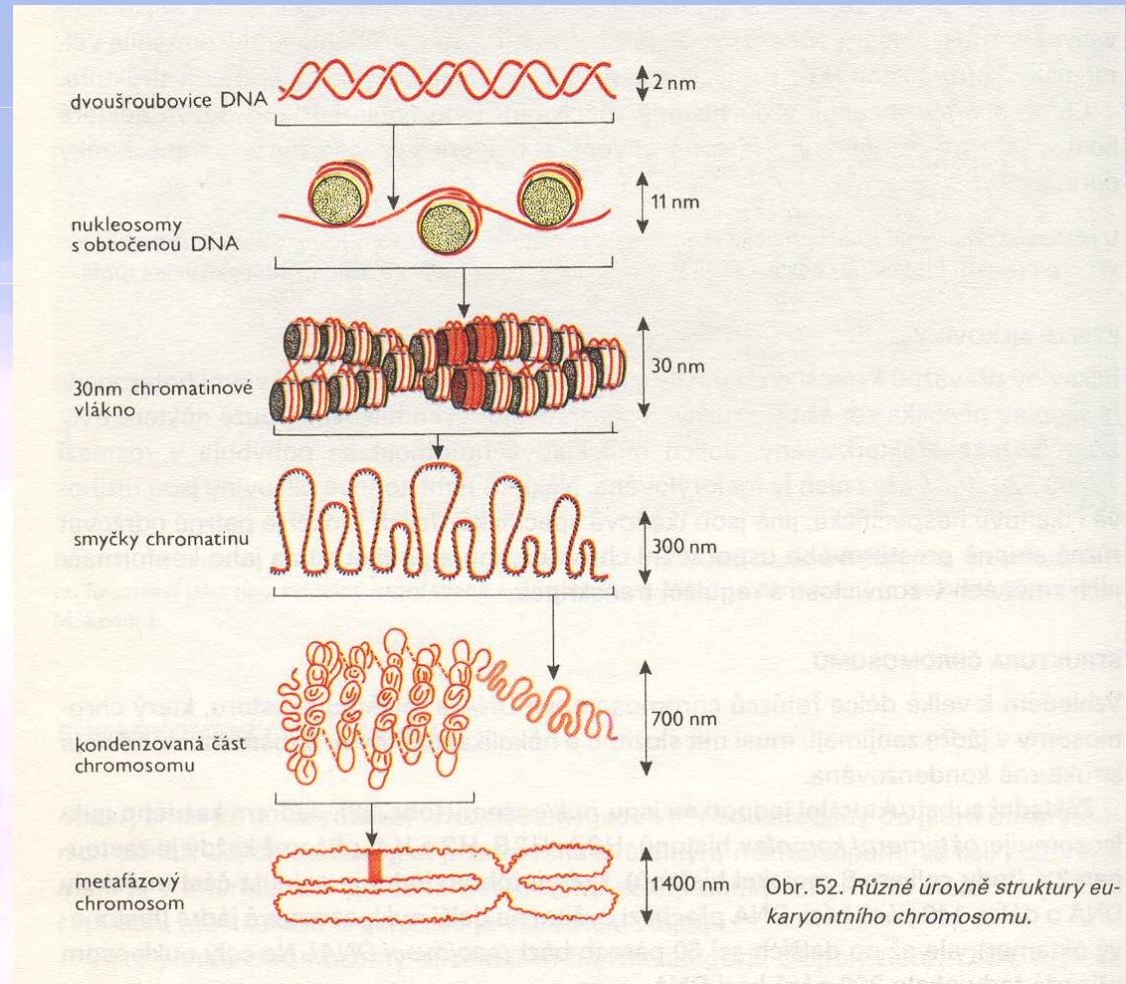


# CHROMATIN A CHROMOZOMY

## BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU

### kondenzace chromatinu, vznik chromozomů

během buněčného cyklu se chromatin nachází v různých fázích spiralizace (v interfázi nízký stupeň spiralizace, během mitózy postupná kondenzace, maximální v metafázi mitózy)





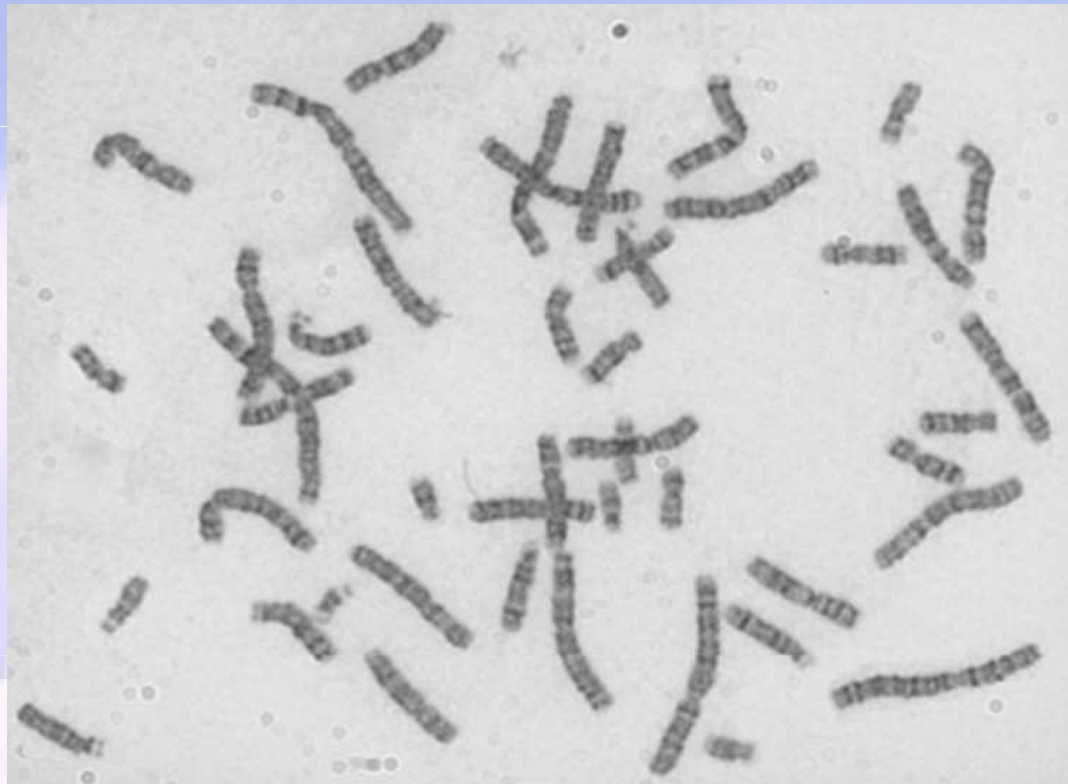
# CHROMATIN A CHROMOZOMY BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU- interfáze

buňka v interfázi  
(v jádře málo  
kondenzovaný  
a dekonenzovaný chromatin)



# CHROMATIN A CHROMOZOMY BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU- metafáze mitózy

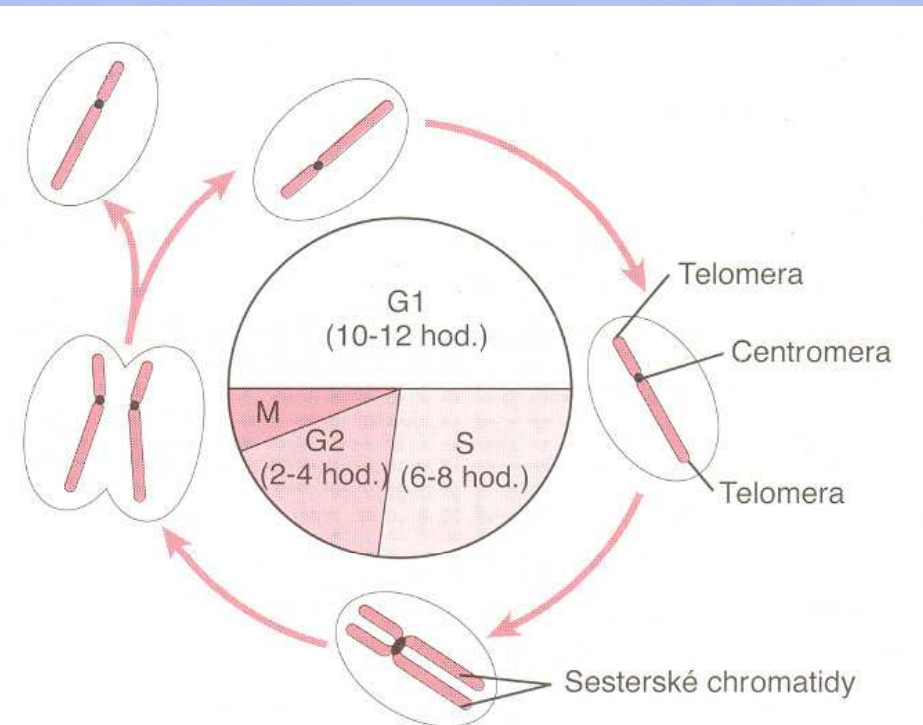
metafázní chromozomy ve světelném mikroskopu  
(chromozomový rozptyl, pracovní mitóza)



zvětšení 1250x

# CHROMATIN A CHROMOZOMY BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU interfáze

**G1 fáze** každý chromozom je tvořen **1 chromatidou**  
**S fáze** = syntetická fáze  
každý chromozom se zdvojí (zreplikuje), tzn. je tvořen **dvěma chromatidami**  
**G2 fáze** každý chromozom je tvořen **dvěma chromatidami**



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

# CHROMATIN A CHROMOZOMY BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU mitóza

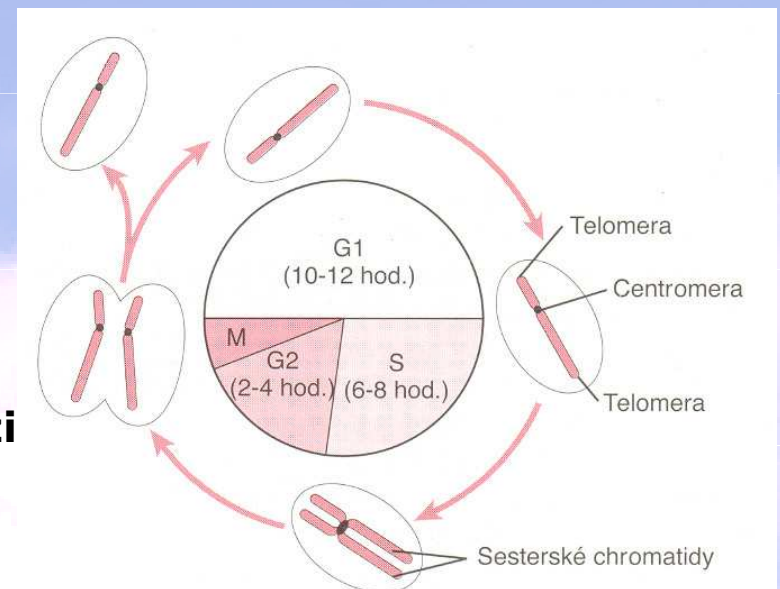
## M fáze = MITÓZA

postupná kondenzace chromatinu až do maxima v **metafázi**, vznik chromozomů (chromozomy tvořeny **dvěma chromatidami**)

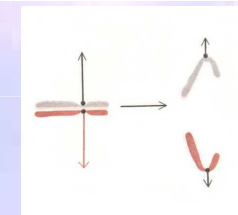
oddělení sesterských chromatid v centromere v **anafázi** (chromozomů je dvojnásobný počet a jsou tvořeny **jednou chromatidou**) – podélné dělení centromery

**segregace dceřinných chromatid (samostatných chromozomů)**, pohybují se k protilehlým pólům buňky

mitóza je dokončena cytokinezí - rozdělením cytoplazmy původně mateřské buňky za vzniku dvou dceřinných buněk, jejichž jádra obsahují stejnou genetickou výbavu jako buňka mateřská (**dělení buňky**)



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

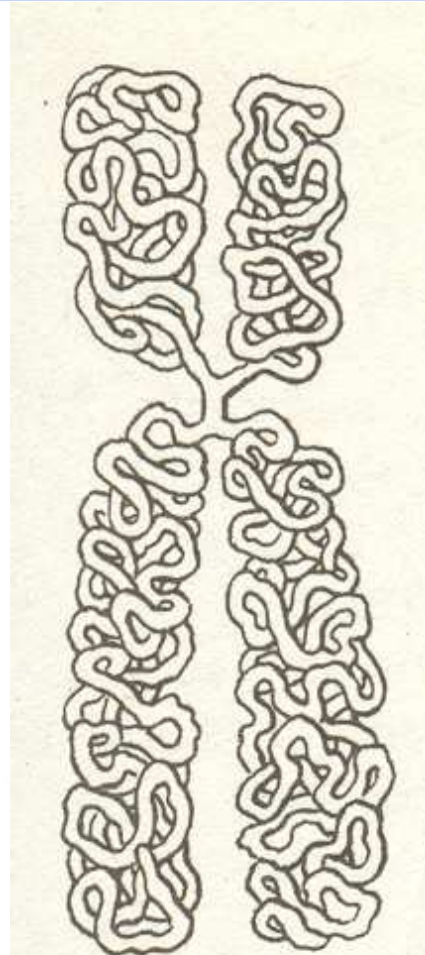
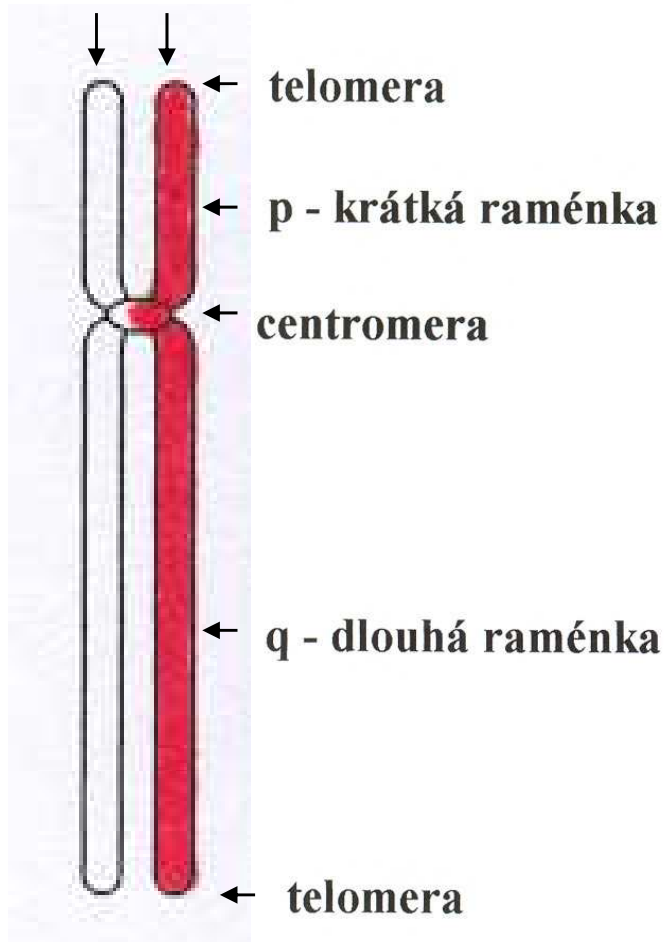


rozchod dceřinných chromatid v anafázi mitózy

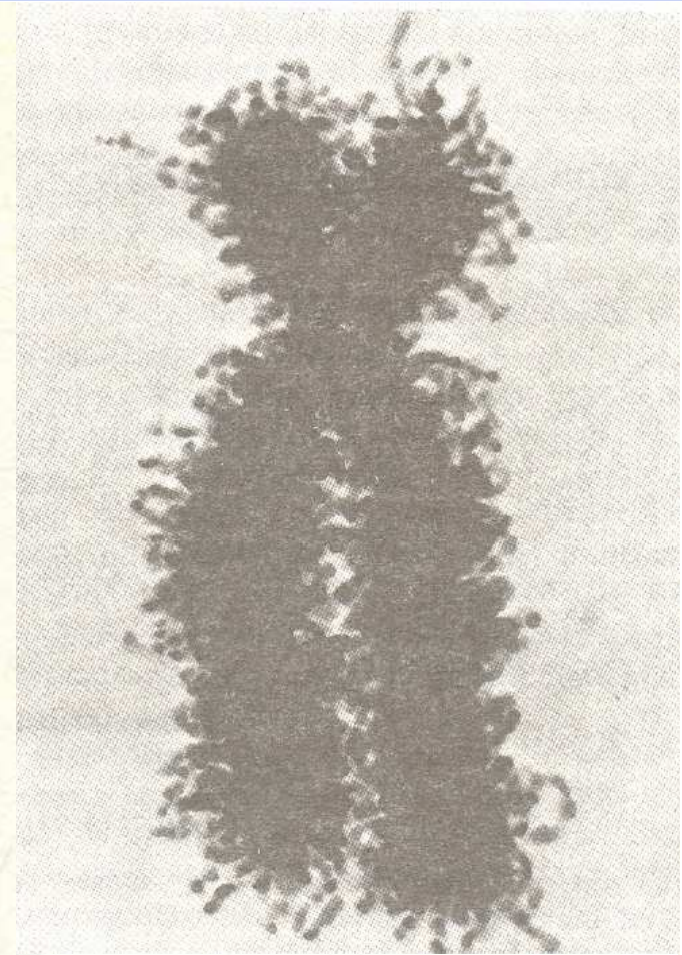
# CHROMOZOM

## tyčinková organela

sesterské chromatidy  
(identické kopie)



Submikroskopická stavba chromozómu



Электронная микрофотография хромосомы 12 человека. Такая хромосома состоит из хроматина, уложенного в волокна диаметром 200–300 Å и длиной 700–800 мкм, и содержит двухцепочечную ДНК общей длиной около 4 см [1314].

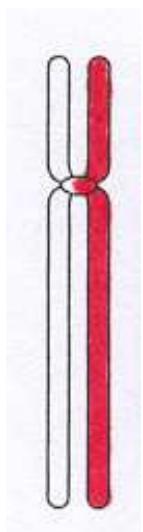
# CHROMOZOM

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

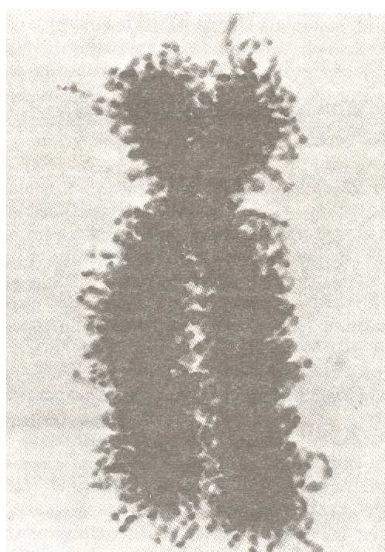


# CHROMOZOMY V PRAAXI

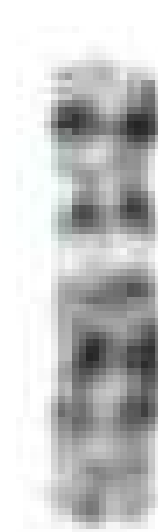
schema chromozomu



chromozom  
z elektronového miroskopu



chromozom  
z naší laboratoře



**dvouchromatidový metafázní chromozom** ↑

v preparátu vhodném pro naše účely jsou sesterské chromatidy těsně u sebe, chromozom se jeví jako 1 tyčinka

# CHROMOZOMY V PRAXI

## karyotyp

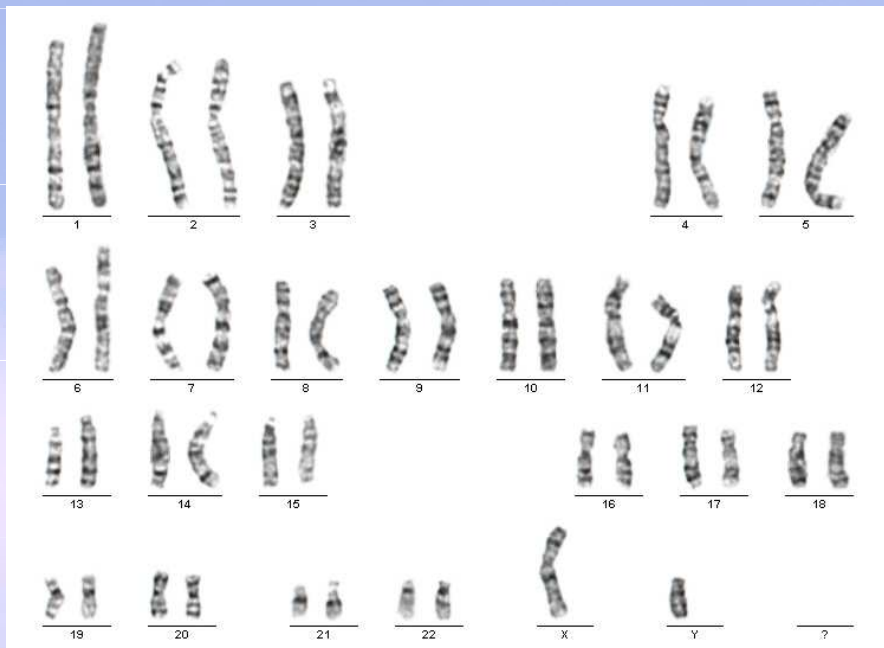
- **soubor chromozomů jedince** nebo buňky s označením jejich **počtu, druhu pohlavních chromozomů** a případných **aberrací** (zápis karyotypu např. 46,XX)
- běžné označení pro soubor metafázních chromozomů buňky uspořádaných podle standardní klasifikace
- lidský karyotyp se skládá ze **46 chromozomů**, z toho **22 párů autozomů** (nepohlavních chromozomů) a **2 gonozomů** (pohlavních chromozomů)
- chromozomový pár je tvořen **homologními** chromozomy, z nichž jeden je zděděn od otce a druhý od matky, nepárové chromozomy jsou **nehomologní** (somatické diploidní buňky)



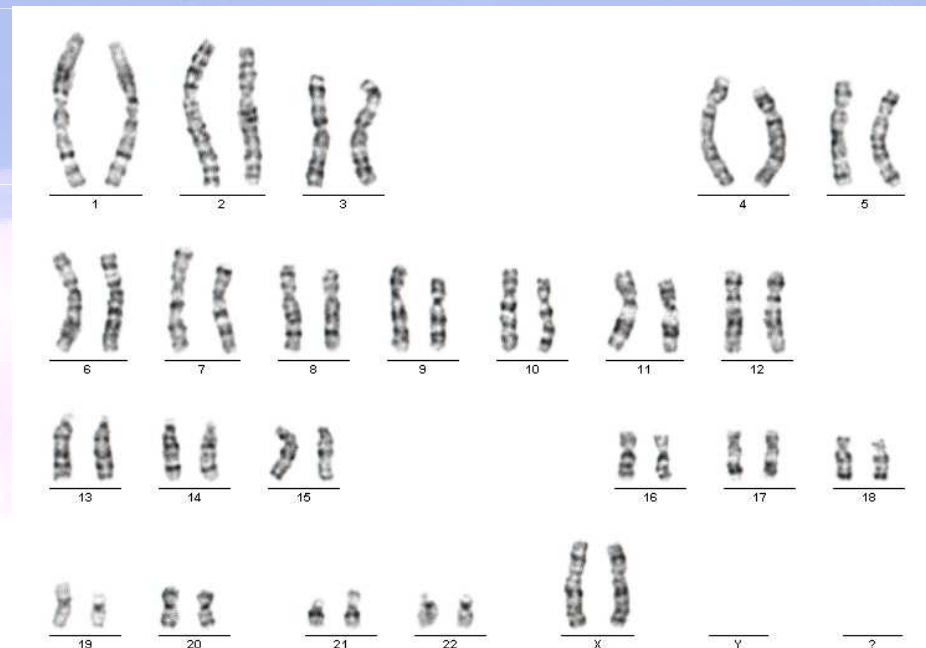


# CHROMOZOMY V PRAXI

## normální karyotyp



normální mužský karyotyp 46,XY

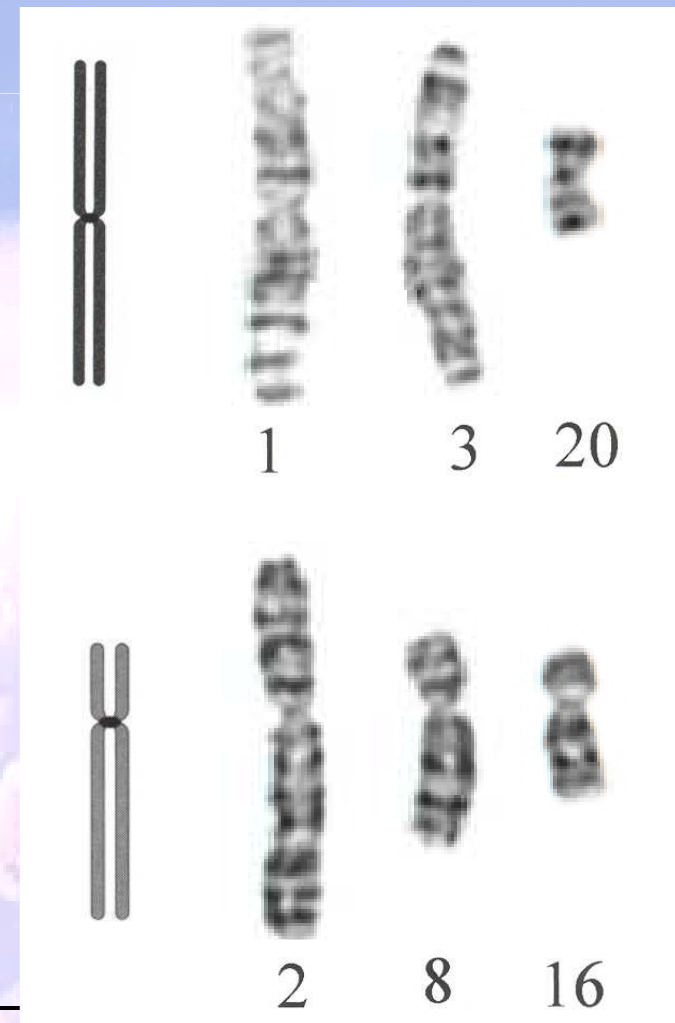


normální ženský karyotyp 46,XX

# CHROMOZOMY V PRAXI

## třídění chromozomů podle umístění centromery

- **metacentrické chromozomy**  
centromera téměř nebo úplně uprostřed, tedy krátká a dlouhá raménka jsou (téměř) stejně dlouhá
- **submetacentrické chromozomy**  
centromera mimo střed chromozomu, p a q raménka jsou jasně délkově odlišena



# CHROMOZOMY V PRAXI

## třídění chromozomů podle umístění centromery

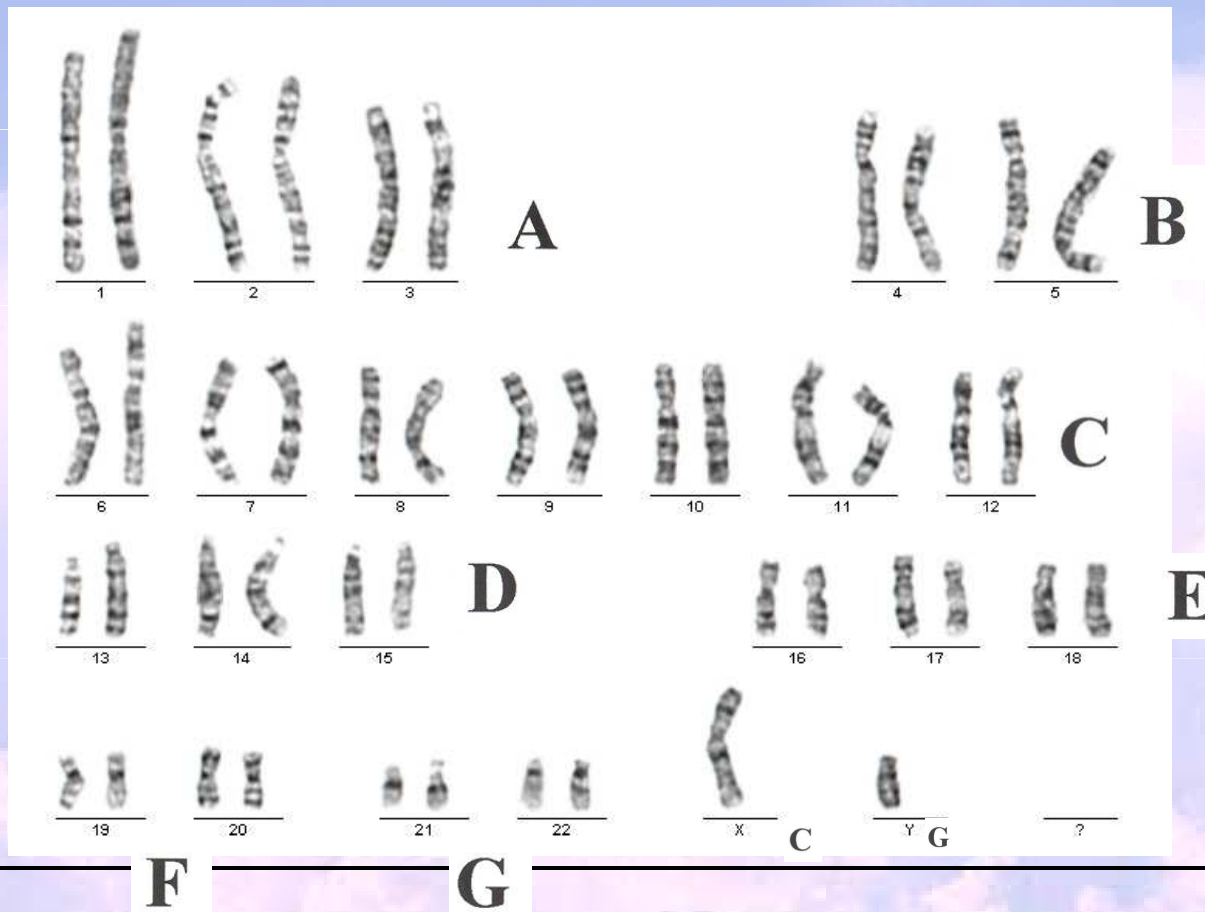
- **akrocentrické chromozomy**

centromera je umístěna **velmi blízko jednomu konci**; od krátkých ramének jsou odškrceny satelity (malé výrazné části konstitutivního heterochromatinu; místo odškrcení = sekundární konstriktce (tenké stopky))



# CHROMOZOMY V PRAXI

## třídění chromozomů do skupin podle velikosti a pozice centromery normální mužský karyotyp 46, XY



# Metody klasické cytogenetiky



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# CHROMOZOMY V PRAXI

## odběr materiálu

Odběr materiálu pro účely **cytogenetického vyšetření**, vždy za sterilních podmínek!!!

- do **heparinu** (nesrážlivá krev) – periferní krev, krev plodu (obv. 3 ml)
- do heparinu a transportního média – kostní dřeň (obv. 1-2 ml)
- do transportního média – solidní tumory, kůže (obv. 1x1 cm), choriové klky (obv. 20 mg)
- **bez přídavku** média a dalších látek – plodová voda (obv. 20 ml)



# CHROMOZOMY V PRAXI

## odběr materiálu

Odběr materiálu pro cytogenetickou analýzu a typy buněk, které jsou v konkrétním materiálu vhodné pro získání metafázních chromozomů :

- periferní krev – ze žíly – T-lymfocyty
- fetální krev – z pupečníku pod kontrolou UZ – nezralé T-lymfocyty
- plodová voda – z amniového vaku pod kontrolou UZ - kožní fibroblasty
- choriové klky – z chorionu nebo placenty - buňky choriových klků nebo placenty
- kůže – z potracených plodů, kožní biopsie pacientů – kožní fibroblasty
- kostní dřeň – z prsní kosti, kyčlí – prekurzory krevních buněk
- solidní tumory – z nádoru – maligní buňky



# CHROMOZOMY V PRAXI

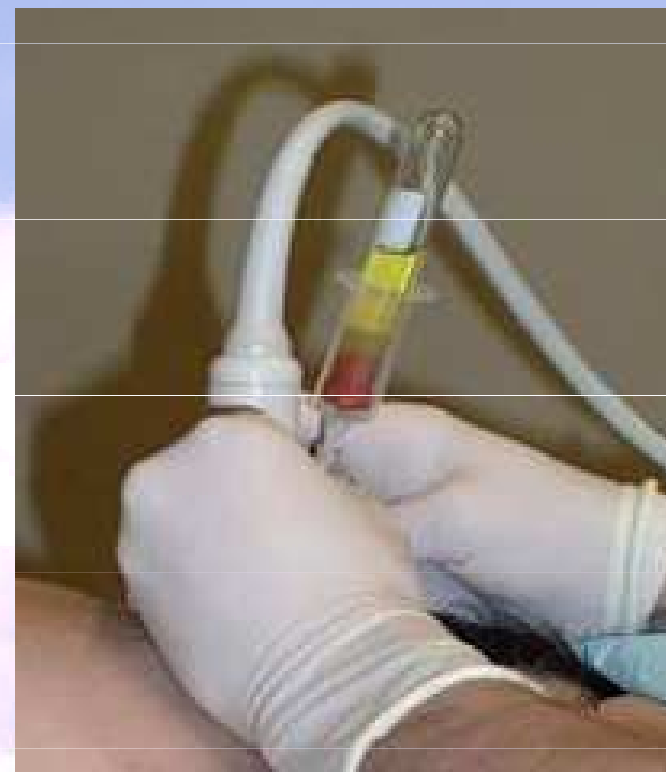
## odběr materiálu



odebraná  
periferní krev



odebrané choriové klky



odběr plodové vody



# CHROMOZOMY V PRAXI

## kultivace materiálu

- **kultivace v médiích určených pro konkrétní typ materiálu** (živiny, růstové faktory, antibiotika, přídavek speciálních přísad pro určitý typ materiálu, apod.)
- **délka kultivace**
  - **periferní krev – 72 hodin (stanovení karyotypu)**
    - **48 hodin (stanovení ZCA)**  
kratší doba kultivace - podmínkou je zachytit  
1. buněčné dělení, později dochází k reparaci chromozomů nebo k zániku buněk s aberací
  - krev plodu 72 hodin (stanovení karyotypu)
  - **plodová voda – průměrně 10 dní (stanovení karyotypu)**
  - choriové klky – přes noc (stanovení karyotypu)
  - **kostní dřev – přímé zpracování** buněk ihned po odběru
    - **24 hodin** (48 hodin spec. případy)  
**(stanovení karyotypu maligních klonů v KD)**
  - kůže – variabilní doba růstu (průměrně 2 týdny)
  - solidní tumory – minimálně 3 týdny  
(stanovení karyotypu maligních klonů v tumoru)



# CHROMOZOMY V PRAXI

## kultivace materiálu

- kultivace buněk **v suspenzi** (periferní krev, fetální krev, choriové klky, kostní dřeň)
- kultivace buněk **přichycených na dně** kultivační nádoby (plodová voda, solidní tumory, kůže) - po kultivaci pomocí roztoku trypsinu odloupneme ode dna, dále zpracováváme jako suspenzi buněk



# CHROMOZOMY V PRAXI

## kultivace materiálu



↑  
kultivace periferní krve

kultivace plodové vody



# CHROMOZOMY V PRAXI

## zpracování suspenze buněk

- **aplikace kolchicinu (alkaloid z ocúnu jesenního *Colchicum autumnale*)**
  - zastavení dělení buněk v **metafázi mitózy**
  - kolchicin je mitotický jed, který specificky inhibuje dělicí vřeténko a tím zastavuje dělení buněk v metafázi mitózy, kdy jsou chromozomy vhodné k analýze
- **hypotonizace** – lýza erytrocytů
- **fixace** - náhlé a trvalé zastavení veškerých životních pochodů buňky, odvodnění, rozpuštění cytoplazmy



# CHROMOZOMY V PRAXI

## zpracování suspenze buněk

- **vykapání suspenze buněk** na podložní sklíčko



# CHROMOZOMY V PRAXI

## barvení / pruhování chromozomů

- **barvení (analýza ZCA)**  
– Giemsovým barvivem (bez pruhování chromozomů, obarvuje chromozomy po celé délce, viz kapitola „Získané chromozomové aberace“)



- **pruhování chromozomů (analýza karyotypu, karyotypu maligních klonů)**



chromozomy s G - pruhy

- **speciální barvení – „C”- vizualizace heterochromatinu - důvětření nálezů na chromozomech (VCA)**

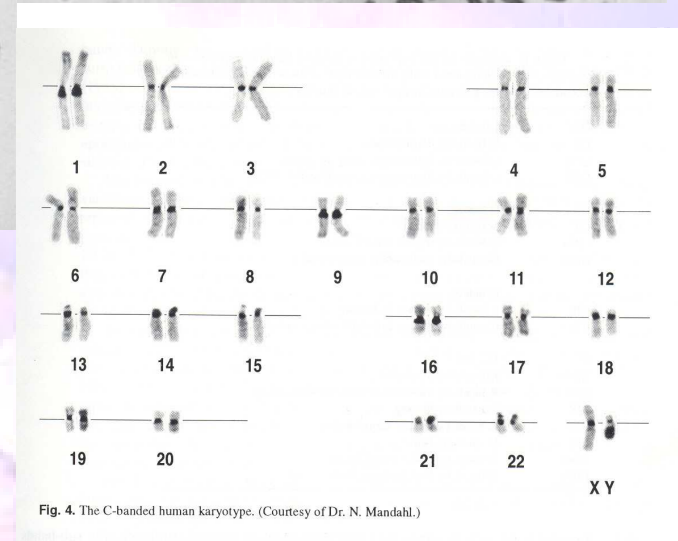
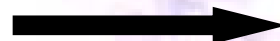


Fig. 4. The C-banded human karyotype. (Courtesy of Dr. N. Mandahl.)

„C” barvení

# CHROMOZOMY V PRAXI

## pruhování a speciální barvení chromozomů

- pruhovací metody umožňují individuální diferenciaci jednotlivých chromozomů (byly zavedeny v letech 1968 -71)
- do té doby bylo možné pouze obarvit chromozomy barvivem – orcein, karbolfuchsin, Feulgenovo barvivo a seřadit je do skupin podle velikosti a poměru krátkých a dlouhých ramének



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# CHROMOZOMY V PRAXI

## pruhování chromozomů

### G - pruhování

- nejčastěji rutinně užívaná metoda
- chromozomy jsou vystaveny účinkům trypsinu (proteolytický enzym), který natráví chromozomové proteiny
- chromozomy obarvíme Giemsovým barvivem (směs barviv)
- výsledek – každý chromozom se specificky obarví (střídané tmavé a světlé proužky různé tloušťky, tmavé proužky jsou bohaté na adenin a thymin, světlé na cytozin a guanin)
- získané pruhy jsou specifické pro každý chromozomový pár
- lze snadno rozpoznat strukturní a numerické abnormality
- 1 pruh na chromozomu obsahuje 50 i více genů

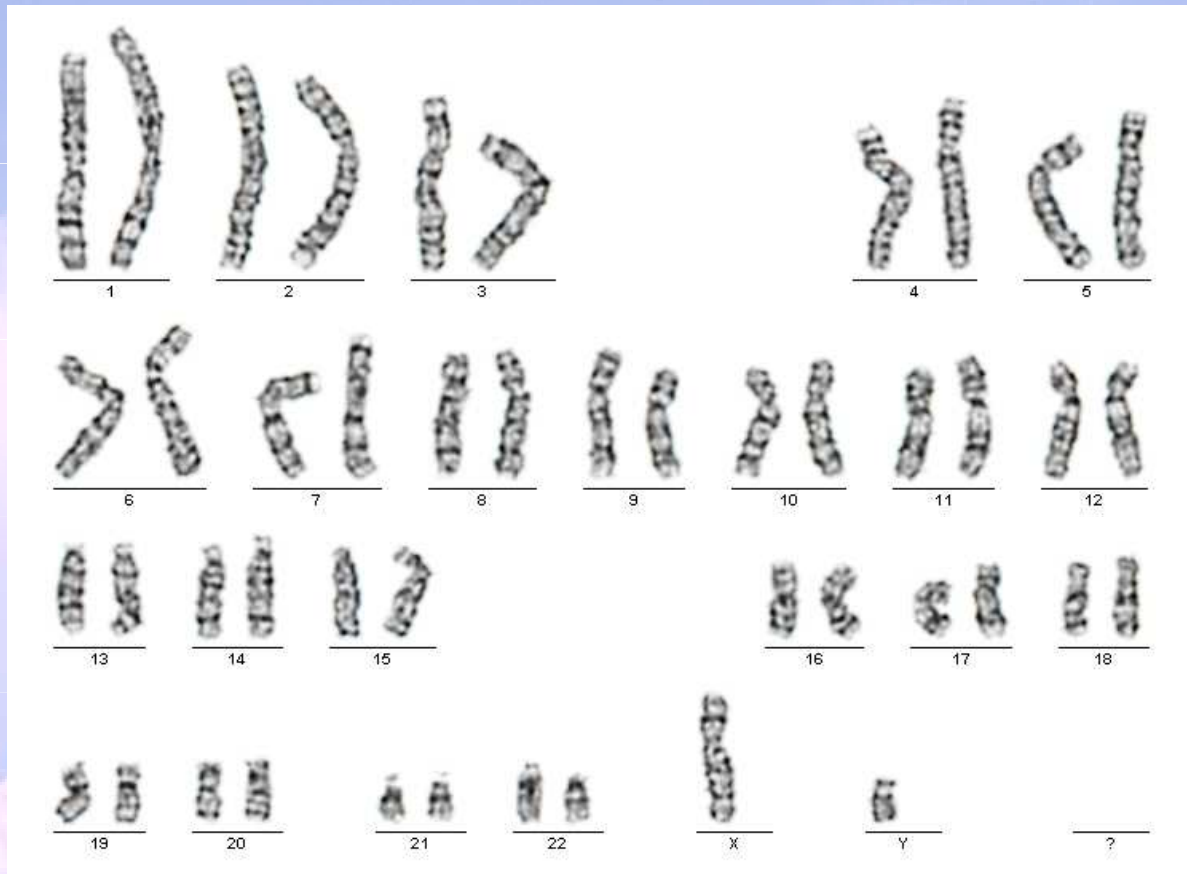


# CHROMOZOMY V PRAXI

## pruhování chromozomů

### G – pruhování

#### normální mužský karyotyp 46,XY



# CHROMOZOMY V PRAXI

## pruhování chromozomů

### další typy pruhování

- Q – pruhování – barvení akridinovými deriváty (fluoreskující látky – fluorochromy) – pruhy analogické jako u G – pruhování
- R – pruhování – R = reverse (opačné pruhy ve srovnání s G – pruhy) – zahřátí před obarvením

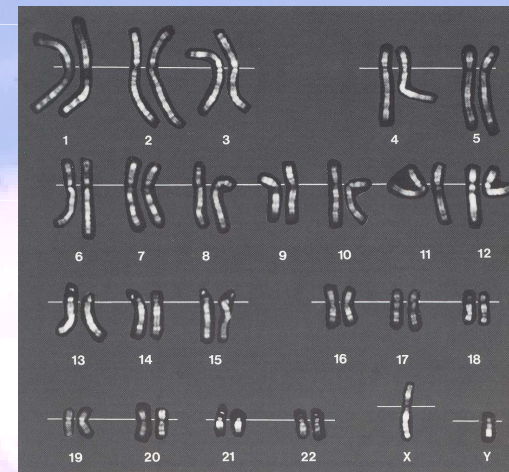


Fig. 1. The Q-banded human karyotype. (Courtesy of Dr. E. Magenis.)

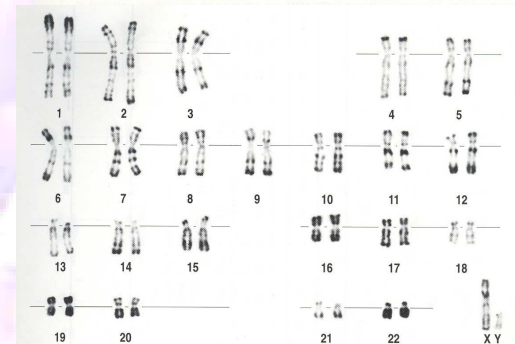
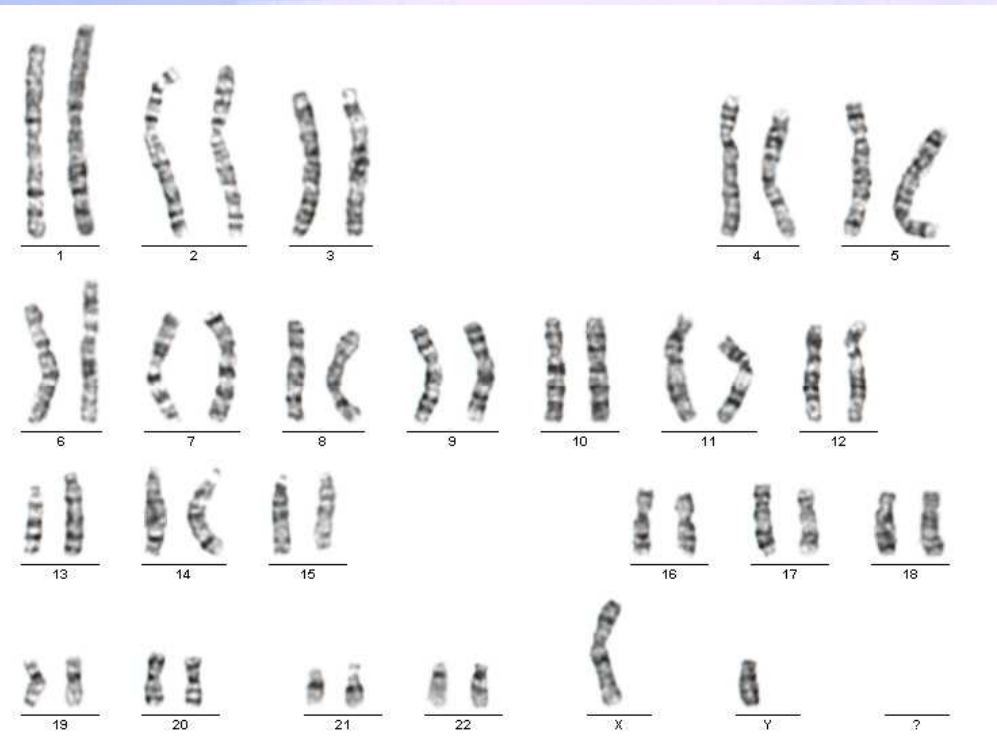


Fig. 3. The R-banded human karyotype. (Courtesy of Dr. B. Dutillaux.)

# CHROMOZOMY V PRAXI

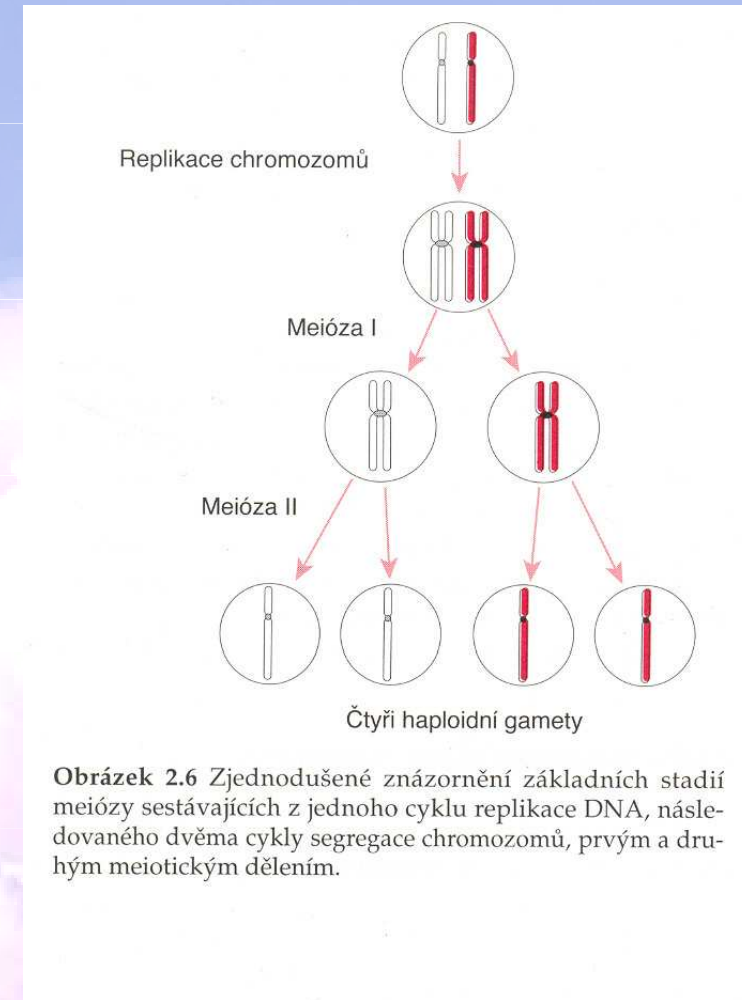
## hodnocení

Chromozomy hodnotíme ve **světelném mikroskopu** při zvětšení 1250x za použití imersních objektivů. Ke třídění chromozomů a sestavení karyotypu lze využít počítačového programu.



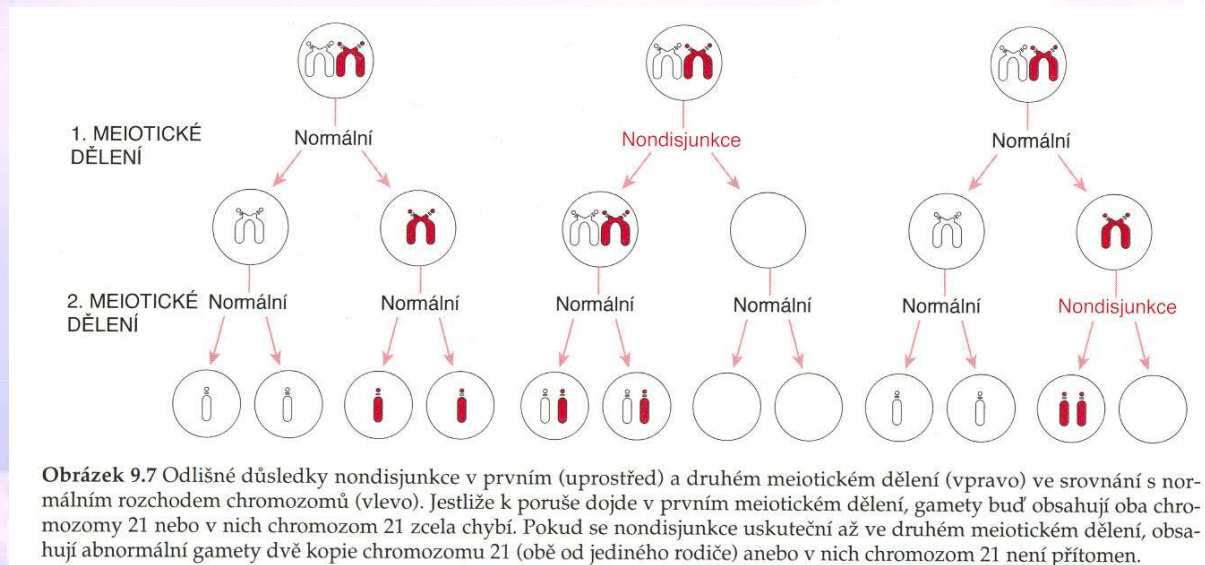
# MEIÓZA

- typ buněčného dělení, při kterém z diploidních zárodečných buněk (primárních oocytů a primárních spermatocytů) vznikají haploidní gamety (z 1 diploidní zárodečné buňky vzniknou 4 haploidní gamety)
- základní schema průběhu meiózy – proces zahrnuje 2 meiotická dělení
- meióza I – počet chromozomů je redukován z diploidního na haploidní, dochází k rekombinaci genetického materiálu – **meiotický crossing-over**
- meióza II – podobnost s mitózou – rozchod sesterských chromatid



# PORUCHY V MEIÓZE

- **meiotická nondisjunkce** – nejčastější mutační mechanismus našeho druhu, proces, při kterém se oba **chromozomy v páru** v anafázi meiotického dělení **přemístí ke stejnému pólu** místo aby segregovaly k opačným pólům - **porucha oddělení páru chromozomů** během jednoho ze dvou meiotických dělení (většinou v průběhu meiózy I)
- důsledkem nondisjunkce je **aneuploidie** – abnormální počet chromozomů v karyotypu, který je způsoben **absencí chromozomu nebo přítomností nadbytečného chromozomu**



# Vrozené a získané chromozomové aberace



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# CHROMOZOMOVÉ ABNORMALITY (ABERACE)

- vrozené chromozomové aberace (VCA)  
(vyšetření karyotypu) - početní  
- strukturní
  - prenatální a postnatální stanovení karyotypu (vyšetření karyotypu plodu, vyšetření dětí s vrozenými vývojovými vadami, párů s poruchou fertility ....)
- získané chromozomové aberace (ZCA)  
(stanovení % aberantních buněk)
  - vyšetření u pacientů, kteří pracují v rizikovém prostředí (kontakt se škodlivými látkami, zářením) ....



# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) abnormality počtu chromozomů

- **abnormality počtu chromozomů**

- **polyploidie** – počet chromozomů je více než dvojnásobkem haploidního počtu ( $n = 23$ ) (triploidie  $3n = 69$ , tetraploidie  $4n = 92$ ),

**většinou pouze u plodů** (samovolné aborty)

- **aneuploidie** – jev, kdy dochází k chybění nebo nadbytku chromozomů ve všech buňkách jedince nebo v jedné či více jeho buněčných liniích v důsledku chybného rozchodu chromozomů **v meióze**

**nejčastější a klinicky velmi významný typ chromozomových poruch**





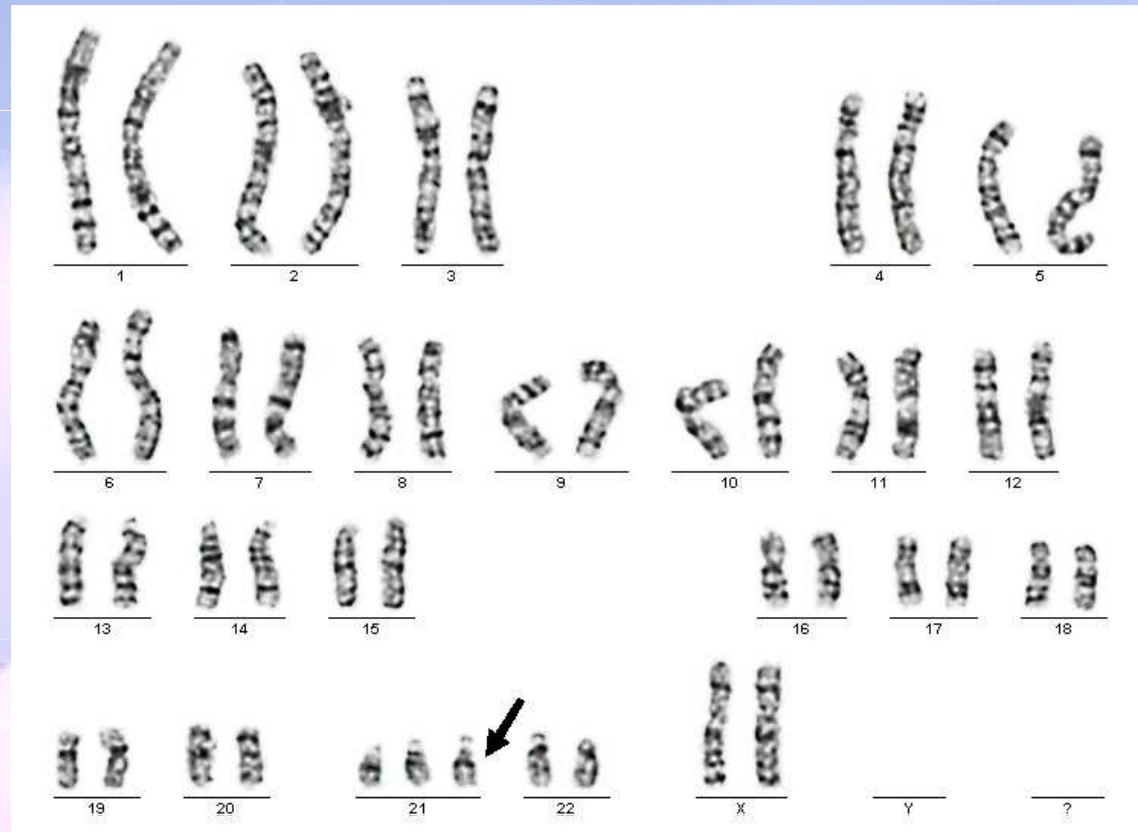
# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) abnormality počtu chromozomů aneuploidie

- **trizomie** – nejčastější porucha  
(místo 2 chromozomů v páru přítomny 3)
  - **trizomie autozomů** (trizomie celého chromozomu je jen vzácně slučitelná se životem)
    - Downův syndrom 47,XX/XY, +21
    - Edwardsův syndrom 47,XX/XY, +18
    - Patauův syndrom 47,XX/XY, +13
  - **trizomie gonozomů** (fenotypové důsledky jsou méně závažné než u trizomie autozomů)
    - Klinefelterův syndrom
    - další syndromy

# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA)

abnormality počtu autozomů  
Downův syndrom

Downův syndrom 47, XX, +21



# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA)

abnormality počtu autozomů

Edwardsův syndrom

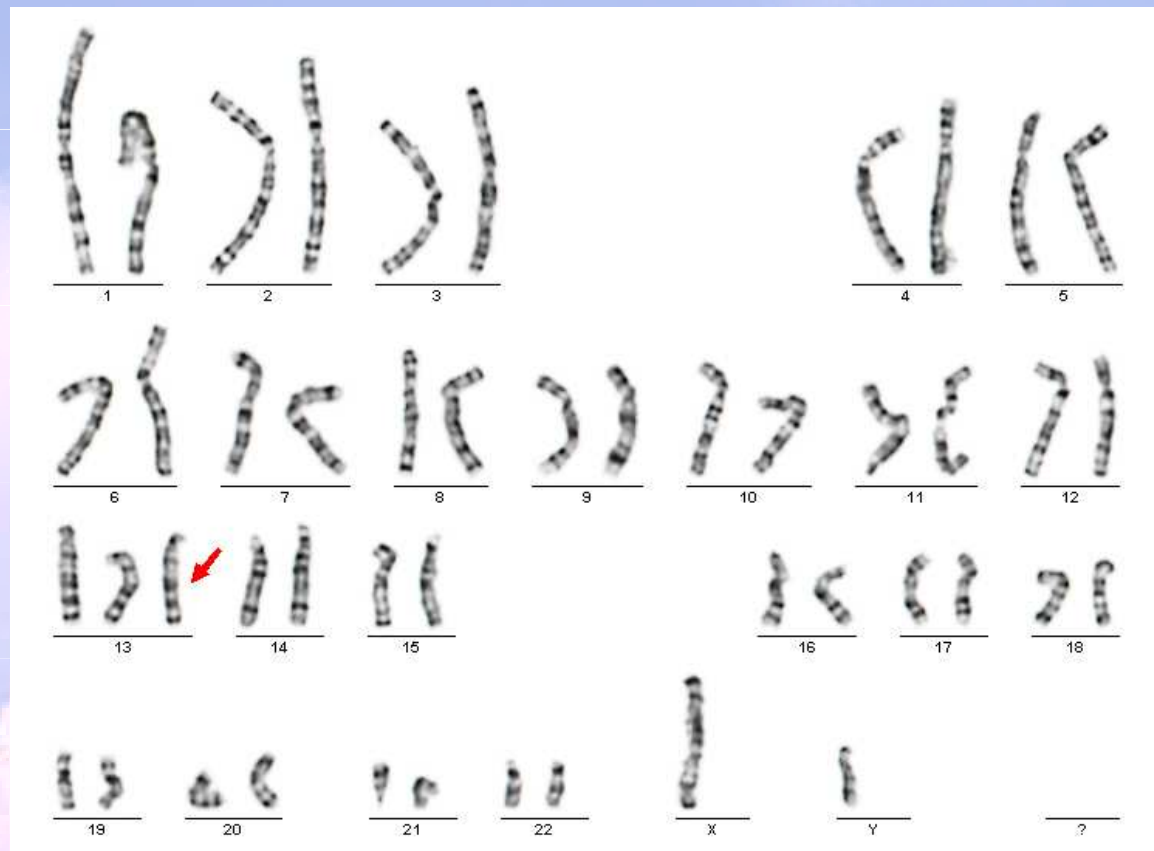
Edwardsův syndrom 47,XY,+18



# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA)

abnormality počtu autozomů  
Patauův syndrom

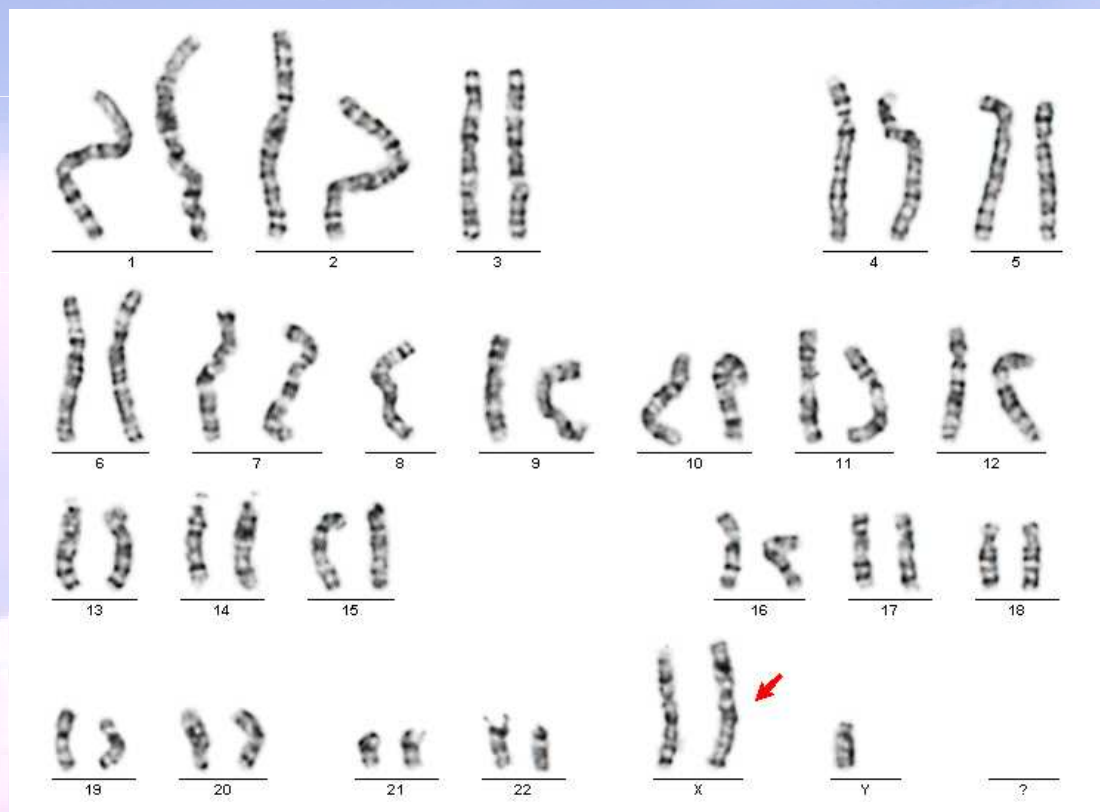
Patauův syndrom 47,XY,+13



# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA)

abnormality počtu gonozomů  
Klinefelterův syndrom

## Klinefelterův syndrom 47,XXY

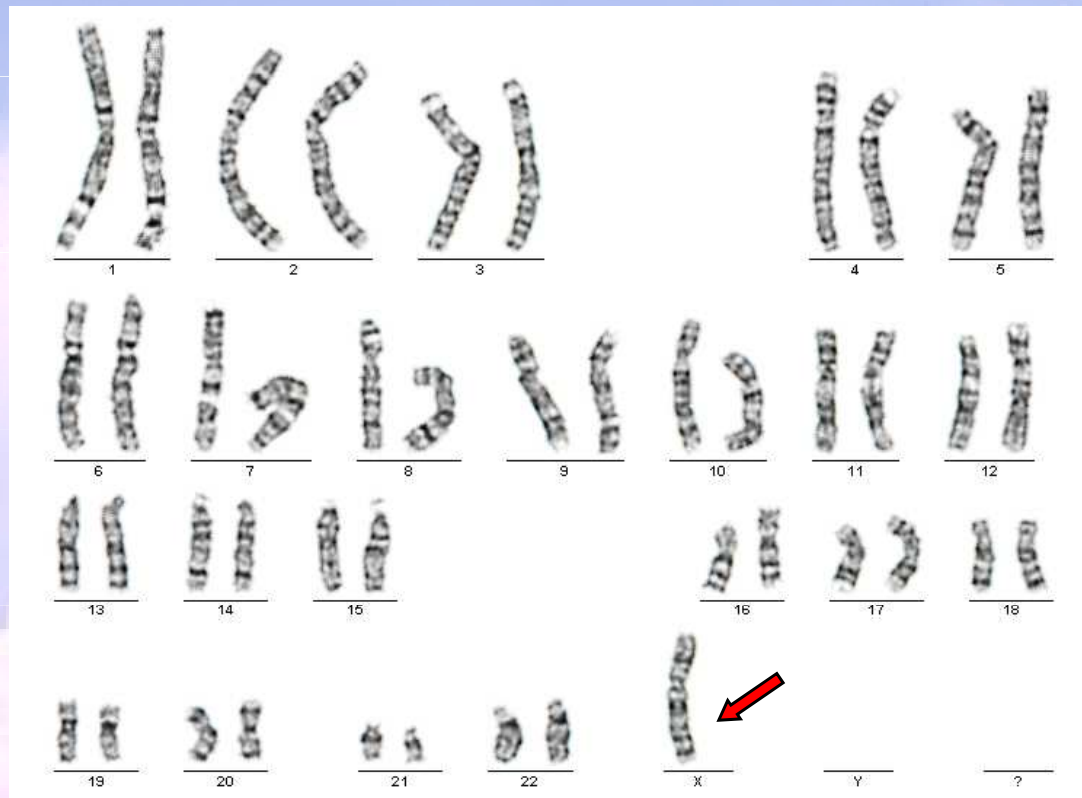


# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) abnormality počtu chromozomů aneuploidie

- **monozomie** – méně častá porucha  
(místo 2 chromozomů v páru přítomen 1)
  - **monozomie X** (Turnerův syndrom)  
častý výskyt
  - **monozomie autozomů** obvykle slučitelná se životem  
jen v **mozaice** (v těle jedince mohou být přítomny 2 nebo  
více buněčné linie s různou chromozomovou sestavou, např.  
linie normální s linií s monozomií chromozomu č.18)

# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) abnormality počtu gonozomů Turnerův syndrom

## Turnerův syndrom 45,X



# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby

- strukturní abnormality chromozomů
- méně časté než aneuploidie
- dochází k přestavbám a následně ke změnám morfologie chromozomů
- předpokladem je vznik **zlomů** na chromozomech



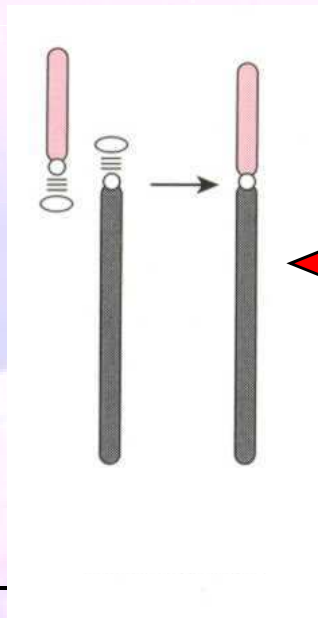


# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokace

- **translokace** – nejčastější ze strukturních aberací, předpokladem je vznik dvou zlomů, každý na jednom chromozomu



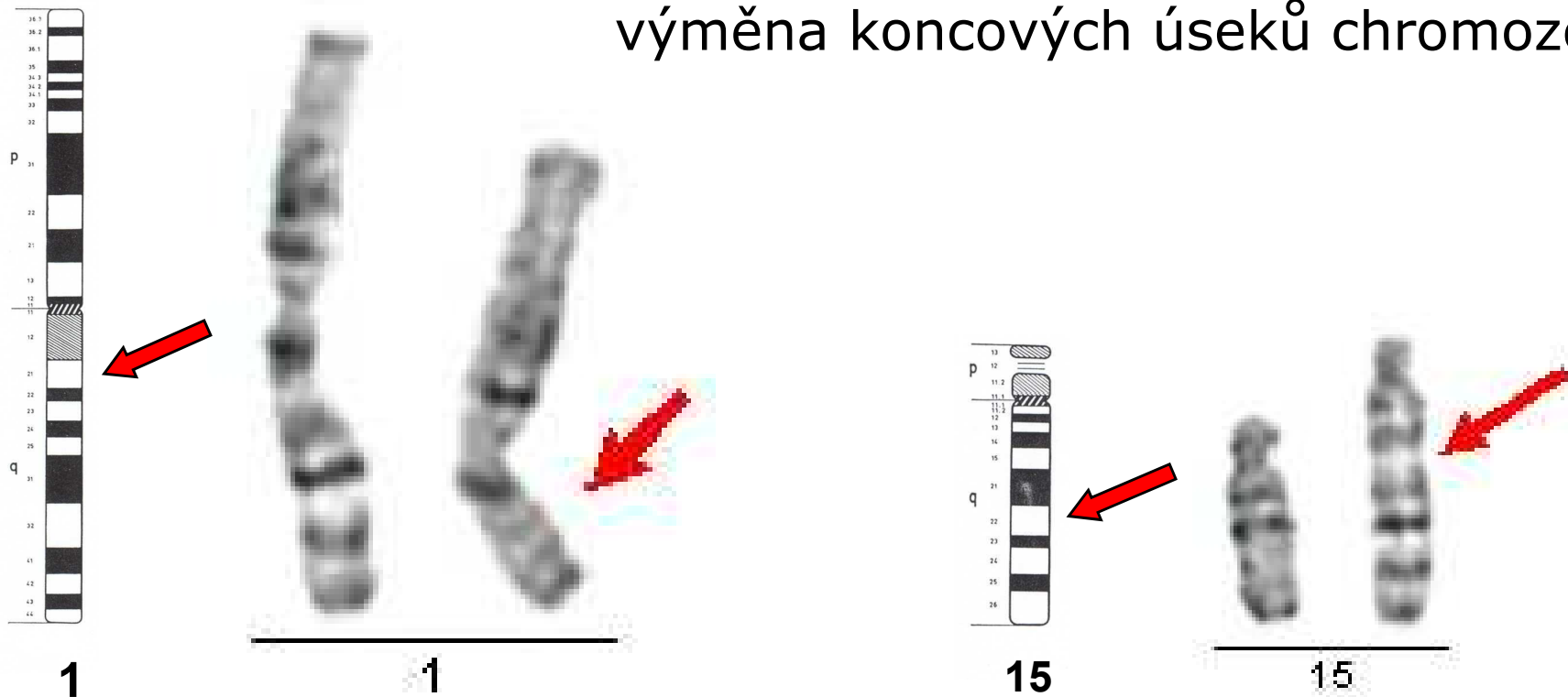
balancované translokace –  
reciproká výměna chromozomových segmentů  
mezi dvěma, zpravidla nehomologními,  
chromozomy



robertsonovské translokace –  
2 akrocentrické chromozomy fúzují v oblasti  
centromery a ztrácejí svá krátká raménka  
(ztráta nemá vliv na fenotyp)

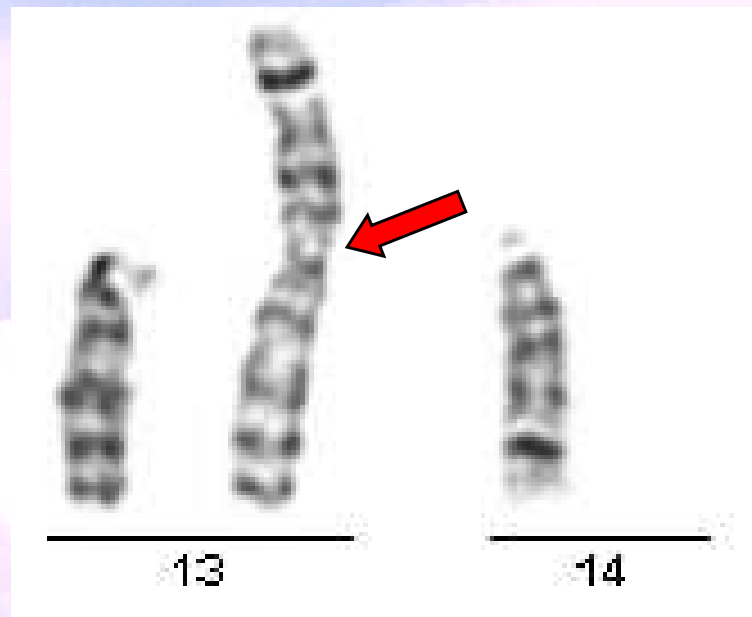
# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokace

**balancovaná translokace t(1;15)**  
výměna koncových úseků chromozomů



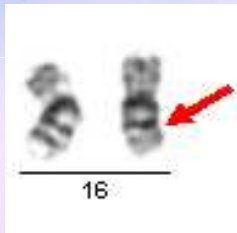
# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokace

**robertsonovská translokace der(13;14)**  
(derivovaný chromozom)



# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokace

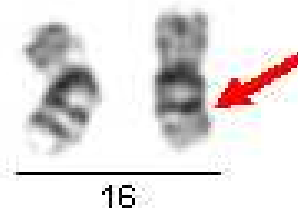
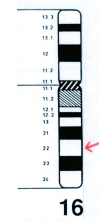
translokace u svých nositelů většinou nezpůsobují abnormální fenotyp, ale jsou spjaty s **vysokým rizikem vzniku nebalancovaných gamet** a s tím spjatých potratů nebo narození **potomků s nebalancovaným karyotypem** (parciální monozomie jednoho a parciální trizomie druhého chromozomu)



zděděný derivovaný  
chromozom –  
parciální monozomie  
chr. 16, parciální  
trizomie chr. 21

dítě s nebalancovaným  
karyotypem - postižené  
46,XY,der(16)t(16;21)mat

karyotyp matky  
46,XX,t(16;21)



chromozomy, které se  
zúčastnily translokace

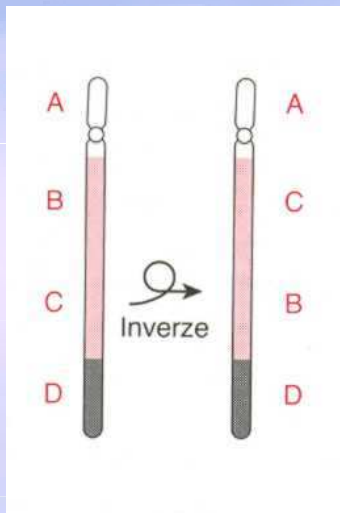
# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokace

- **balancované přestavby** - v sadě chromozomů je zachováno normální množství chromozomového materiálu
  - většinou nemají fenotypové vyjádření, v buňkách je přítomen veškerý chromozomový materiál, i když v odlišném uspořádání
- **nebalancované přestavby** – část chromozomového materiálu v karyotypu chybí (**parciální monozomie**) a část přebývá (**parciální trizomie**)
  - většinou dochází k fenotypovým abnormalitám

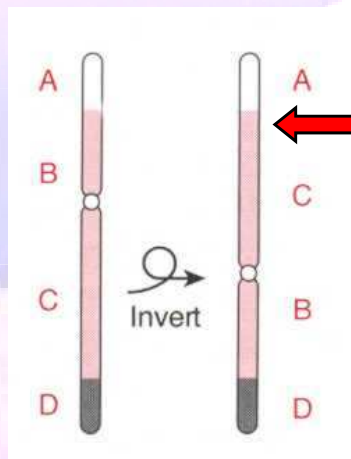


# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inverze

- **inverze** – na jednom chromozomu vzniknou 2 zlomy, segment mezi nimi se otočí o  $180^\circ$  a opět se začlení do chromozomu



paracentrická inverze – oba zlomy jsou na stejném raménku, úsek nezahrnuje centromeru

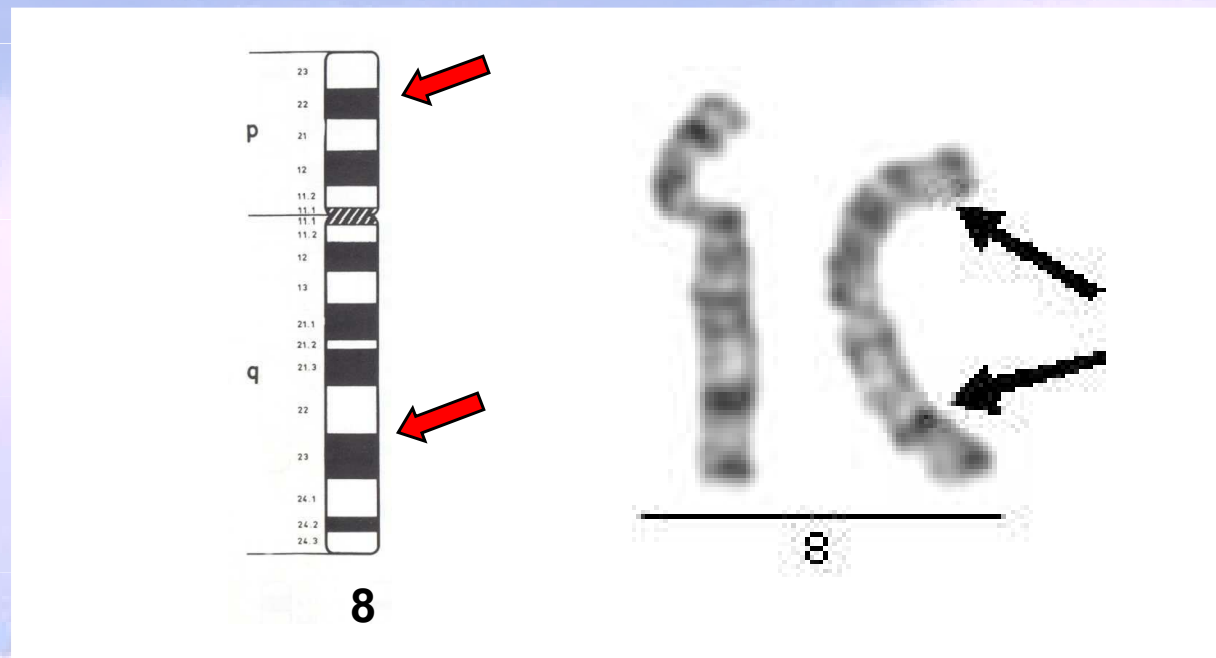


pericentrická inverze – na každém raménku je jeden zlom, invertovaný úsek zahrnuje centromeru

inverze u svých nositelů většinou nezpůsobují abnormální fenotyp, ale jsou spjaty s **vysokým rizikem vzniku nebalancovaných gamet a narození abnormálních potomků**

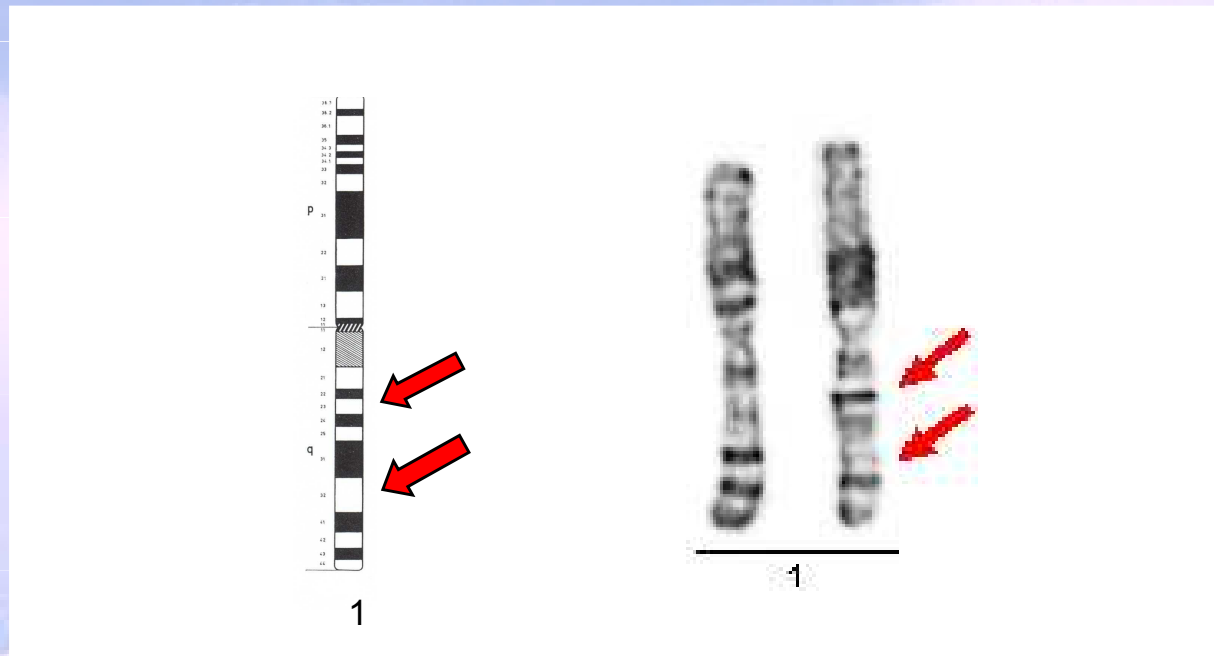
# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inverze

## pericentrická inverze inv(8)



# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inverze

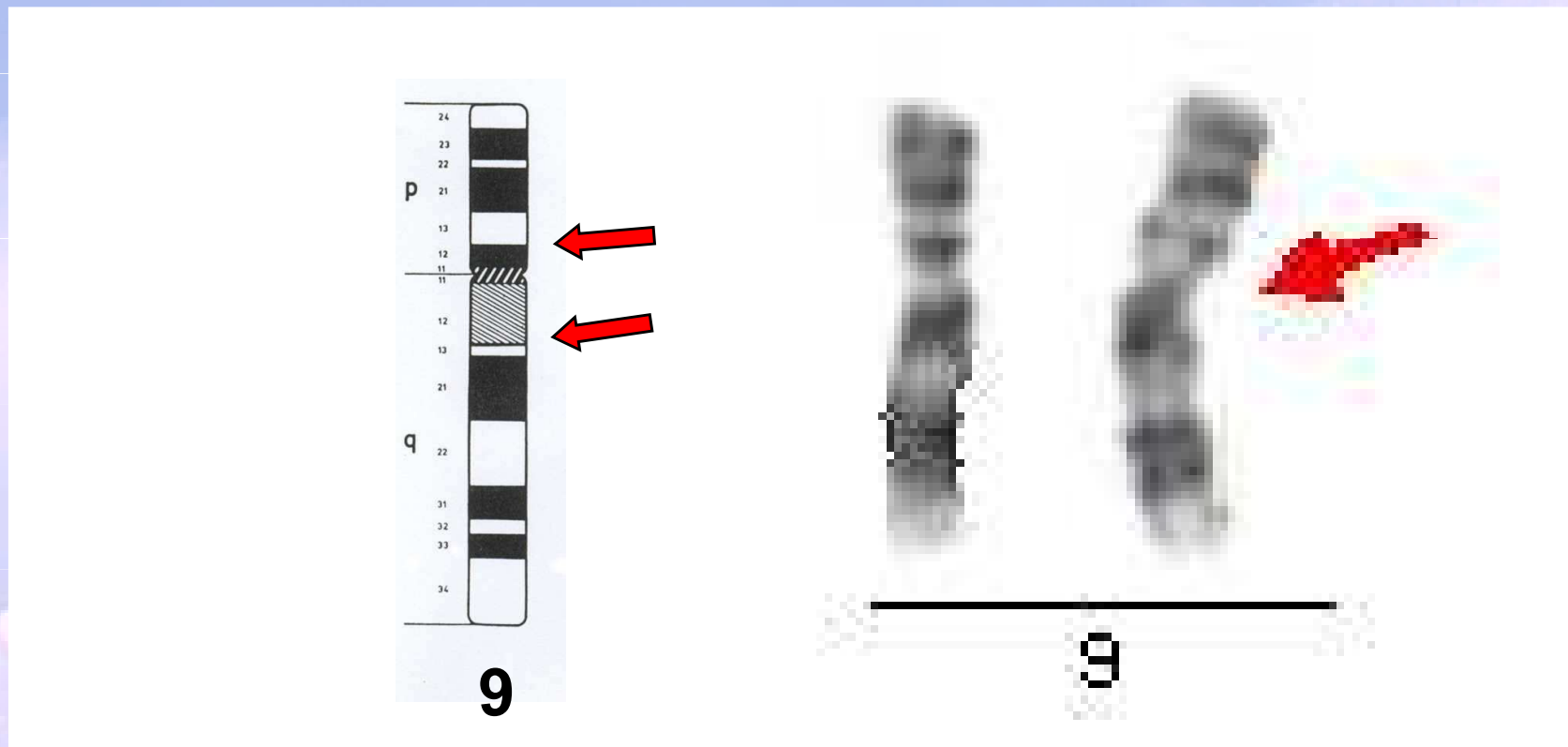
## paracentrická inverze inv(1)





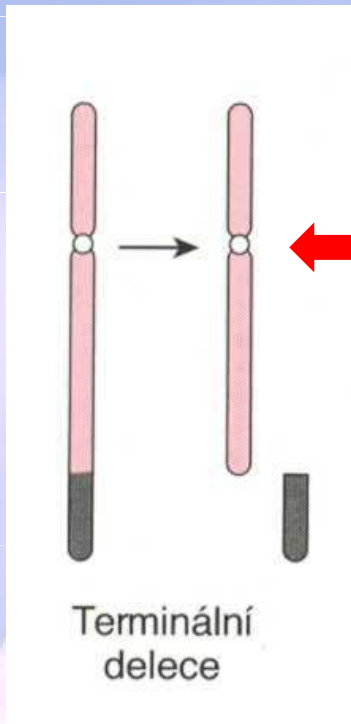
# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inverze jako varianty normy

**pericentrická inverze  $\text{inv}(9)(\text{p}11;\text{q}13)$**



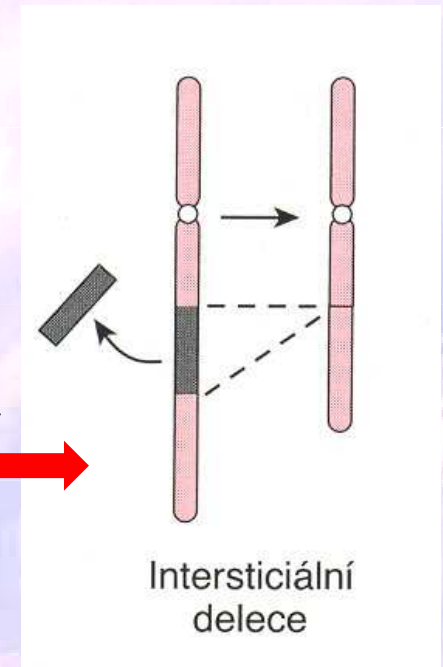
# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby delece

- **delece** – ztráta úseku chromozomu, který způsobuje vznik nebalancovaného karyotypu (**parciální monozomie**)



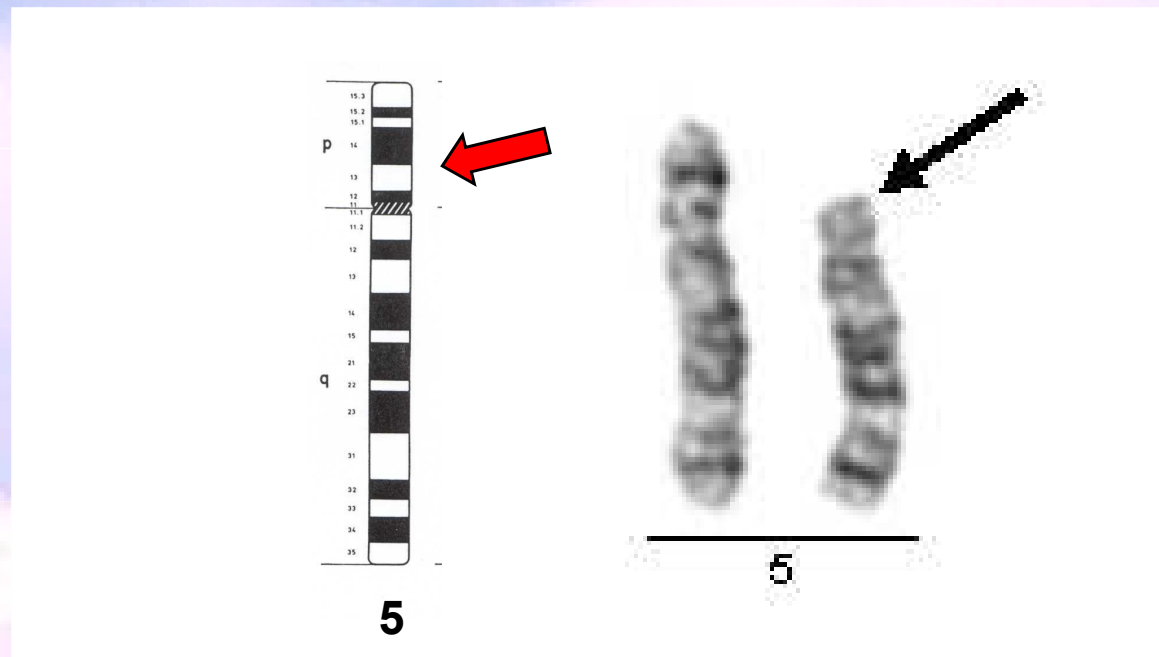
terminální delece – ztráta koncového úseku chromozomu

intersticiální delece – ztráta segmentu, uloženého mezi centromerou a terminální částí



# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby delece

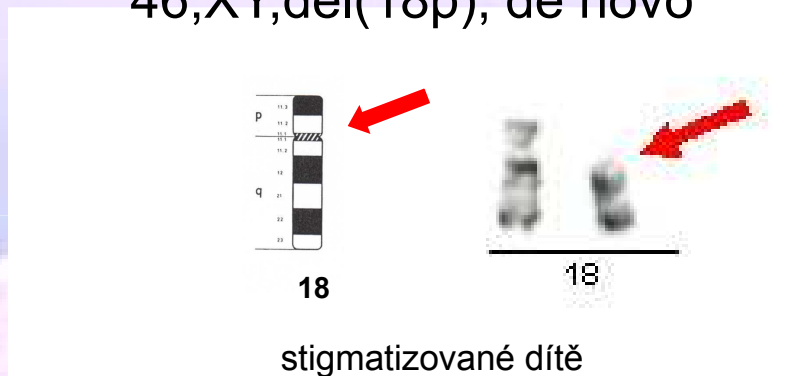
**terminální delece del (5pter)**  
syndrom Cri du chat (syndrom kočičího křiku)



# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby delece

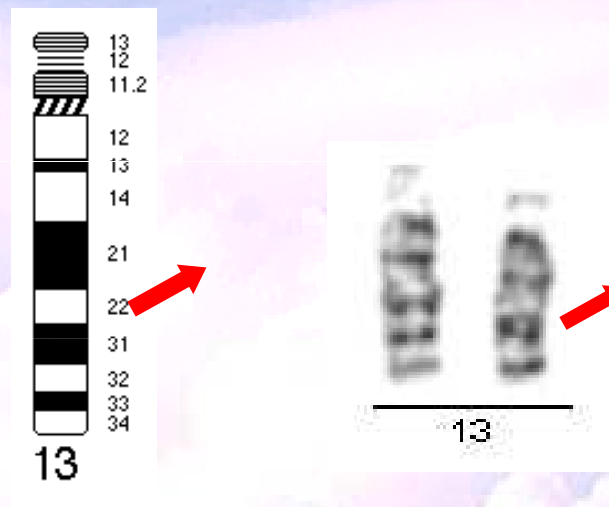
míra klinických příznaků závisí  
na rozsahu deletovaného  
segmentu a na počtu a funkci  
genů, které jsou v něm  
obsaženy

karyotyp probanda  
46,XY,del(18p), de novo

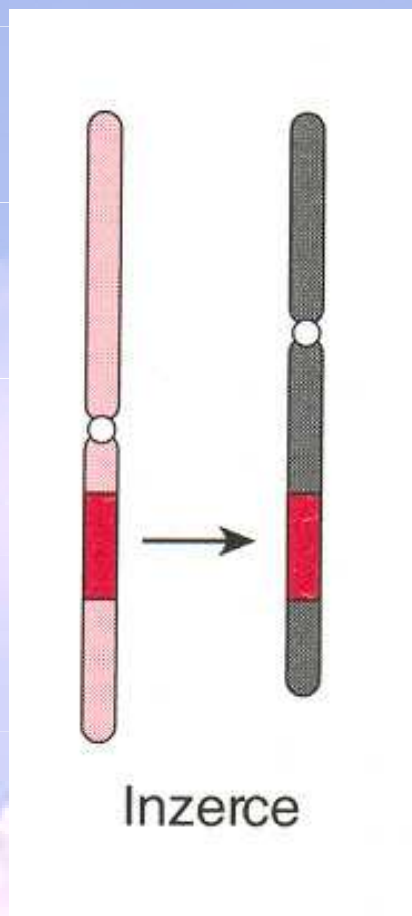


# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby delece

**intersticiální delece na chromozomu 13**



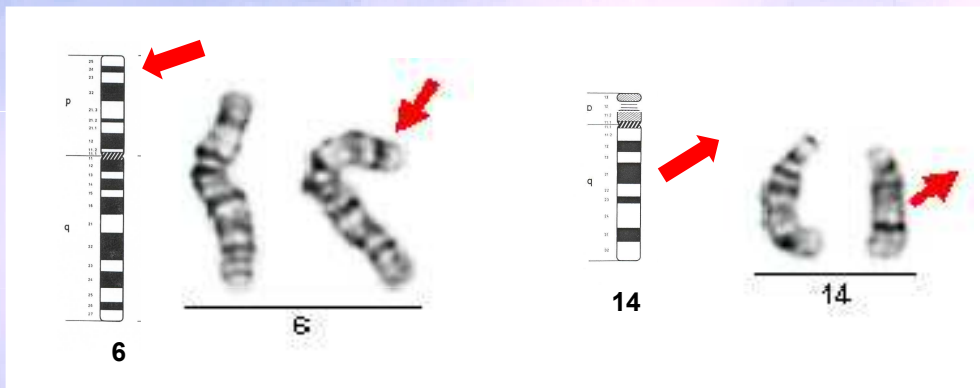
# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inzerce



- **inzerce** – nerekiproký typ translokace
  - segment z jednoho chromozomu se vyčlení a vloží do jiného chromozomu buď ve své původní orientaci nebo opačné
  - k jejich vzniku jsou potřeba 3 body zlomu, 2 na jednom chromozomu a 1 na druhém
  - jsou poměrně vzácné (1:80000)
  - hrozí vznik nebalancovaných gamet a narození abnormálních potomků

# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inzerce

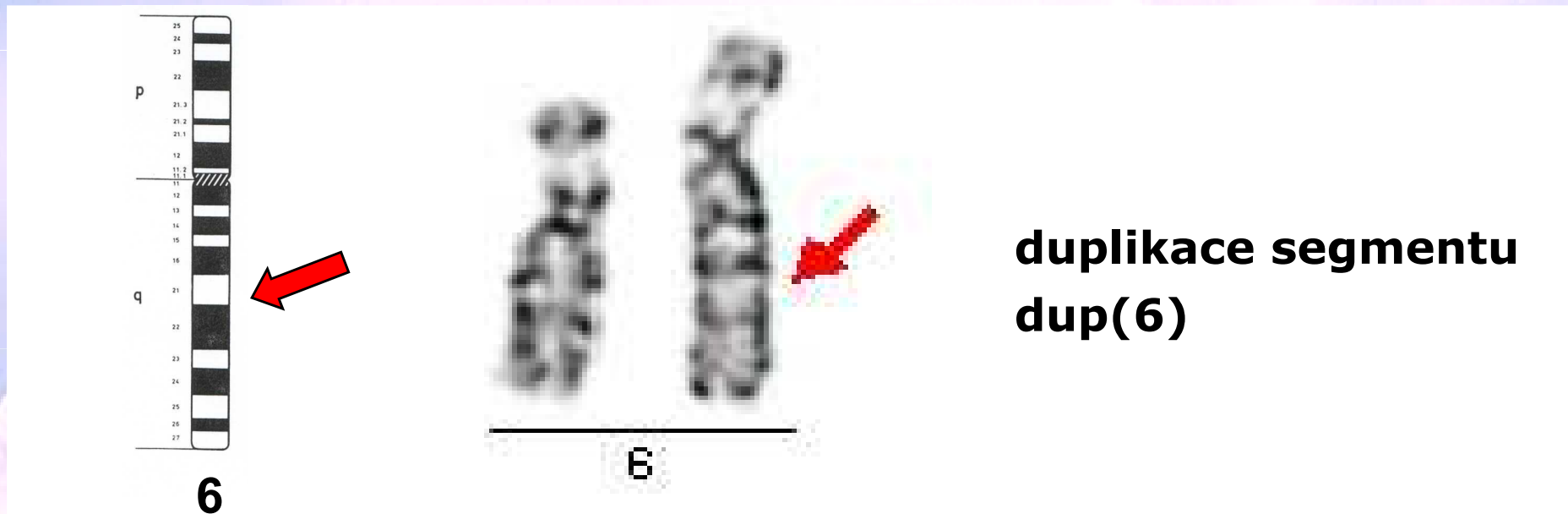
inzerce úseku chromozomu č. 14 do chromozomu č. 6



karyotyp probanda  
46,XY,ins (6;14), de novo  
– stigmatizované dítě

# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby duplikace

- **duplikace** – nadbytečný chromozomový segment, který způsobuje vznik nebalancovaného karyotypu (**parciální trizomie**)
  - bývají méně nebezpečné než delece

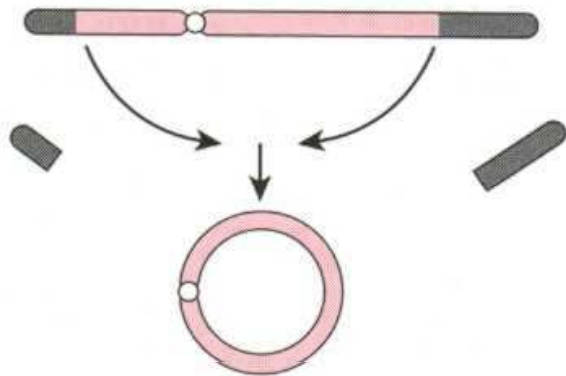
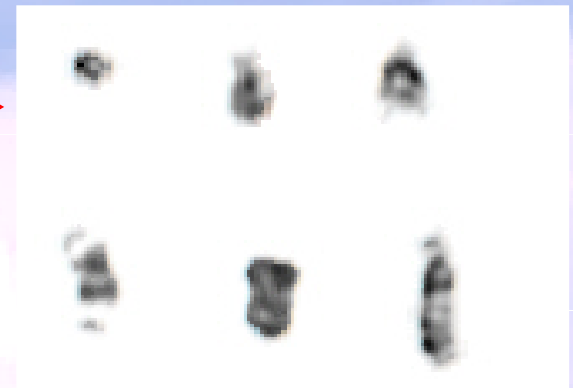




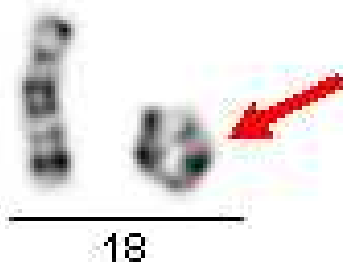
# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby neobvyklé typy chromozomů

## marker chromozomy

- malé chromozomy (s centromerou), často v mozaice, obtížně identifikovatelné (mohou být vrozené nebo kultivačního původu)



Kruhový chromozom



## kruhové chromozomy (ring chromozomy)

- na obou koncích chromozomu vzniknou zlomy, dojde ke ztrátě koncových úseků, zbytek chromozomu se spojí

# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby neobvyklé typy chromozomů

- **izochromozomy** – metacentrické chromozomy, které vznikly tak, že 1 raménko chromozomu chybí a druhé je duplikováno (parciální monozomie 1 raménka a parciální trizomie 2. raménka)

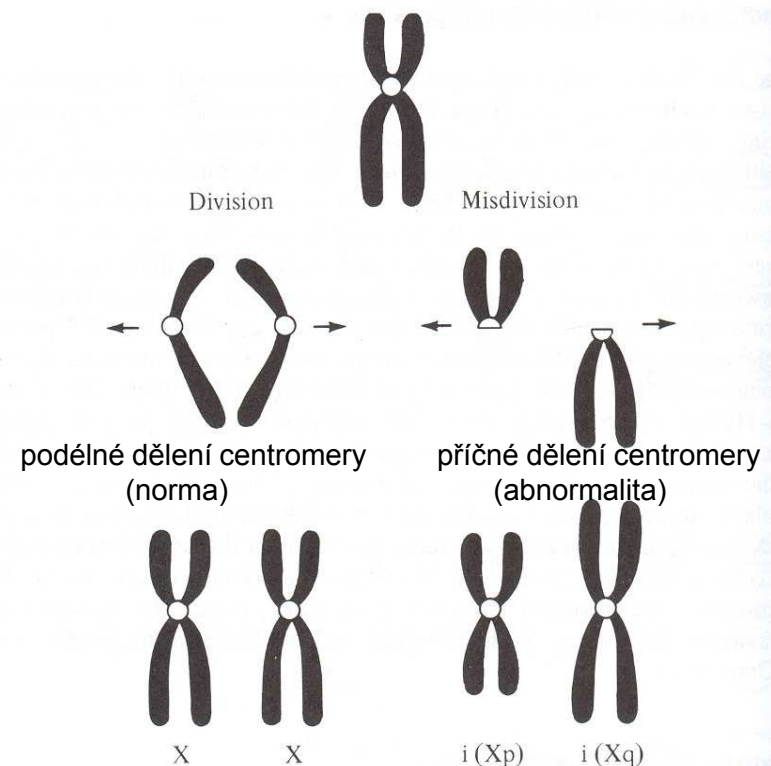
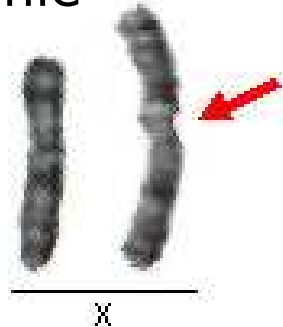
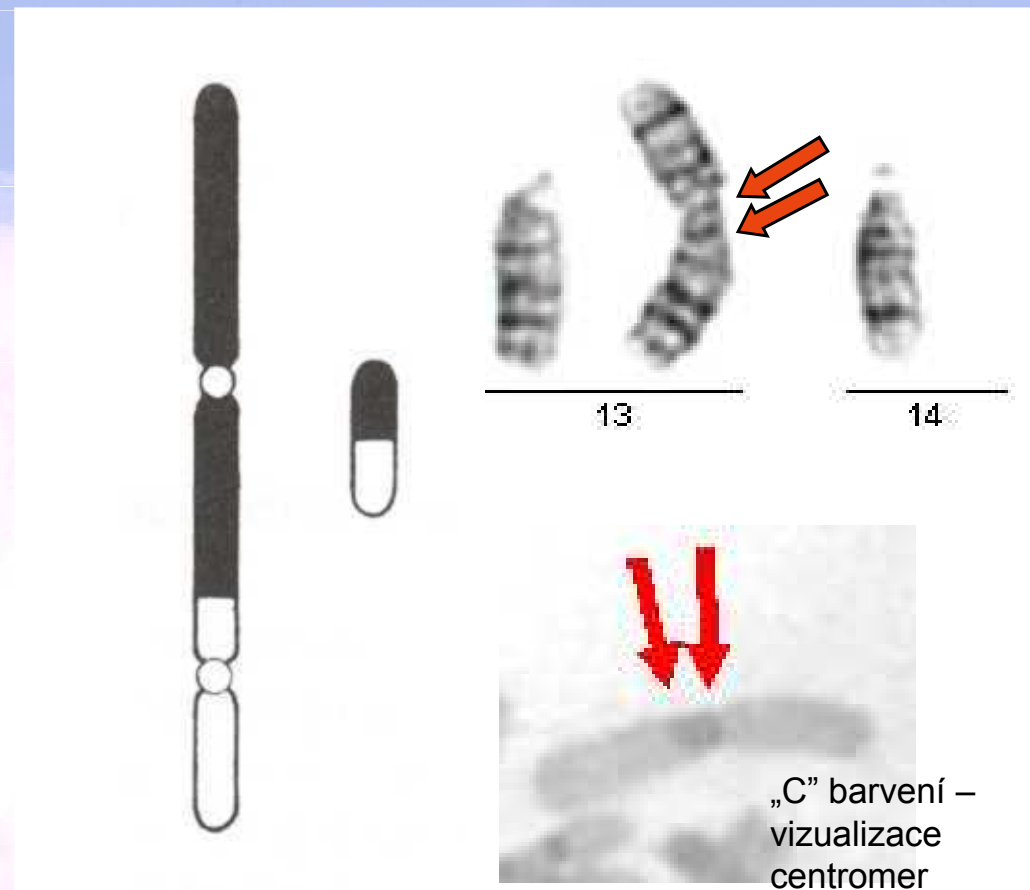


Figure 19.2. Misdivision of the human X chromosome resulting in the formation of a long-arm isochromosome i(Xq) and a short-arm isochromosome i(Xp) (presumably inviable).

# VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby neobvyklé typy chromozomů

- **dicentrické chromozomy**
  - na dvou chromozomech dojde ke zlomu
  - vznikne dicentrický chromozom fúzí úseků s centromerou a acentrického fragmentu spojením úseků bez centromery



# ZÍSKANÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (ZCA)

- vyšetření vlivu mutagenních faktorů prostředí na člověka  
– **z periferní krve**
- zvýšené % aberantních buněk v organismu přispívá k rychlejšímu stárnutí organismu, vzniku degenerativních onemocnění, je možné maligní zvrhnutí; aberace mohou být přítomny nejen v somatických, ale i v pohlavních buňkách, zvyšuje se riziko narození postiženého dítěte.
- hodnotí se 100 buněk, za patologii je považován **nález opakovaně 5% nebo více než 5% aberantních buněk**



# ZÍSKANÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (ZCA) příčiny vzniku

působení:

- fyzikálních faktorů (ionizující záření)
- chemických látek (cytostatika, imunosupresiva, oxidační, alkylační činidla ad. látky používané v průmyslu)
- biologických faktorů (virové infekce – pravé neštovice, spalničky, zarděnky ad.)

poškození chromozomů závisí na:

- typu působících faktorů
- fázi buněčného cyklu, ve které se nachází buňka v době působení mutagenu
- dávce mutagenu

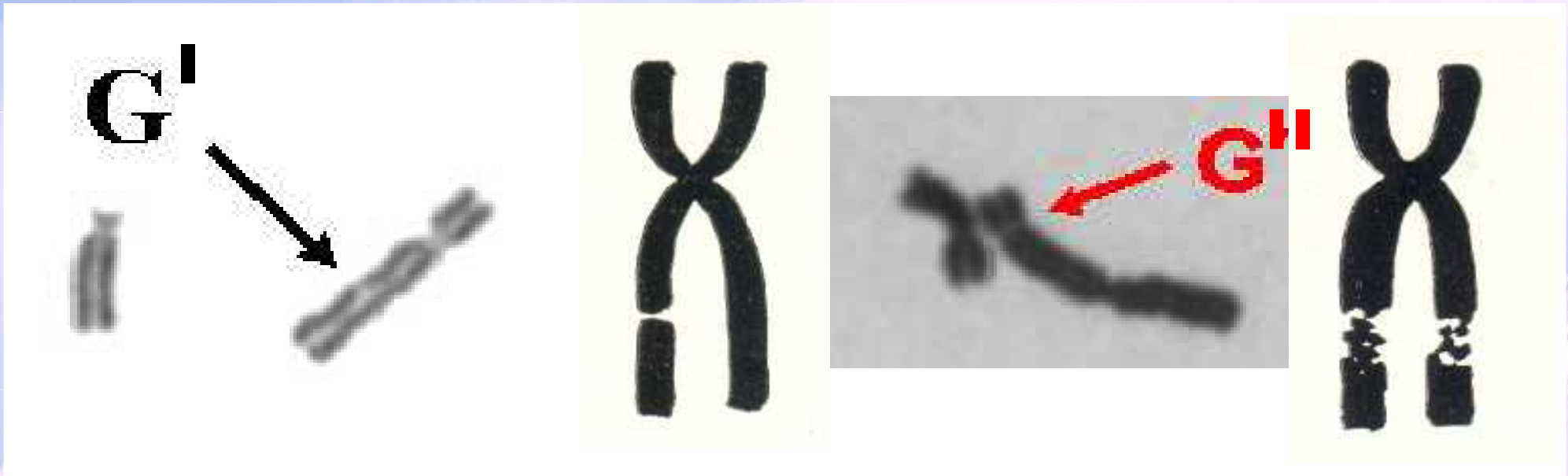


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



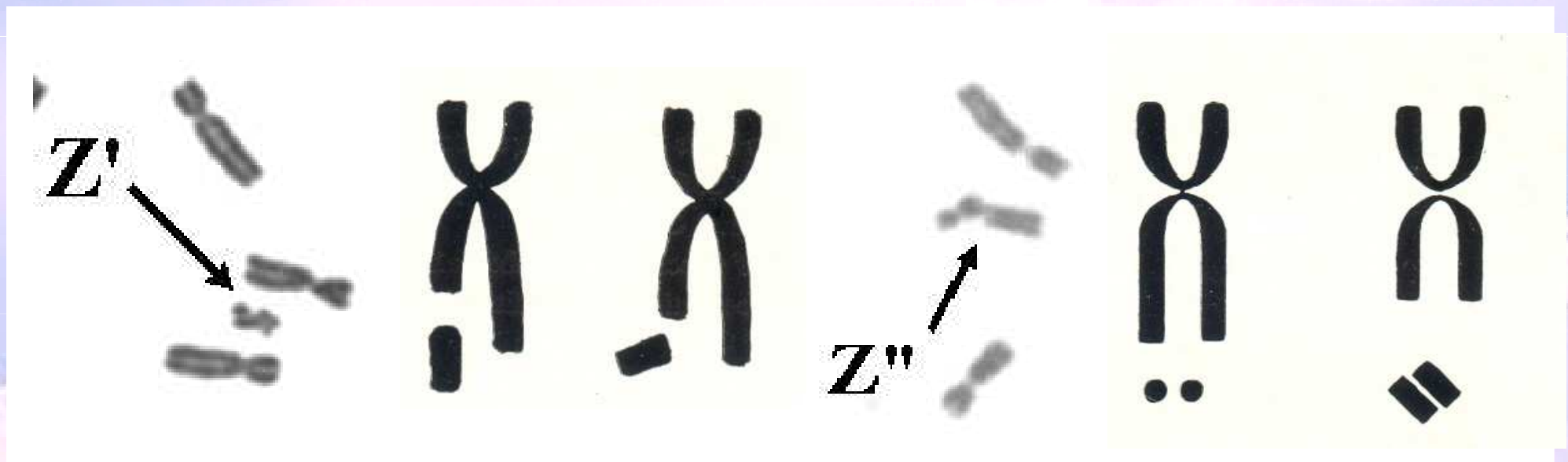
# ZÍSKANÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (ZCA)

- **gapy** (mezery) – jednochromatidové, dvouchromatidové ( $G^1$ ), ( $G^2$ ) - příčně slabě se barvící část chromatid, také úplné přerušení chromatid nepřesahující její šířku



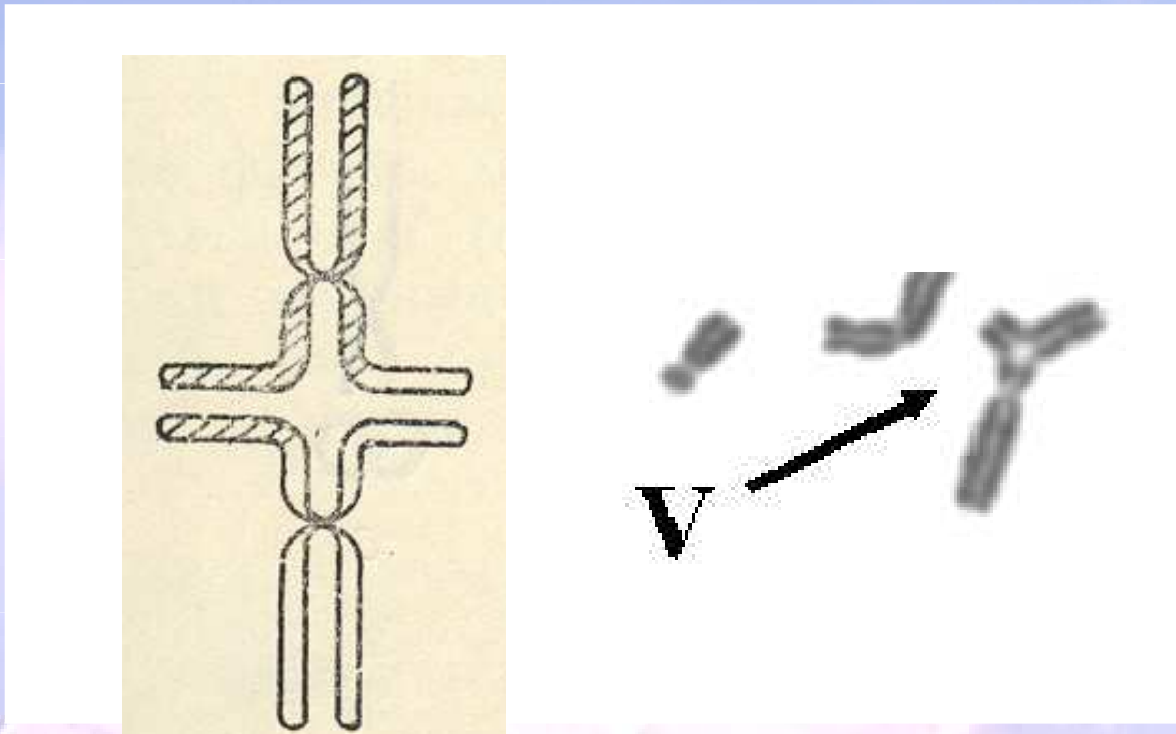
# ZÍSKANÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (ZCA)

- **zlomy** – jednochromatidové, dvouchromatidové - ( $Z'$ ), ( $Z''$ ) - oddělení samostatného **fragmentu (F)** nebo **párových fragmentů (DF)** – úplné přerušení chromatidy, pravděpodobně koncová delece



# ZÍSKANÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (ZCA)

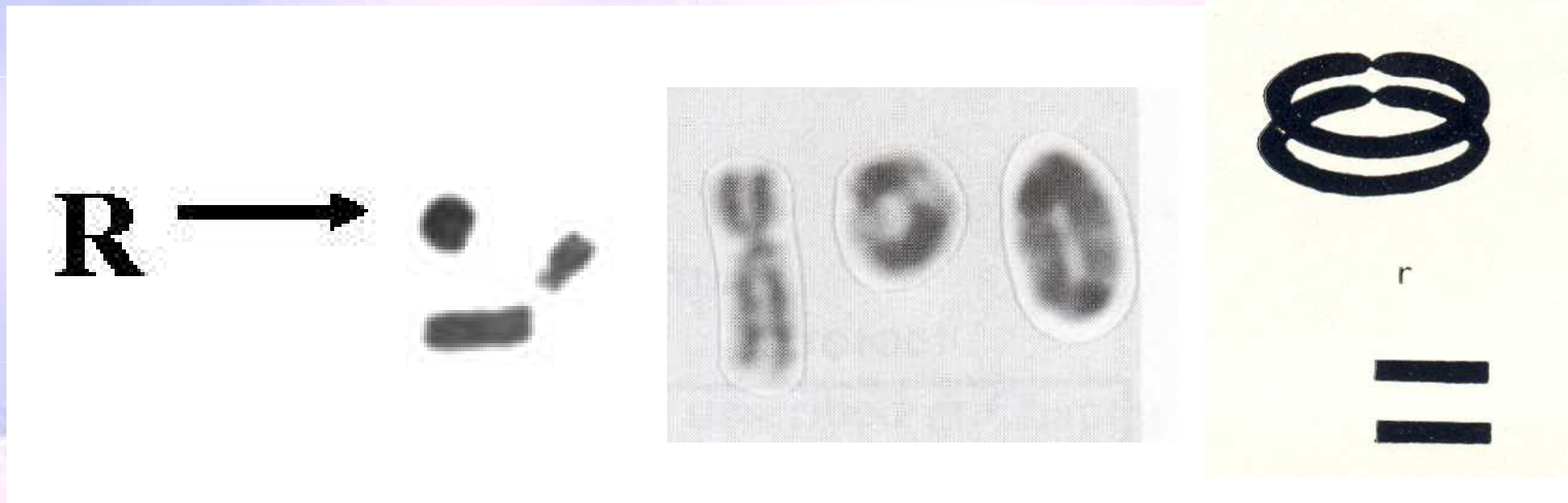
- **výměny (V)**- výměny části chromatid v rámci jednoho nebo více chromozomů





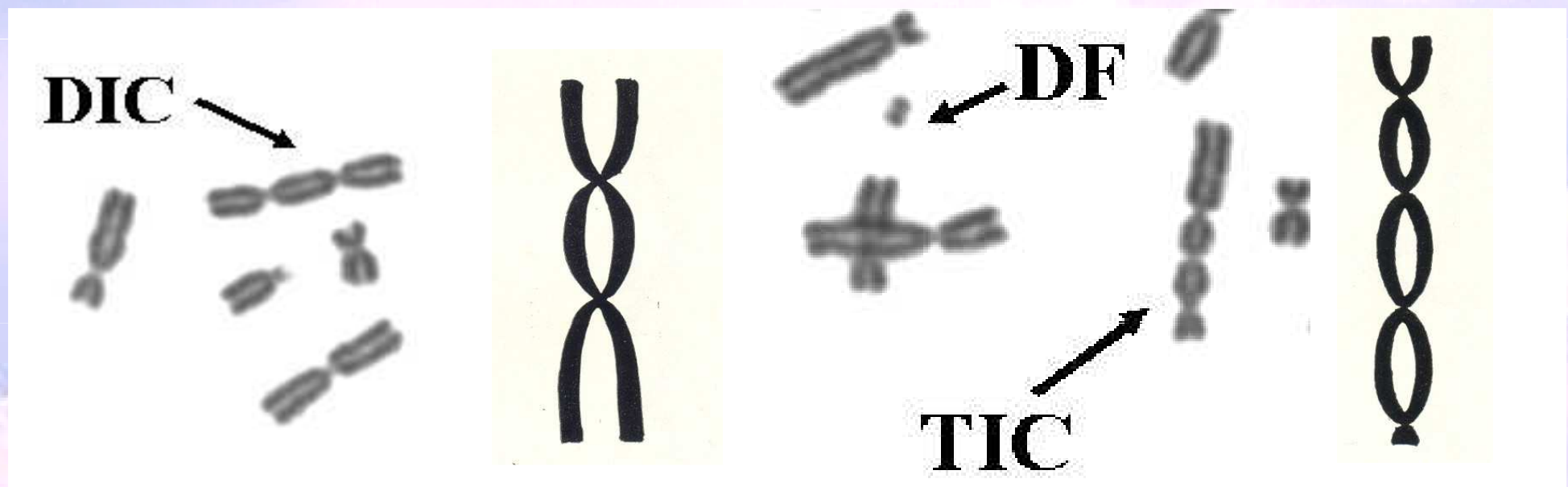
# ZÍSKANÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (ZCA)

- **acentrické ringy, kruhové chromozomy**- uzavřené struktury, vznik dvou zlomů na jednom chromozomu, dojde ke spojení – acentrické ringy jsou bez centromery, kruhové chromozomy zahrnují centromeru



# ZÍSKANÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (ZCA)

- chromozomy zahrnující více než 1 centromeru-  
dicentrické, tricentrické chromozomy...



# Metody molekulární cytogenetiky, příklady využití v klinické cytogenetice



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

- molekulární cytogenetika aplikuje metody molekulární biologie na cytogenetické úrovni, vizualizuje a lokalizuje genetický materiál v buňkách
- pracuje s metafázními chromozomy nebo interfázními jádry
- potvrzuje a upřesňuje nálezy klasické cytogenetiky (translokací, delecí, inzercí, duplikací...)
- řeší problémy klasické cytogenetiky
  - záchyt velmi malých chromozomových změn (jsou pod rozlišovací schopností (citlivostí) metod klasické cytogenetiky – např. mikrodelece, translokace velmi malých úseků chromozomů)
  - analýza složitých chromozomových přestaveb
  - identifikace nebalancovaného materiálu neznámého původu
  - analýza buněk v interfázi (chromatin není spiralizován do podoby chromozomů, je rozprostřen v celém objemu buněčného jádra) – zrychluje analýzu (bez kultivace) – výsledek do 24 hodin, řeší problémy klasické cytogenetiky – nedostatečný počet mitóz na sklíčku, špatná kvalita chromozomů
- začátek rozvoje – přelom 60.- 70. let 20. století



# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

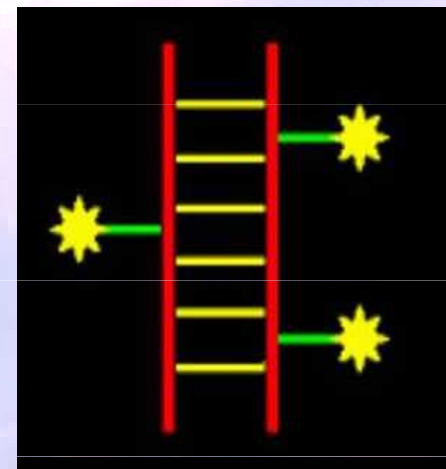
- využití: - analýza chromozomů z periferní krve – pouze VCA,  
**ZCA se při rutinní analýze nevyšetřují molekulárně cytogeneticky!**  
- analýza chromozomů z ostatních materiálů (plodová voda, krev plodu, kostní dřeň, solidní tumory....)
- molekulárně cytogenetickými technikami **nelze nahradit klasické karyotypování**  
(před použitím metod molekulární cytogenetiky je třeba vědět, co chceme hledat – vysoká cena molekulárně cytogenetických metod, některé změny lze zjistit pouze klasickým karyotypováním)
- oblasti uplatnění FISH – klinická cytogenetika (postnatální vyšetření u sterilních párů, postižených dětí a dospělých s podezřením na genetickou příčinu, genetická analýza pro účely umělého oplodnění, prenatální diagnostika karyotypu plodu)
  - nádorová cytogenetika
  - výzkum (evoluční studie karyotypu, mapování genomu ...)



# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY

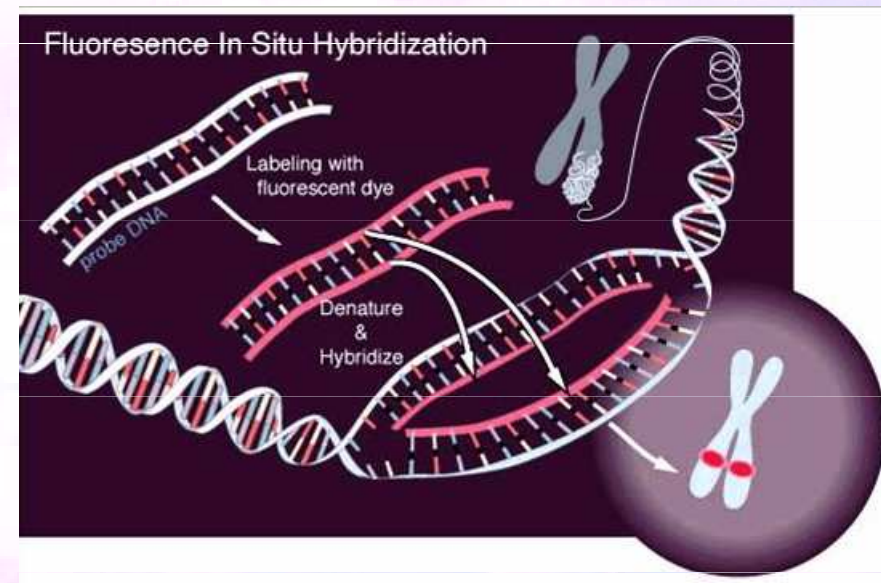
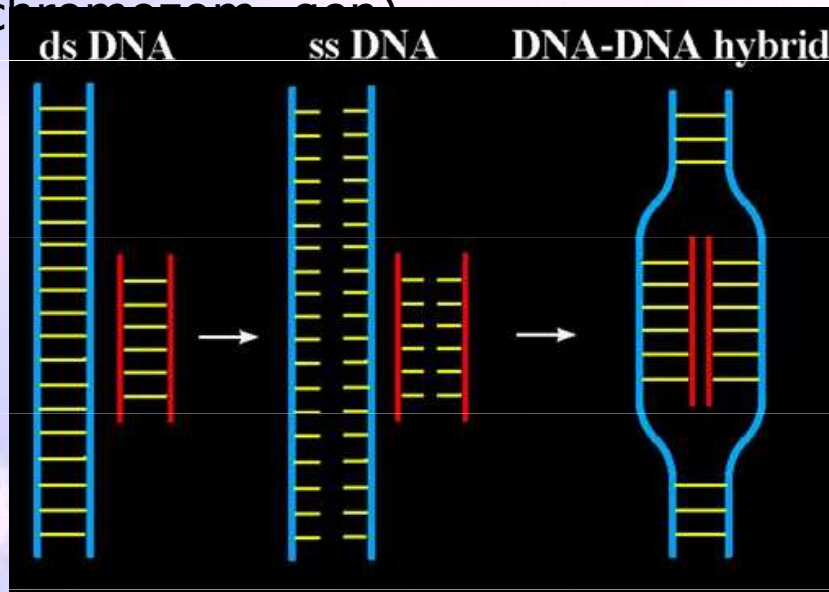
- ISH (in situ hybridizace)
- FISH (fluorescenční in situ hybridizace)

- technika, která se využívá k detekci a lokalizaci specifické DNA sekvence na chromozomech (cílová sekvence nukleotidů na metafázních chromozomech nebo interfázních jádrech)
- **SONDA** (PRÓBA) – uměle nasyntetizovaná sekvence, úsek DNA dlouhý několik set bází, komplementární k cílové sekvenci na chromozomu (v chromatinu)
  - sonda je **značená** – radioaktivně
    - fluorescenčně (fluorochromy) - **FISH**
    - enzymem



# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – FISH (fluorescenční in situ hybridizace)

- **denaturace sondy a cílové sekvence** (působení zvýšené teploty) – získání jednořetězcového vlákna DNA (je schopno vytvořit novou vazbu cílová DNA – DNA sonda, před denaturací vazba na komplementární řetězec DNA) – týká se sondy i cílové DNA
- **hybridizace** sondy na cílovou DNA (chromozomy nebo interfázní jádra na podložním sklíčku) – dochází ke specifické vazbě sondy na cílové místo (chromozomu)



# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – FISH (fluorescenční in situ hybridizace)

- **vyhodnocení a zpracování signálu** – FISH - fluorescenční mikroskop napojený na počítač – vizualizace a kvantifikace (signál září v tmavém poli) – modrá barvička (DAPI) obarvuje všechny chromozomy, červený signál = fluorescenčně značená sonda



FISH na metafázních chromozomech

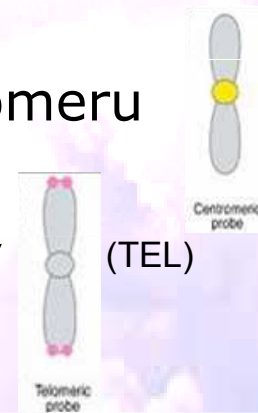
detekce genu SRY  
na chromozomu Y

FISH na interfázních jádrech

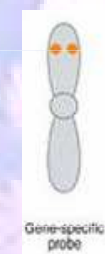


# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – FISH (fluorescenční in situ hybridizace) – typy sond

- celogenomové sondy – směs úseků DNA, které se vážou na všechny chromozomy (CGH) – všechny úseky DNA naznačeny jedním fluorochromem
- celochromozomové (malovací) sondy – směs mnoha sond specifických pro sekvence konkrétního chromozomu které označí chromozomy po celé délce
- centromerické sondy – vazba na centromeru (CEP)
- telomerické sondy – vazba na telomery (TEL)
- lokus specifické sondy (sondy pro jedinečné sekvence) – vazba na specifickou oblast chromozomu – gen, část genu

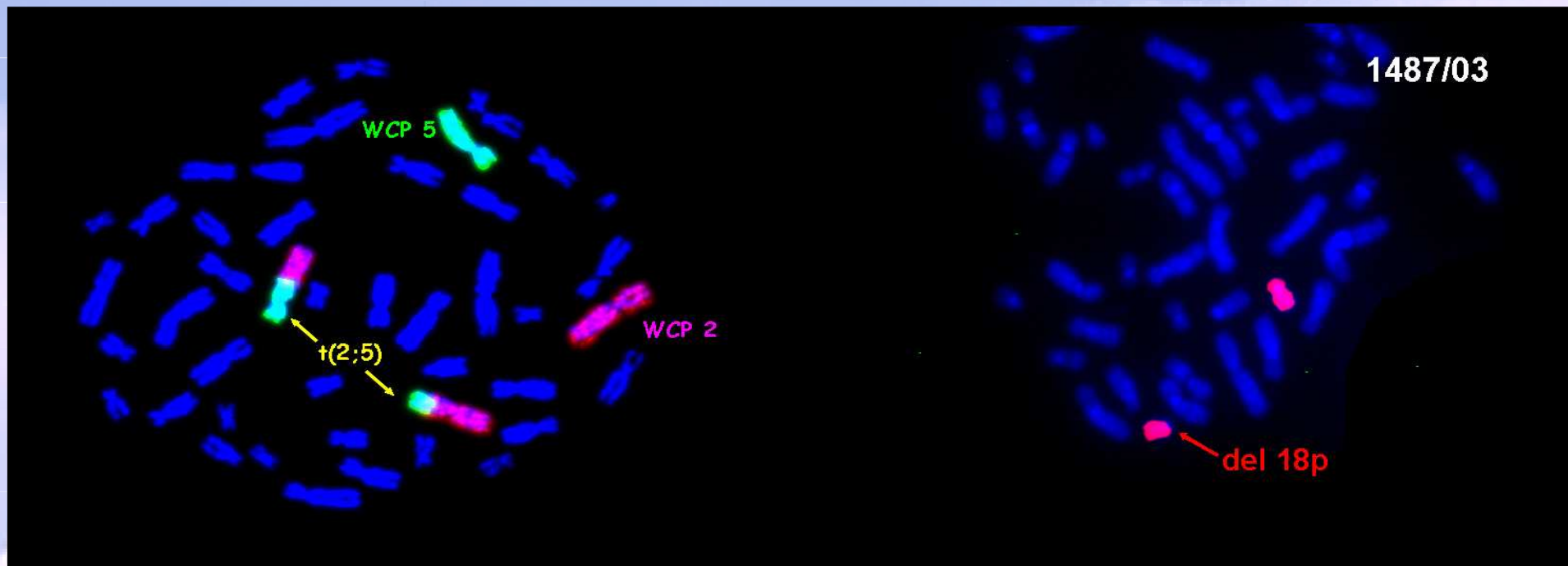


(WCP)  
whole  
chromosome  
probe



# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – FISH (fluorescenční in situ hybridizace) – využití sond

- využití celochromozomových sond – potvrzení translokací mezi nehomologními chromozomy

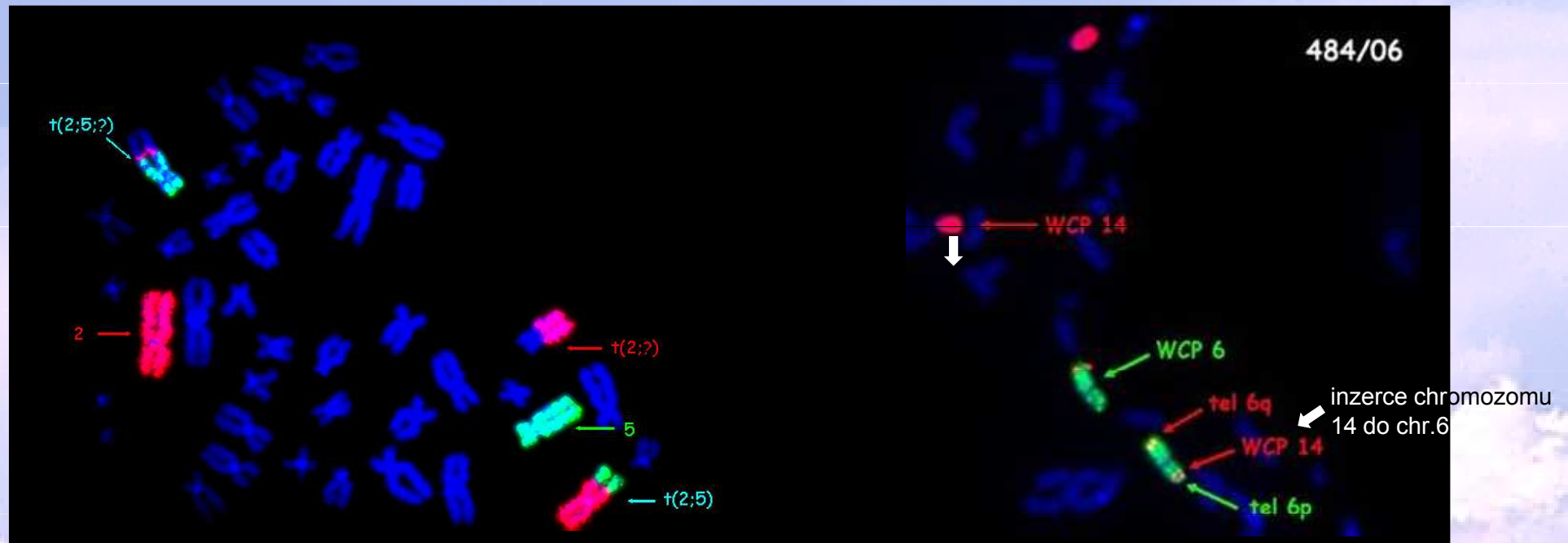


potvrzení přítomnosti translokace

potvrzení nepřítomnosti translokace – potvrzení delece –  
červený signál se nevyskytuje na žádném jiném chromozomu

# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – FISH (fluorescenční in situ hybridizace) – využití sond

- využití celochromozomových sond (a telomerických) – detekce složitějších přestaveb

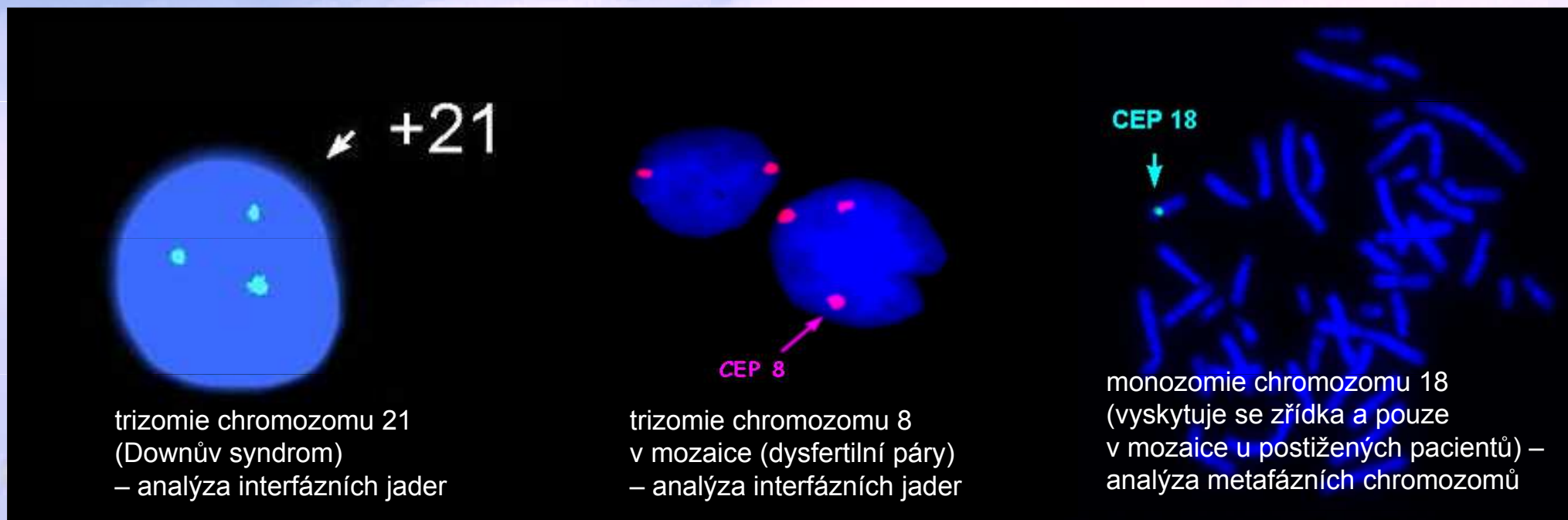


potvrzení složitější přestavby, která zahrnuje více než 2 chromozomy – případ dořešen pomocí metody SKY

detekce inzerce části chromozomu 14 do chromozomu 6

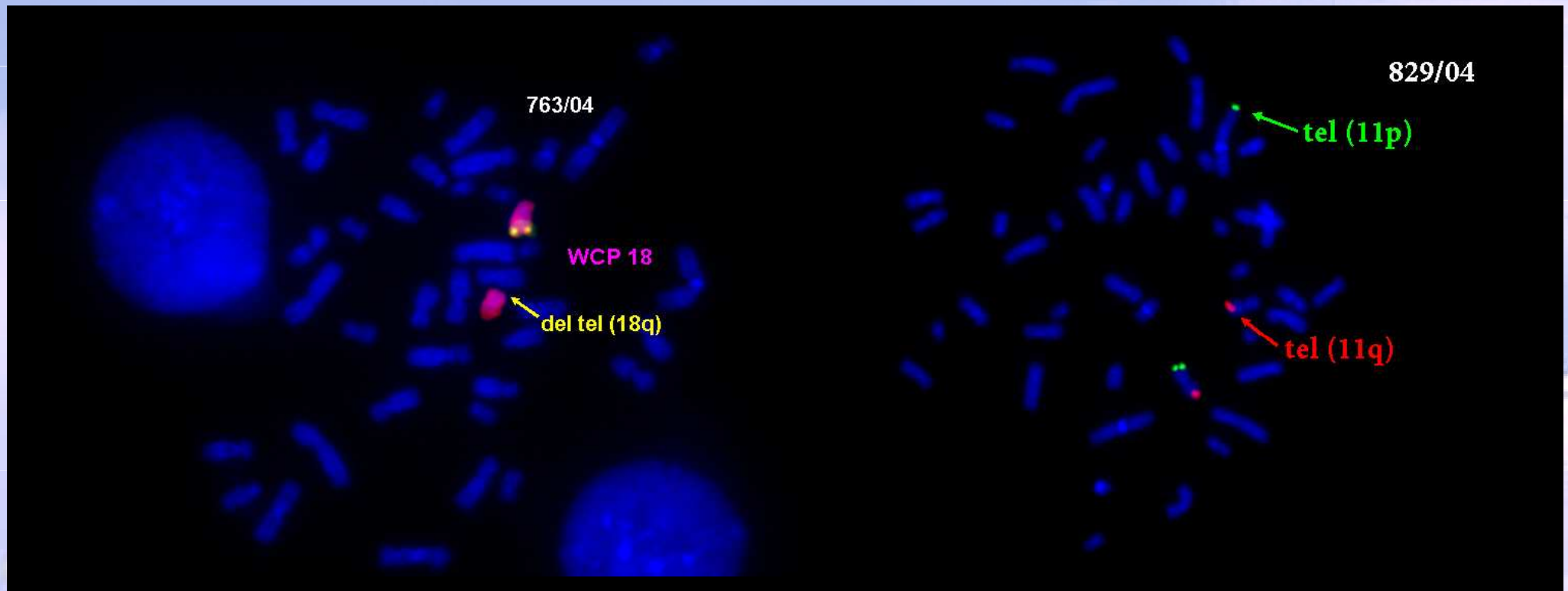
# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – FISH (fluorescenční in situ hybridizace) – využití sond

- využití centromerických sond – určení počtu chromozomů v chromozomovém páru (diploidie, aneuploidie) v metafázi a interfázi



# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – FISH (fluorescenční in situ hybridizace) – využití sond

- využití telomerických sond – detekce delecí, translokací

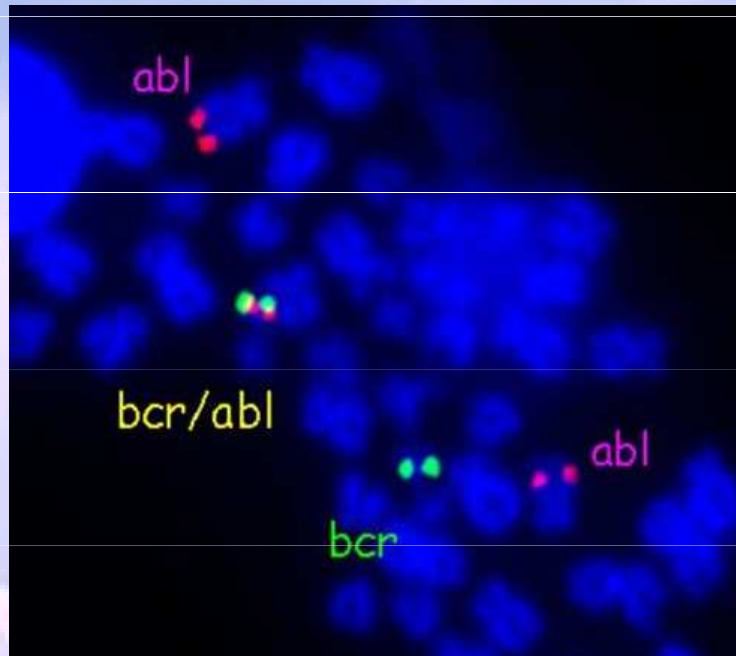


delece telomer 18q (kombinace telomerické a celochromozomové sondy)

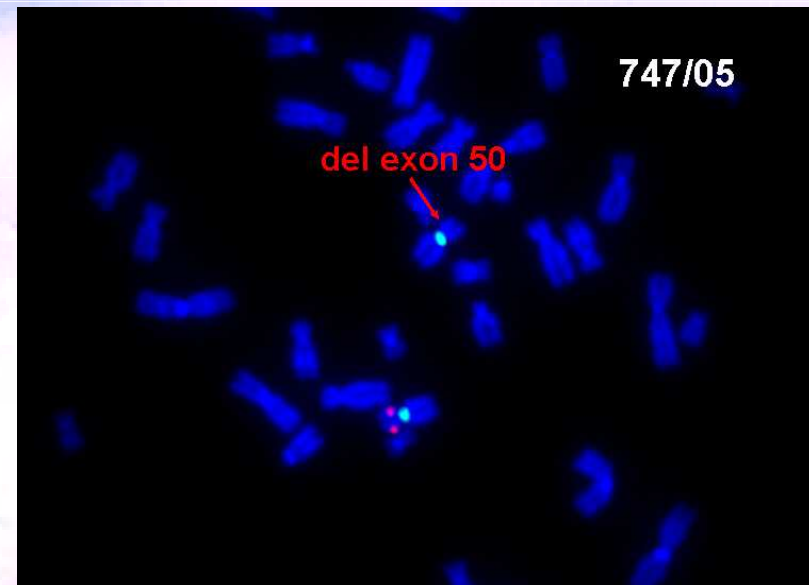
translokace telomer 11p na jiný chromozom

# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – FISH (fluorescenční in situ hybridizace) – využití sond

- využití lokus specifických sond – detekce delecí částí genů (DMD – Duchenova muskulární dystrofie), onkologie – detekce fúzních genů (fúzní gen BCR/ABL) – kombinace lokus specifických sond



vznik fúzního signálu u fúzního genu bcr/abl u CML  
(viz onkocytogenetika)

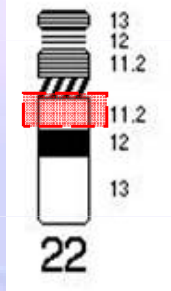


delece exonu 50 u DMD na chromozomu X – červený signál – sonda specifická pro exon 50 genu DMD, zelený signál – centromerická sonda na chromozom X

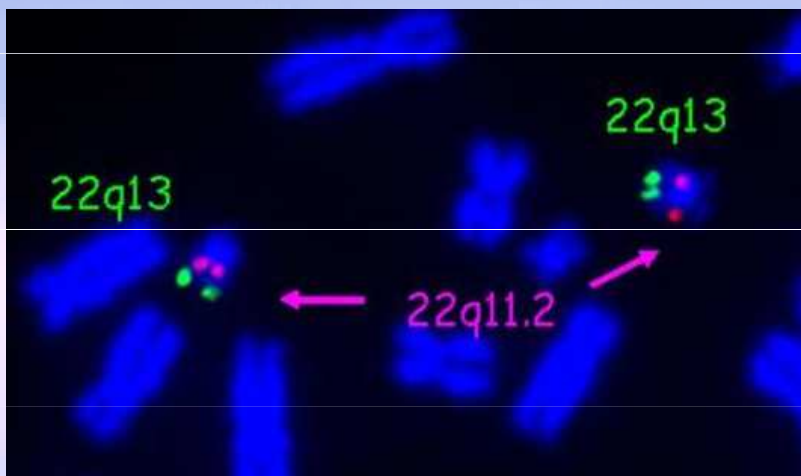
# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – FISH (fluorescenční in situ hybridizace) – využití sond

- využití lokus specifických sond - detekce mikrodelece na chromozomu 22 u Di Georgeova syndromu (mikrodeleční syndrom) (kombinace lokus specifických sond)

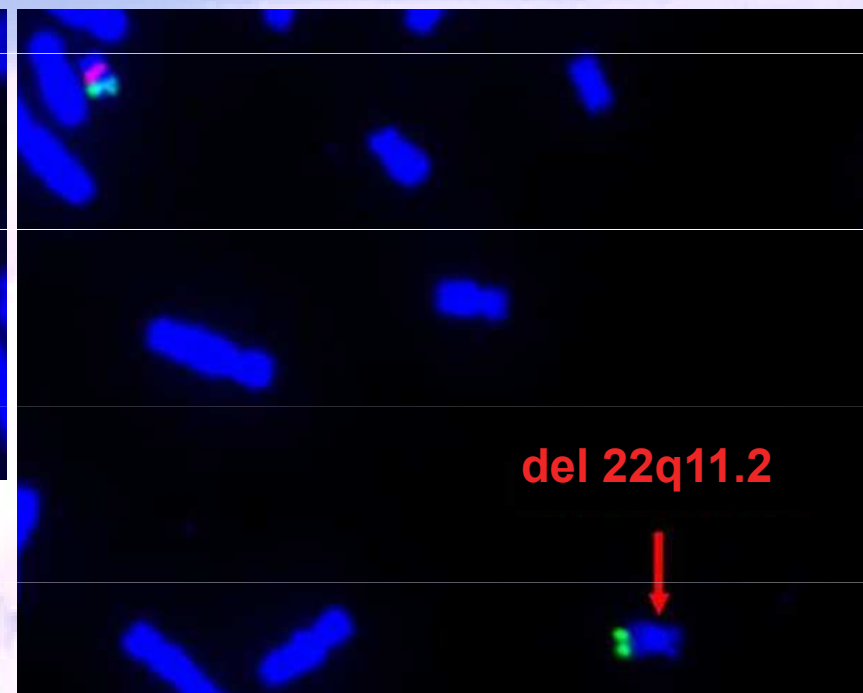
mikrodeleční syndromy nejsou rozpoznatelné metodami klasické cytogenetiky (malá delece)



oblast zodpovědná za Di Georgeův syndrom

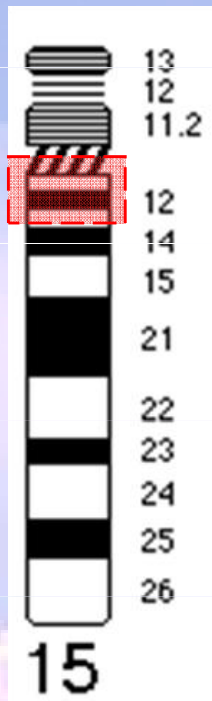


22q13 – kontrolní lokus specifická sonda  
22q11.2 – lokus specifická sonda na oblast Di Georgeova syndromu (delece oblasti – signál chybí)

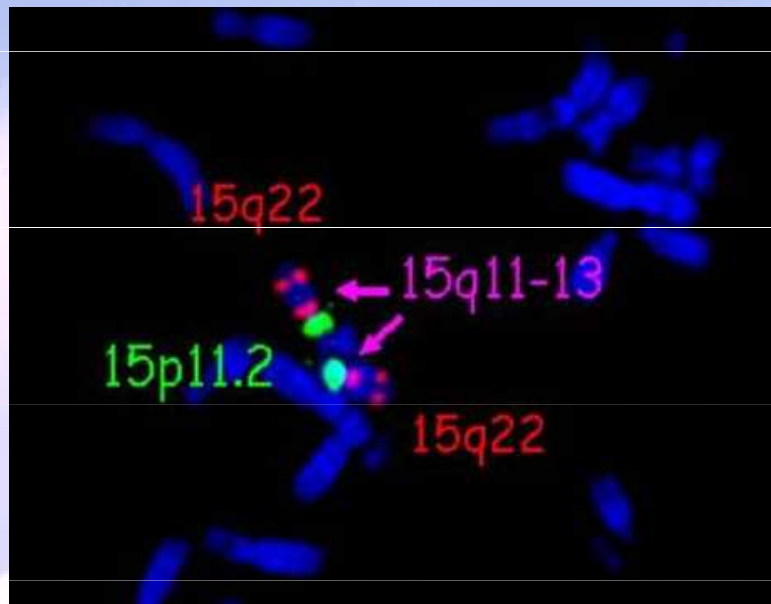


# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – FISH (fluorescenční in situ hybridizace) – využití sond – mikrodeleční syndromy PWS-AS

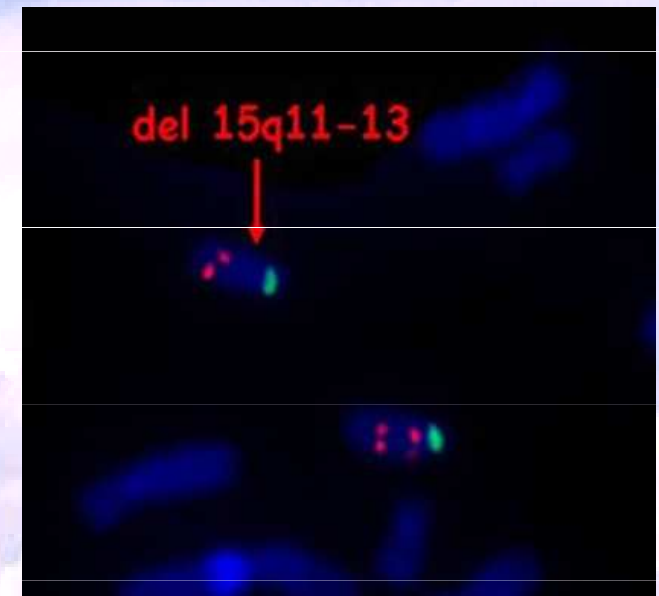
- využití lokus specifických sond - detekce mikrodelece na chromozomu 15 u mikrodelečních syndromů Prader-Willy (PWS) a Angelman (AS) (oblast na chromozomu, asi 100 genů)



červeně označena oblast  
zodpovědná za PWS a AS



15p11.2 – kontrolní lokus specifická sonda  
15q22 – kontrolní lokus specifická sonda  
15q11-13 – lokus specifická sonda na oblast  
Prader-Willy-Angelman



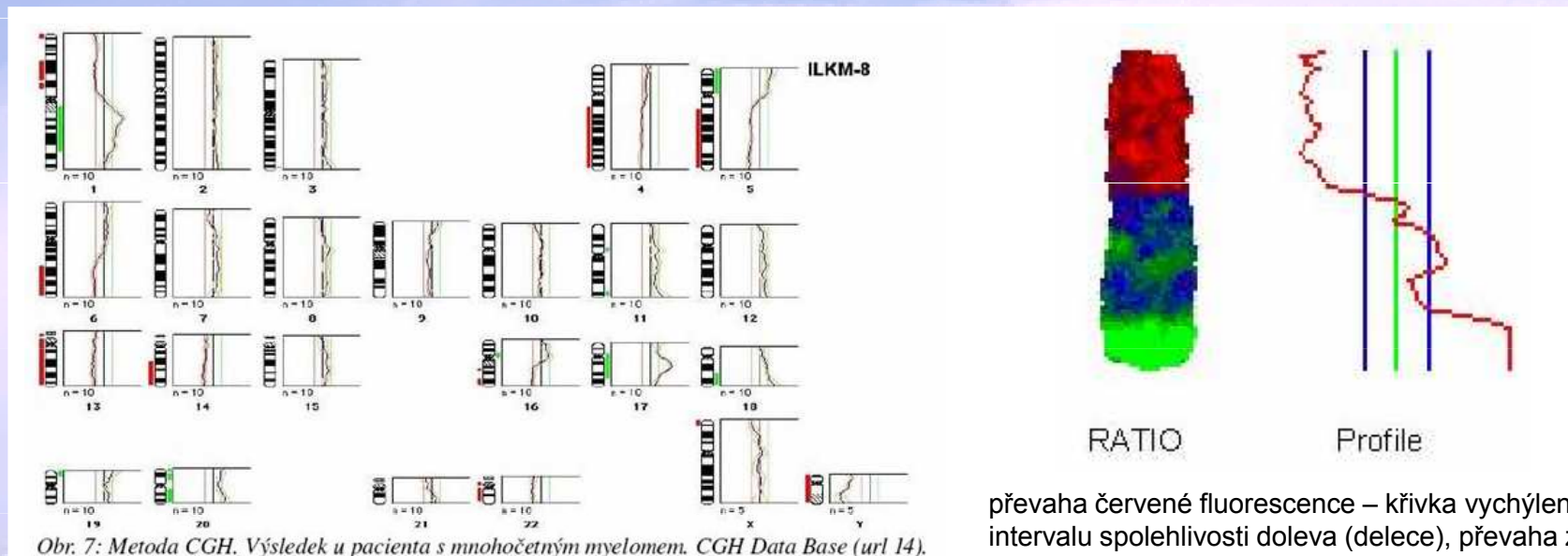
delece oblasti Prader-Willy–Angelman (signál  
chybí)

Stejný fenotypový efekt může  
vznikat i jinými mechanizmy než  
mikrodelecí – uniparentální dizomie



# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MODIFIKACE FISH – CGH (komparativní genomová hybridizace)

- 1992
- odhaluje **nebalancovaný** genetický materiál (chybění – nadbytek DNA), rozlišovací schopnost CGH je 5 – 10 Mb
- není schopna analyzovat balancované přestavby



zeleně označeny úseky na chromozomech, které jsou v karyotypu maligního klonu zmnoženy, červeně označeny chybějící úseky chromozomů (obrázky převzaty z internetu)

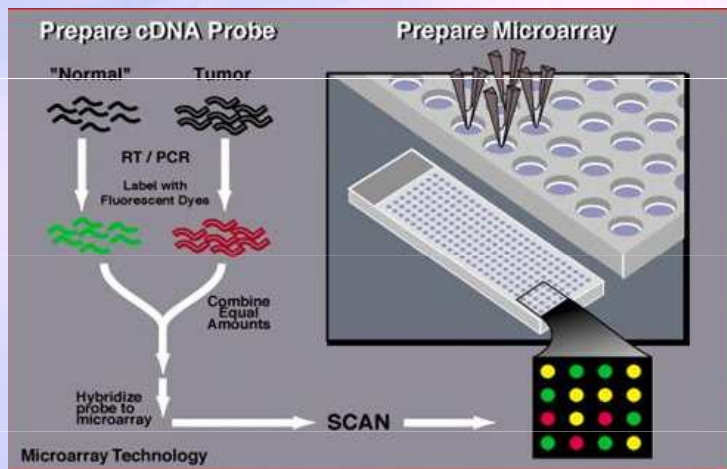
# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MODIFIKACE FISH – CGH (komparativní genomová hybridizace)

- modifikace metody CGH :

- **HR-CGH (high resolution CGH)** – CGH s **vysokým rozlišením**, odhalí chybění či nadbytek menších úseků DNA než CGH, metodika se od CGH liší počítačovým zpracováním – rozlišovací schopnost metody přibližně 4 Mb

- **ARRAY-CGH** – na microarraye (skleněné mikroskopické destičky) jsou navázány úseky DNA, jejichž delece či amplifikace nás u konkrétního pacienta zajímá (destičky s DNA sekvencemi (mikročipy) lze zakoupit), připravíme celogenomové sondy stejným způsobem jako u CGH, nahybridizujeme na destičku, analyzační software měří intenzity fluorescence v jednotlivých bodech na destičce (v místech vazby konkrétních sekvencí)

- význam ARRAY-CGH – mapování s **vyšším rozlišením než HR-CGH** , rozlišovací schopnost závisí na množství DNA, které se nachází v jednotlivých bodech na destičce (kratší – delší sekvence) – až 35 kb



# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MODIFIKACE FISH – SKY (spektrální karyotypování), M-FISH (multicolor FISH)

- 1996
- umožňuje vizualizaci všech lidských metafázních chromozomů při jednorázové hybridizaci – 5 fluorochromy značená směs chromozomově specifických sond, jedinečná kombinace sond na každém chromozomu, každý chromozomový pár má jinou barvu
- SKY a M-FISH se liší jen systémem filtrů, který se používá při vizualizaci chromozomů fluorescenčním mikroskopem (SKY – 1 filtr, M-FISH – 5 filtrů, zvlášť pro každý fluorochrom) – mikroskop je napojen na kameru a počítač – snímání a zpracování obrazu
- význam – vyjasnění složitých přestavech (komplexních aberací)
  - identifikace kryptických (skrytých) přestaveb
  - identifikace původu markerů a ring chromozomů – obtížně určitelné klasickými metodami i samostatnými sondami
- limity – nelze detekovat nebalancovaný materiál (nadbytek-chybění DNA)  
inverze



# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MODIFIKACE FISH – SKY (spektrální karyotypování), M-FISH (multicolor FISH)

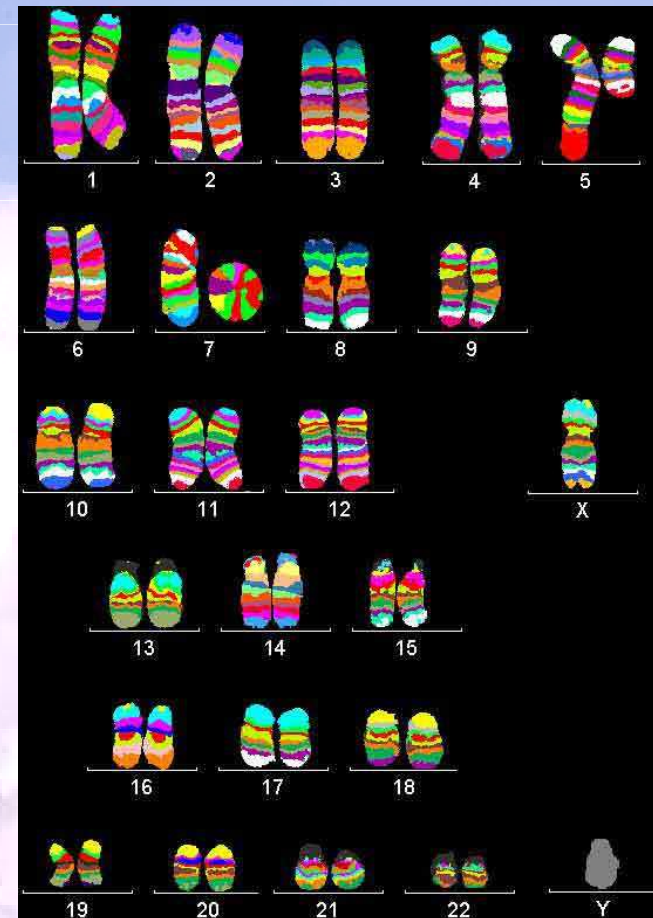


SKY – mitóza po hybridizaci  
se směsí fluorochromů

SKY – seřazené chromozomy po úpravě obrazu

# METODY MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY – MODIFIKACE FISH – m-BAND (mnohobarevné pruhování)

- 1999
- mnohobarevná pruhovací technika s vysokým rozlišením, pomocí které lze analyzovat intrachromozomální přestavby (inverze, inzerce, delece) a mapovat místa zlomů na chromozomech



# Nádorová cytogenetika



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# ONKOCYTOGENETIKA

## základy

- zhoubné bujení je genetické onemocnění
- vznik nádoru (maligní transformace) je **mnohastupňový proces** – sled genetických změn – mutace genů řídících buněčné dělení, růst a diferenciaci, buněčný zánik, reparaci DNA, přestavby na úrovni chromozomů a genomu, narušení integrity genomu (defekty v genech zajišťujících chromozomovou stabilitu a přesnou mitotickou segregaci)
- mutace mohou vzniknout **de novo** před vznikem nebo během vývoje nádoru, některé je možné **zdědit** jako familiární predispozici k nádorovému onemocnění
- **nádorová buňka je charakterizována trvalým a nekoordinovaným dělením, vymkla se signálům, které řídí její funkci**
- maligní buňky mají během vývoje nádoru tendenci **akumulovat chromozomové abnormality** = získané chromozomové změny v důsledku poruchy regulačních mechanismů buňky (srovnej s kapitolou ZCA – vznik přestaveb v důsledku působení faktorů vnějšího prostředí). Je třeba je odlišovat od konstitučních, vrozených chromozomových změn (viz VCA).



# ONKOCYTOGENETIKA

## základy

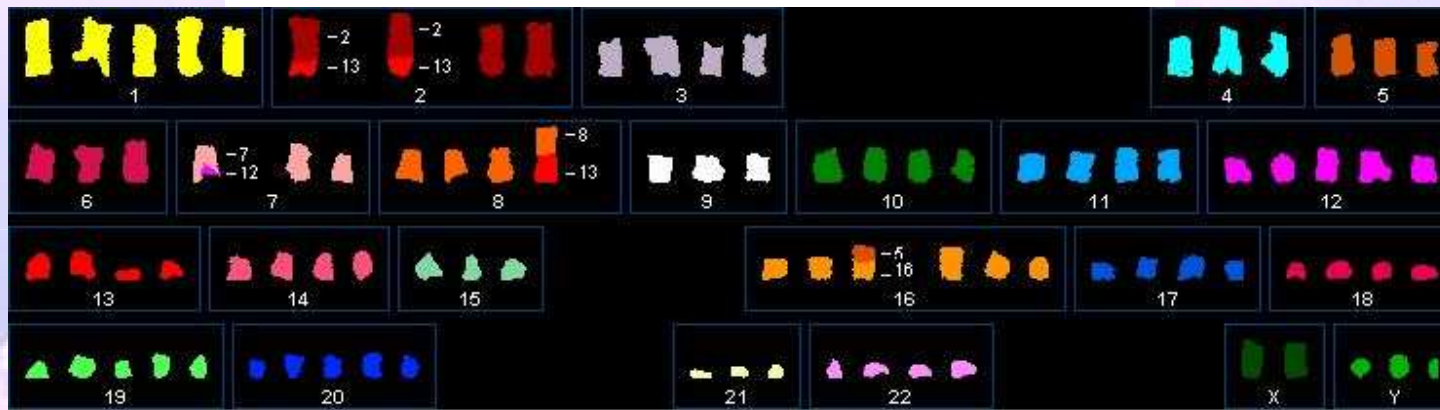
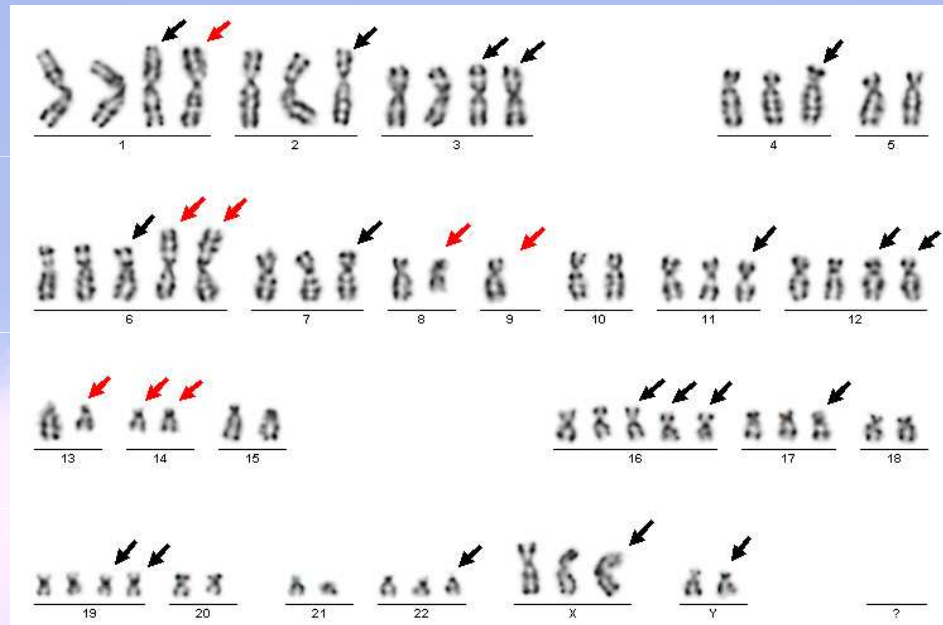
- **klon** – skupina geneticky identických buněk (maligní sublinie)
- chromozomové změny
  - **konstantní změny** – jsou **nenáhodné**, hrají **roli při vzniku** malignity
  - **aberace náhodné** – průvodní jev při progresi nádoru
  - **primární** – aberace, jimiž jsou ovlivněny geny, jejichž změna může vést **přímo k transformaci** postižené buňky v buňku nádorovou
  - **sekundární** (většina) – vznikly během vývoje maligního onemocnění
- **komplexní chromozomové změny** – charakteristický znak zhoubných nádorů zvláště v pozdějších stádiích progresu nádoru
  - hromadění nových strukturních a numerických změn chromozomů
- konkrétní chromozomové změny mohou být spojeny s **dobrou, středně dobrou nebo špatnou prognózou** vývoje onemocnění





# ONKOCYTOGENETIKA

## základy – komplexní karyotyp



# ONKOCYTOGENETIKA

## protoonkogeny - onkogeny

- **protoonkogeny** – normální geny přítomné ve všech buňkách, jsou zahrnuty do procesů regulace buněčné proliferace (buněčného dělení, růstu a diferenciaci) a reparace (opravy) DNA
- **onkogeny** – mutované („aktivované“) alely protoonkogenů, mutace vede k **zisku funkce** nebo **změně funkce** (atypická aktivace).  
Usnadňují maligní transformaci.



# ONKOCYTOGENETIKA

## protoonkogeny - onkogeny

- typy aktivace – inserce
  - bodové mutace (mutace genu samotného nebo jeho regulačních oblastí)
  - chromozomové translokace (poziční efekt – protoonkogen se přesune pod vliv silného promotoru, začne se silněji exprimovat, fúzní protein má nádorové vlastnosti) – t(9;22) BCR/ABL, t(15;17) PML/RARA
  - genové amplifikace (zvýšení počtu kopií genu v genomu – u pokročilejších tumorů) - amplifikace onkogenu N-myc na chromozomu 2p u neuroblastomu
- účinek onkogenů je **dominantní** – stačí 1 mutovaná alela genů k přeměně fenotypu buňky z normální na rakovinnou (transformace)
- k transformaci buňky je třeba nahromadění většího počtu genetických změn – nestačí aktivace 1 onkogenu
- příklady onkogenů – MYC, ABL

# ONKOCYTOGENETIKA

## tumor supresorové geny

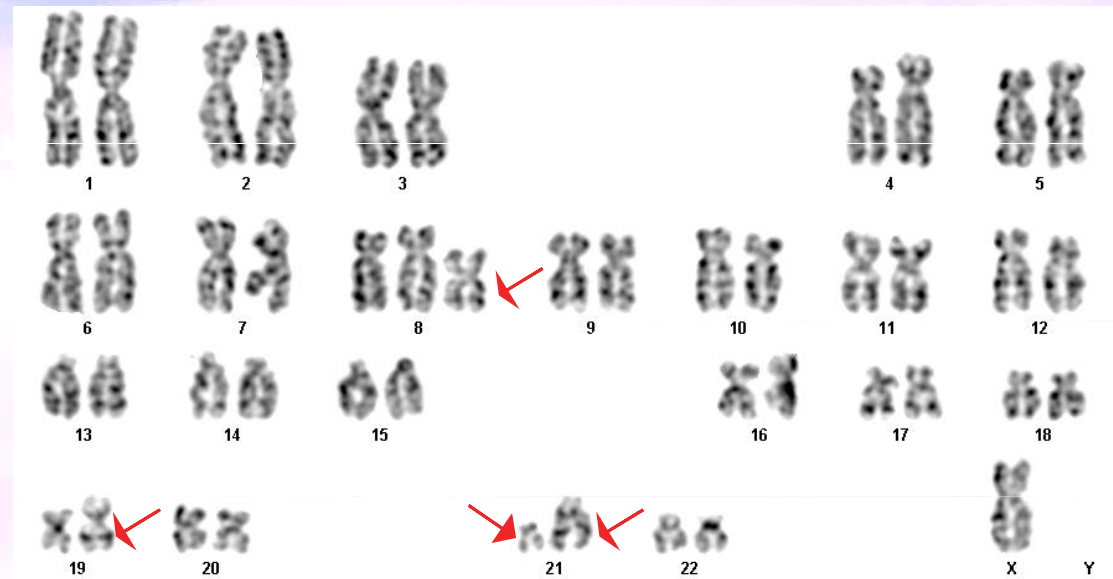
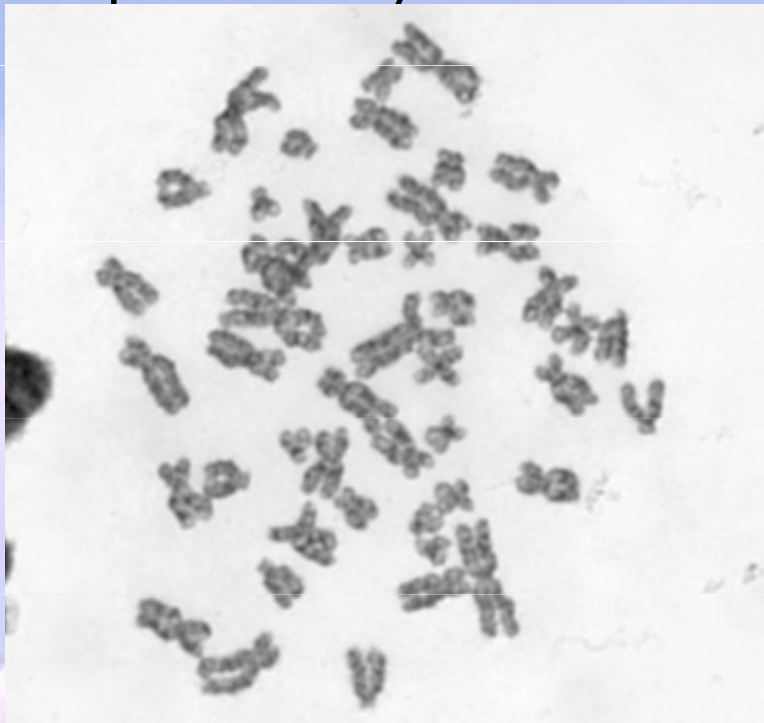
- **tumor supresorové geny (antionkogeny)** – normální buněčné geny, jejichž funkcí je zabránit nekontrolovanému dělení buněk. Řídí buněčné dělení a diferenciaci, zabráňují tvorbě metastáz regulací buněčného cyklu, kontaktní inhibicí růstu buněk, reparací DNA. Jejich onkogenicita se projeví při **ztrátě funkce (inaktivaci) obou alel genu.**
- účinek tumor supresorových genů je **recesivní** – k iniciaci nádorového procesu musí být inaktivovány obě alely genu nacházející se na homologních chromozomech
- mutační mechanismy – mutace vedoucí k inaktivaci obou alel genu
  - ztráta (delece) celého genu (1 delece může být zděděná, druhá získaná)
  - ztráta části chromozomu
  - ztráta celého chromozomu
- příklady tumor supresorových genů – gen RB1 chr. 13, gen WT1 chr. 11



# ONKOCYTOGENETIKA

## hodnocení preparátů

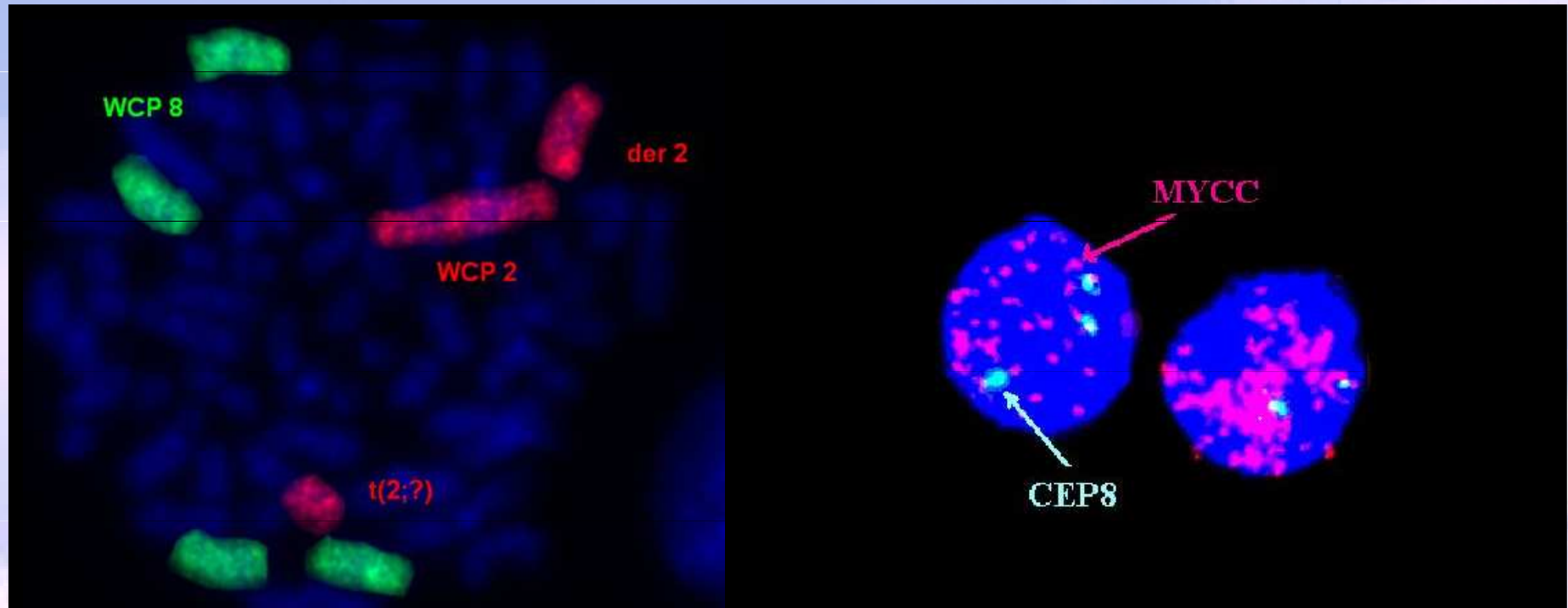
- metodami klasické cytogenetiky – G pruhování chromozomů, stanovení **karyotypu maligních klonů** (světelný mikroskop, počítačový dokumentační systém)



# ONKOCYTOGENETIKA

## hodnocení preparátů

- metodami molekulární cytogenetiky (FISH) – v interfázi nebo metafázi



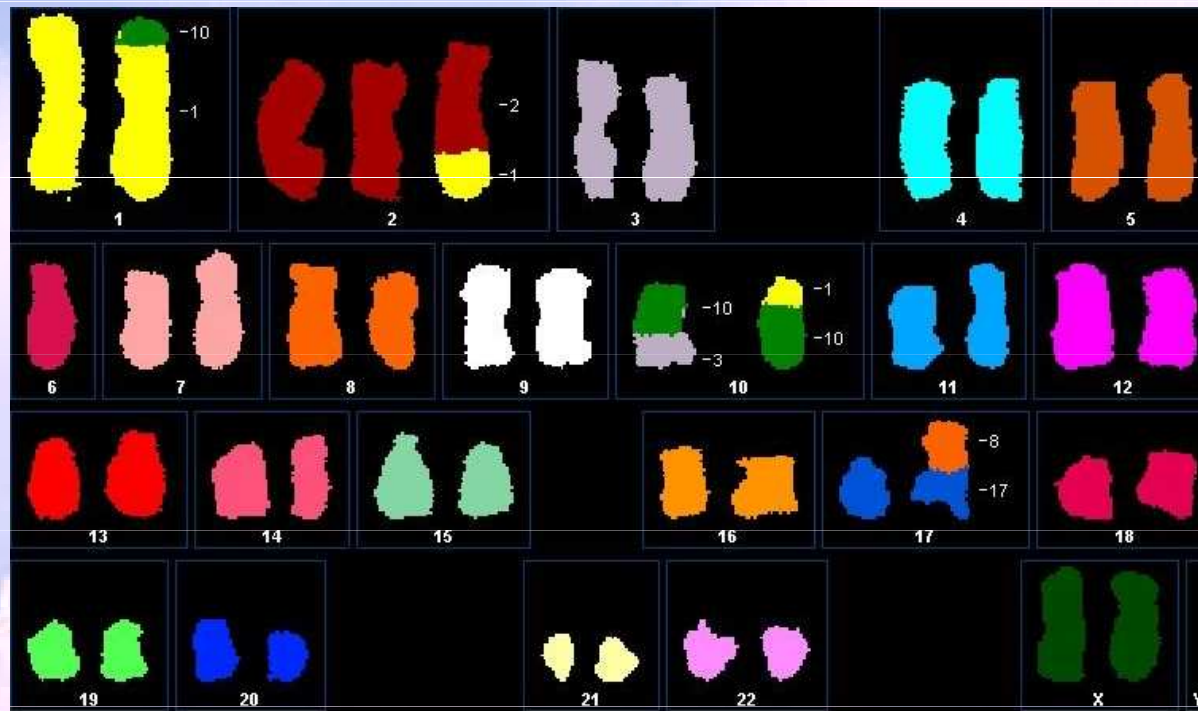
celochromozomové sondy – analýza  
na metafázních chromozomech

centromerická (CEP8) a lokus specifická  
(MYCC) sonda – analýza v **interfázi**

# ONKOCYTOGENETIKA

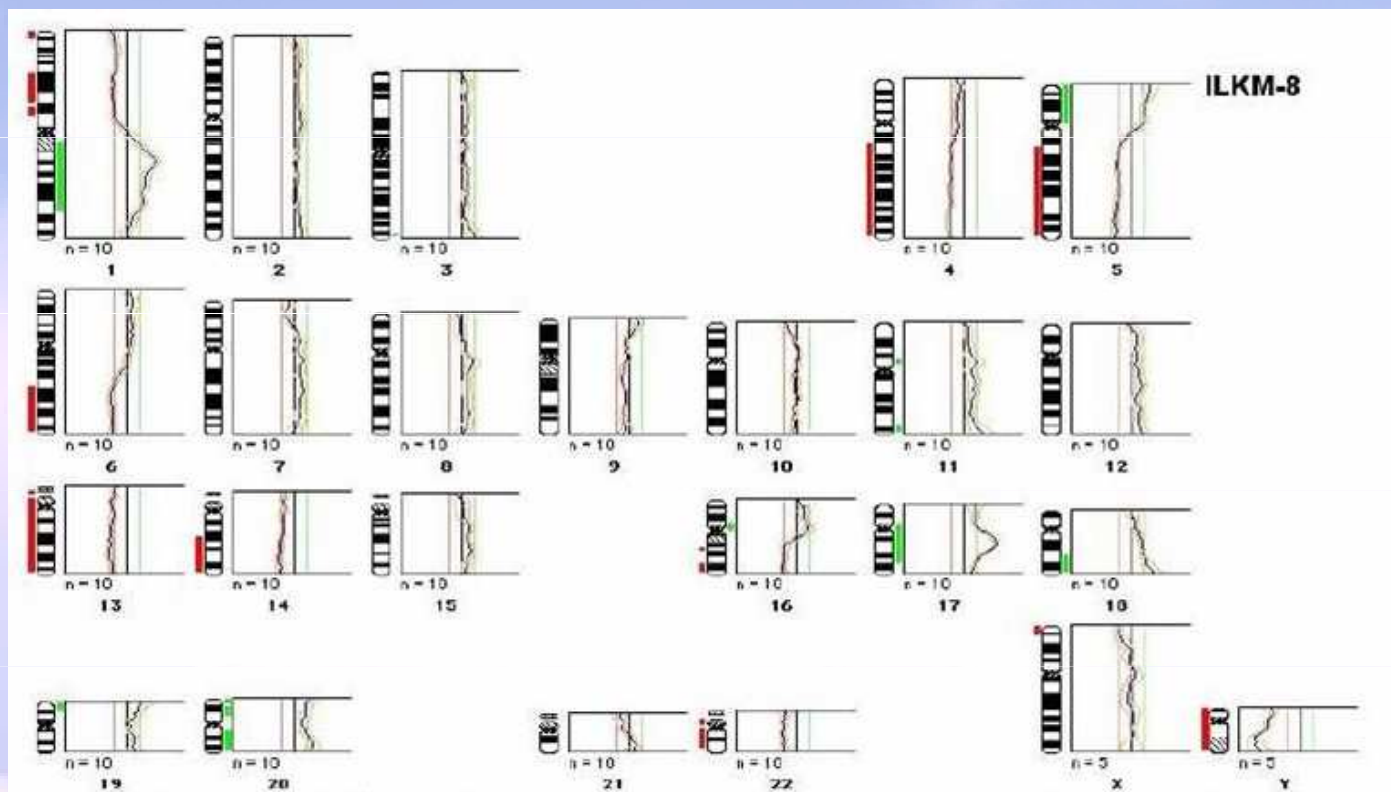
## hodnocení preparátů

- metodami molekulární cytogenetiky (SKY) – ukáže mnohem větší rozsah abnormalit než je viditelný pruhovacími metodami



# ONKOCYTOGENETIKA hodnocení preparátů

- metodami molekulární cytogenetiky (CGH)



Obr. 7: Metoda CGH. Výsledek u pacienta s mnohočetným myelomem. CGH Data Base (url 14).



# ONKOCYTOGENETIKA

## typy chromozomových změn

- chromozomové změny - **početní**
  - **aneuploidie** – jev, kdy dochází k chybění nebo nadbytku chromozomů v buňce (nondisjunkce)
  - **aneuzomie – hypoploidie** (hypohaploidie – **počet chromozomů menší než haploidní (23)**, hypodiploidie – počet chr. je menší než diploidní (46) , hypotriploidie - ....menší než triploidní (69), hypotetraploidie - ....menší než tetraploidní (92) atd.) – (multipolární mitózy, aneuploidie)
  - **hyperploidie** (hyperhaploidie – **počet chromozomů větší než haploidní**, hyperdiploidie - ....větší než triploidní atd.) - (endomitóza)

Vznikají v důsledku **poruch mitózy** – nondisjunkce (chybný rozchod chromozomů) v **mitóze**, endomitóza (v S fázi buněčného cyklu dojde k replikaci DNA, ale chromozomy se v mitóze nerozcházejí, jádro se nedělí, tzn. počet chromozomů je zdvojený (nebo znásobený, pokud proces proběhl vícekrát)), multipolární mitózy (abnormální redukce počtu chromozomů).



# ONKOCYTOGENETIKA

## typy chromozomových změn – aneuploidie

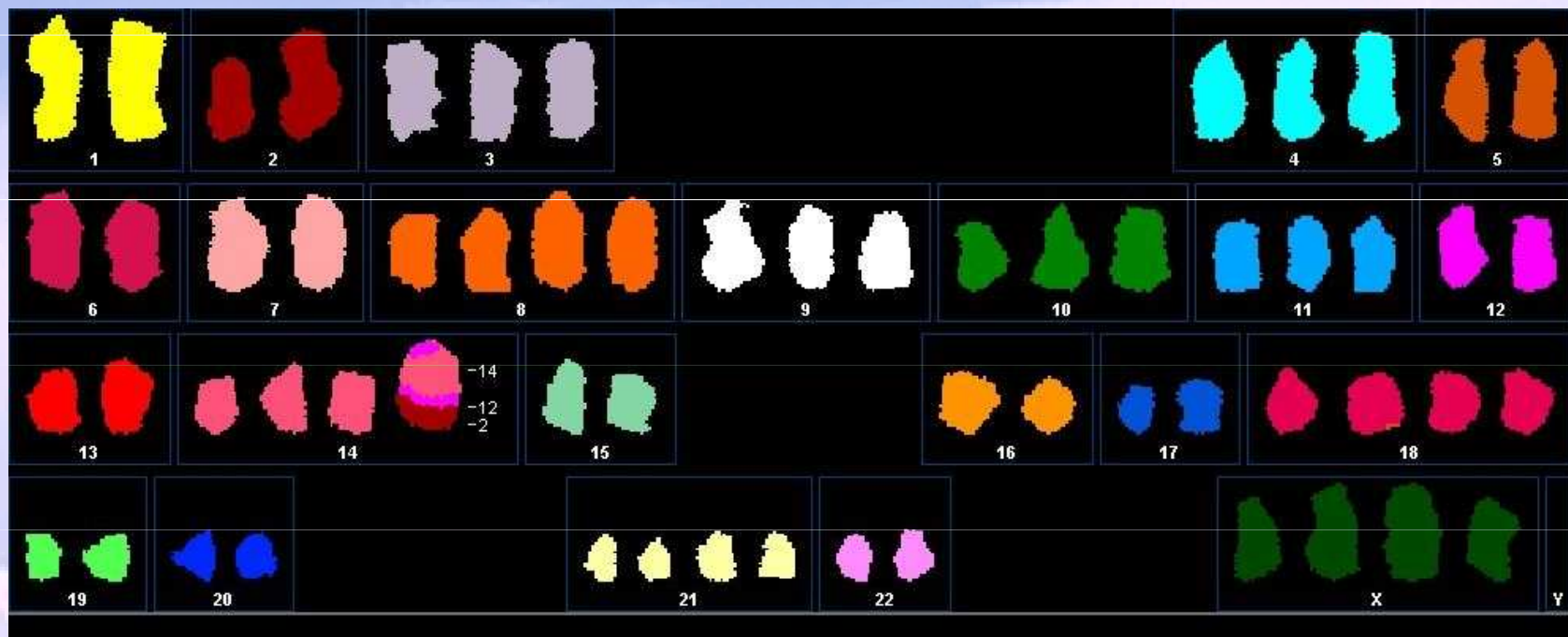
47,XX,+8



# ONKOCYTOGENETIKA

## typy chromozomových změn – aneuzomie

abnormální počet chromozomů v karyotypu maligního klonu



# ONKOCYTOGENETIKA

## typy chromozomových změn

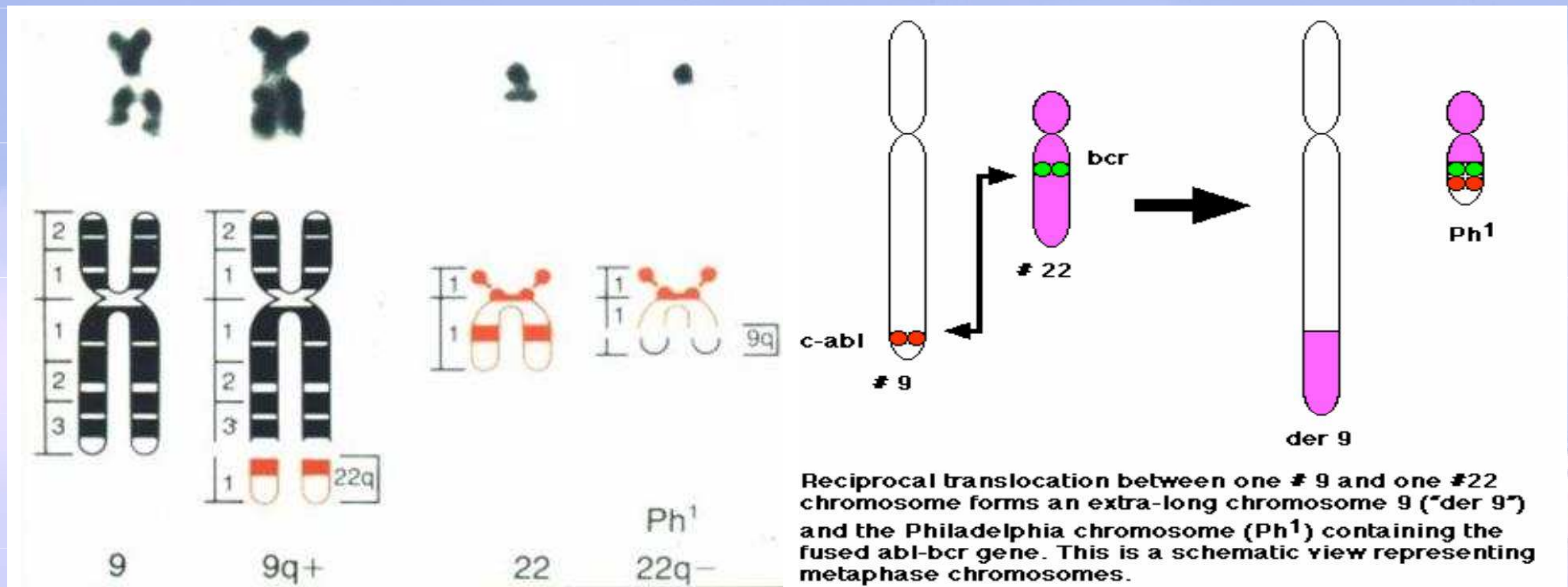
- chromozomové změny - **strukturní**  
změny, které lze nalézt klasickým karyotypováním:
    - **translokace** – balancované (výměny chromozomových segmentů mezi dvěma, zpravidla nehomologními, chromozomy, v karyotypu je zachováno normální množství chromozomového materiálu)
      - nebalancované (část chromozomu chybí (parciální monozomie), část přebývá (parciální trizomie, tetrazomie, atd.)
    - **inverze** - na jednom chromozomu vzniknou 2 zlomy, segment mezi nimi se otočí o 180° a opět se začlení do chromozomu
    - **delece** - ztráta úseku chromozomu, který způsobuje vznik nebalancovaného karyotypu (parciální monozomie), terminální nebo intersticiální
    - **amplifikace** - v buňce je přítomno mnoho kopií nějakého segmentu genomu
    - **izochromozomy, ring chromozomy, marker chromozomy**
- metodami molekulární cytogenetiky potvrzujeme nálezy klasické cytogenetiky a nalézáme další přestavby, které nejsou viditelné na chromozomech s G-pruhou:  
inverze, translokace, delece malých úseků, odhalí původ marker chromozomů, ring chromozomů .....



# ONKOCYTOGENETIKA

## příklady typických chromozomových změn - translokace

- t(9;22) – reciproká translokace



# ONKOCYTOGENETIKA

## příklady typických chromozomových změn - translokace

- t(9;22) je specifickým markerem CML (chronická myeloidní leukemie)



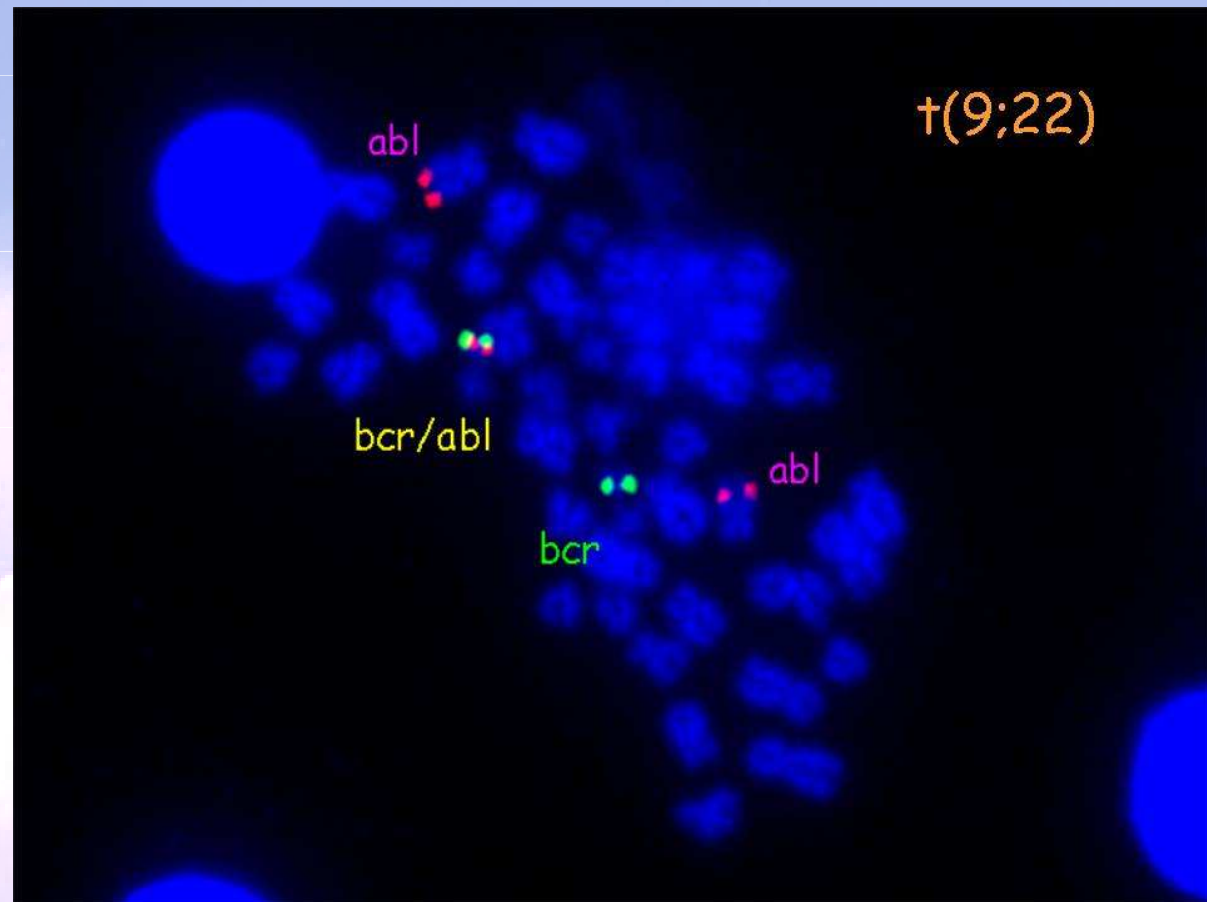
- Ph chromozom, obsahuje fúzní (chimérický, hybridní) gen BCR/ABL

Na chromozomu 9 se v oblasti, kde dochází ke zlomům, nachází gen ABL, na chromozomu 22 gen BCR. Při translokaci dochází k výměně částí genů, vznikají fúzní geny BCR/ABL a ABL/BCR. Proteiny, které vznikají expresí těchto genů, získávají nové funkční vlastnosti oproti původním genům BCR a ABL. Z hlediska onkocytogenetiky má význam **gen BCR/ABL, který podmiňuje vznik CML.**

# ONKOCYTOGENETIKA

## příklady typických chromozomových změn - translokace

- FISH detekujeme přestavbu BCR/ABL, lokus specifická sonda umožňuje vyšetřovat i interfázní jádra - vznik fúzního signálu u fúzního genu (změna barvy signálu - žlutá, samostatné signály zelená a červená)

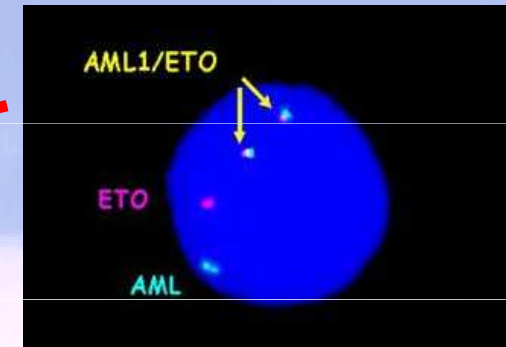


# ONKOCYTOGENETIKA

## příklady typických chromozomových změn - translokace

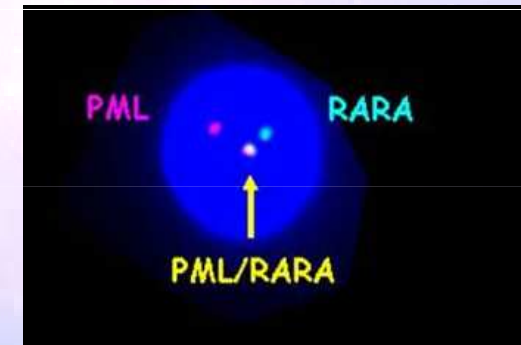
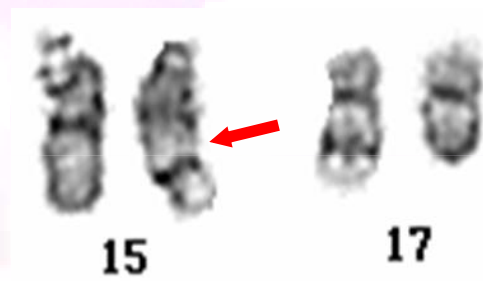
- další časté translokace:

- t(8;21) – fúzní gen AML1/ETO  
AML-M2 (akutní myeloidní leukemie podtyp M2)



lokus specifické sondy, vznik fúzního signálu, v interfázním jádře

- t(15;17) – fúzní gen PML/RARA  
AML-M3

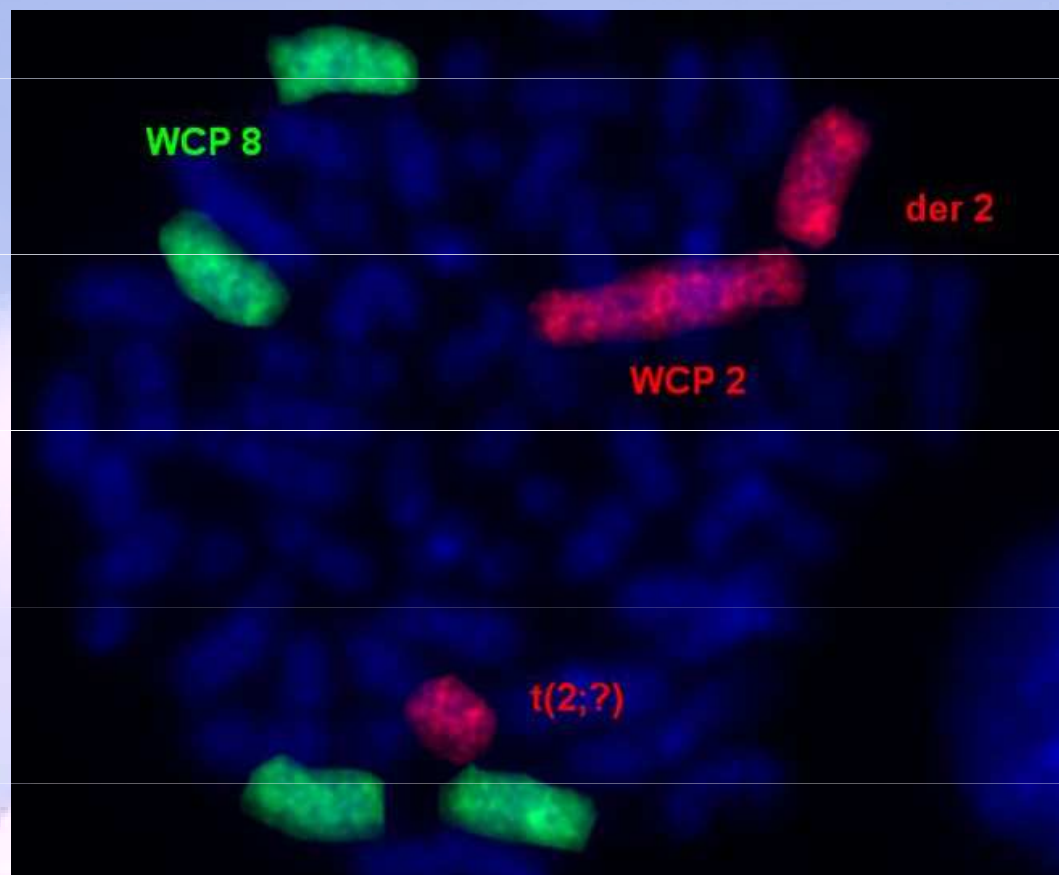


- translokace s chromozomem 8, místo zlomu v protoonkogenu c-MYC  
lymfomy



# ONKOCYTOGENETIKA

## příklady typických chromozomových změn - translokace

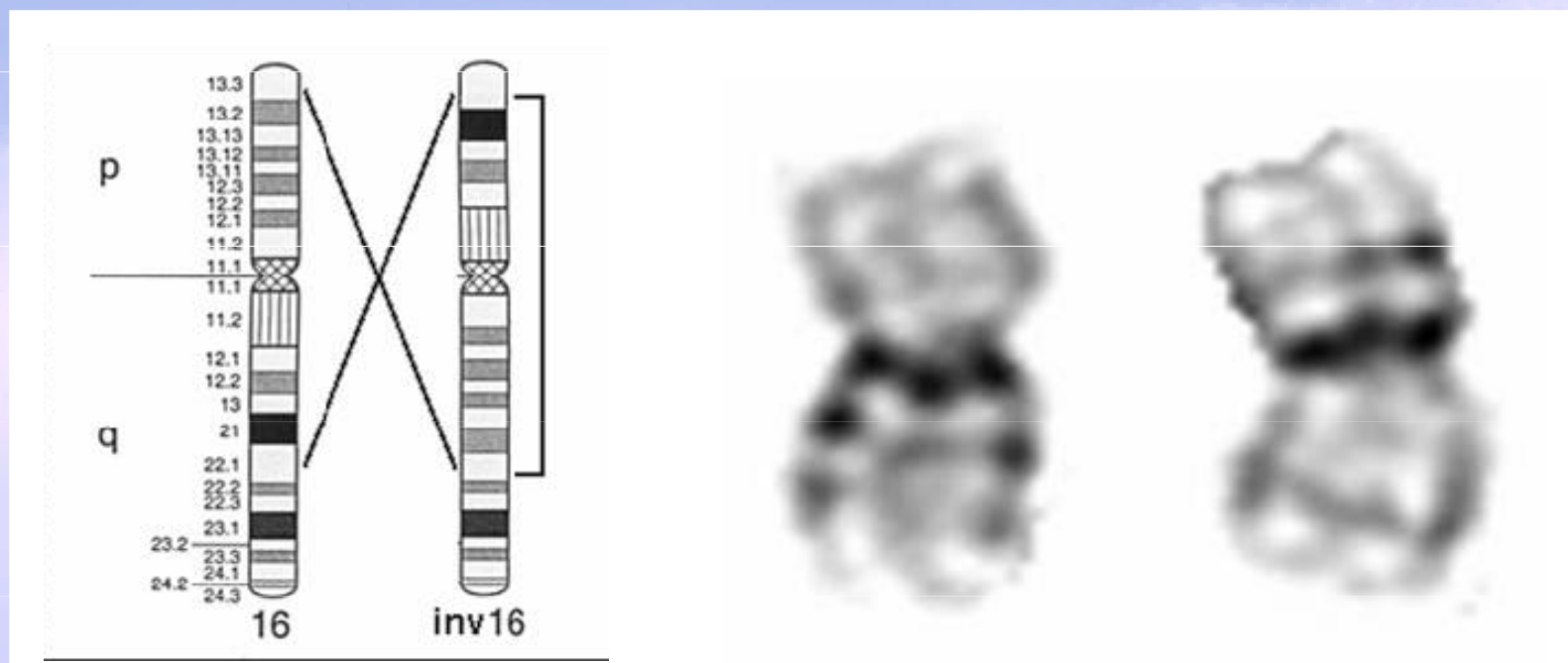


potvrzení translokace u onkologických pacientů pomocí celochromozomových sond na metafázních chromozomech

# ONKOCYTOGENETIKA

## příklady typických chromozomových změn - inverze

- **inv(16) – AML-M4 Eo**



# ONKOCYTOGENETIKA

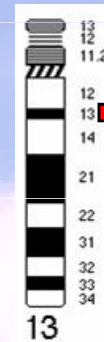
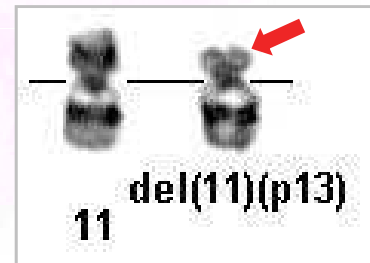
## příklady typických chromozomových změn - delece

- jsou spojeny se ztrátou částí chromozomů většího nebo menšího rozsahu
- nacházíme je především u solidních nádorů, ale i u hematologických malignit

- **delece u solidních nádorů**

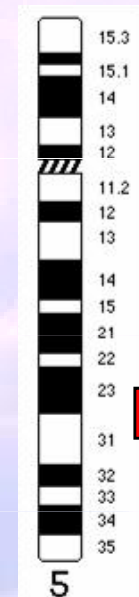
- delece tumor supresorového genu RB1  
chr. 13q – retinoblastom (nádor sítnice)

- delece protoonkogenu WT1 chr. 11p  
– Wilmsův tumor (nádor ledvin)



- **delece u leukemií**

- delece 5q až úplná ztráta chromozomu 5 (různý rozsah delece)
  - delece 11q často v oblasti genu MLL



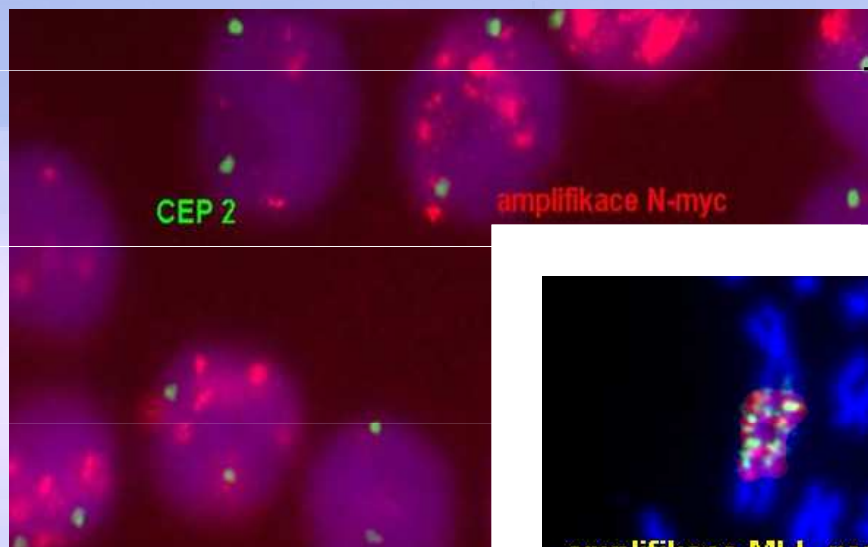
červeně označená oblast – kritická oblast, která chybí vždy

# ONKOCYTOGENETIKA

## příklady typických chromozomových změn - amplifikace

- **genová amplifikace** – v buňce je přítomno mnoho kopií nějakého segmentu genomu

- homogenně se barvící oblasti (HSR) - několik tisíc genových kopií



- amplifikace onkogenu n-MYC

u neuroblastomu (zelený signál – centromerická sonda, červený signál – lokus specifická sonda) – analýza v interfázním jáře – amplifikovaný materiál z jednoho chromozomu rozložen po celém jádře, chromozom despiralizován



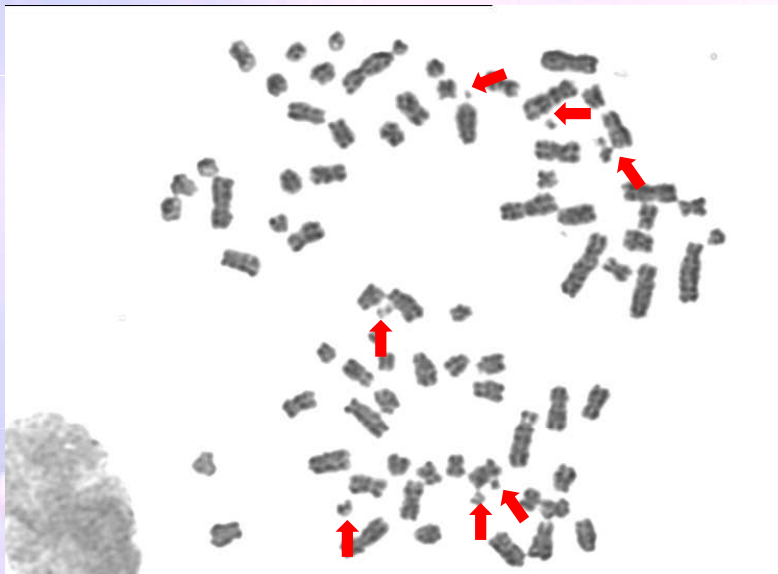
- amplifikace genu MLL u leukemií

(lokus specifická sonda) – analýza na metafázních chromozomech – lokalizace HSR na chromozomu v místě lokalizace genu

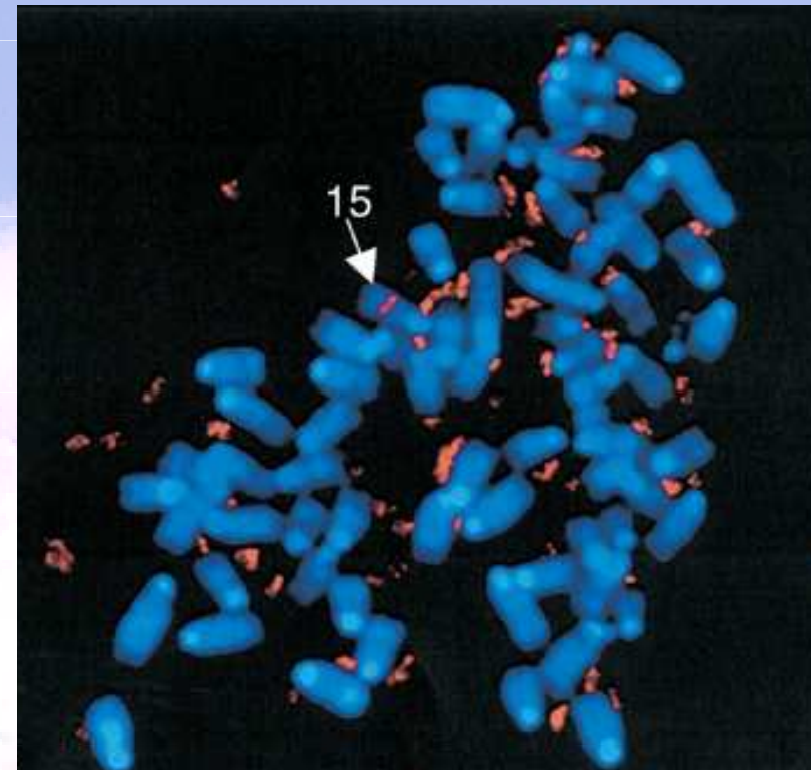
# ONKOCYTOGENETIKA

## příklady typických chromozomových změn - amplifikace

- **genová amplifikace**
  - double minutes (DM) = velmi malé nadbytečné chromozomy – vznik rozpadem HSR - homogeneously stained regions (nalézáme je v mitóze – chromozomový materiál rozlámaný na malé kousky)



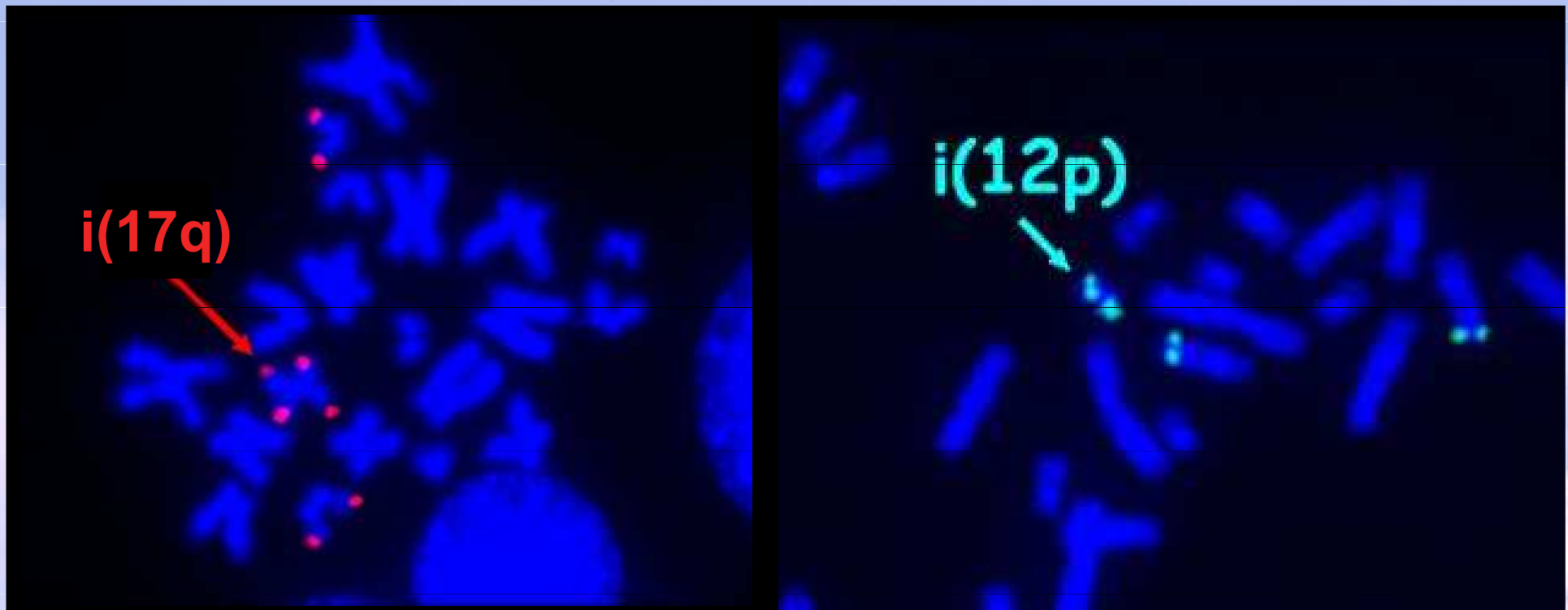
DM na chromozomech s G-pruhou



amplifikace onkogenu c-myc, vizualizováno FISH – obrázek převzat z prezentace „cytogenetika člověka“ PŘF UK

# ONKOCYTOGENETIKA

## příklady typických chromozomových změn - izochromozom



izochromozom 17q u dětského tumoru  
(červený signál – telomerická sonda na oblast 17q)

izochromozom 12p u dětského tumoru  
(modrý signál – telomerická sonda na oblast 12p)

# VÝZNAM ONKOCYTOGENETICKÉHO VYŠETŘENÍ

- zpřesnění diagnózy
- stanovení prognózy onemocnění
- zjištění fáze onemocnění (remise, relaps)
- sledování úspěšnosti léčby (transplantace kostní dřeně při léčbě leukemií, chemoterapie)
- charakteristika dosud nepopsaných chromozomových abnormalit



# TYPY NÁDORŮ VYŠETŘOVANÉ CYTOGENETICKY na OLG FN Brno

- HEMATOLOGICKÉ MALIGNITY (leukemie)
  - lymfoblastická leukemie – postihuje buňky lymfoidní vývojové řady
    - akutní (ALL) – nejčastější u dětí
    - chronická (CLL)
  - myeloidní leukemie – postihuje buňky myeloidní vývojové řady
    - akutní (AML) – t(15;17), t(8;21), inv(16)
    - chronická (CML) – **t(9;22) - Ph chromozom**
  - myelodysplastický syndrom (MDS) – dysplastické změny v hemopoetických řadách v kostní dřeni – del(5)
- SOLIDNÍ NÁDORY
  - všechny typy maligních nádorů u dětí – nádory CNS, Ewingův sarkom, Wilmsův tumor, osteosarkomy, lymfomy a další .....





# Preimplantační genetická diagnostika



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA (PGD)

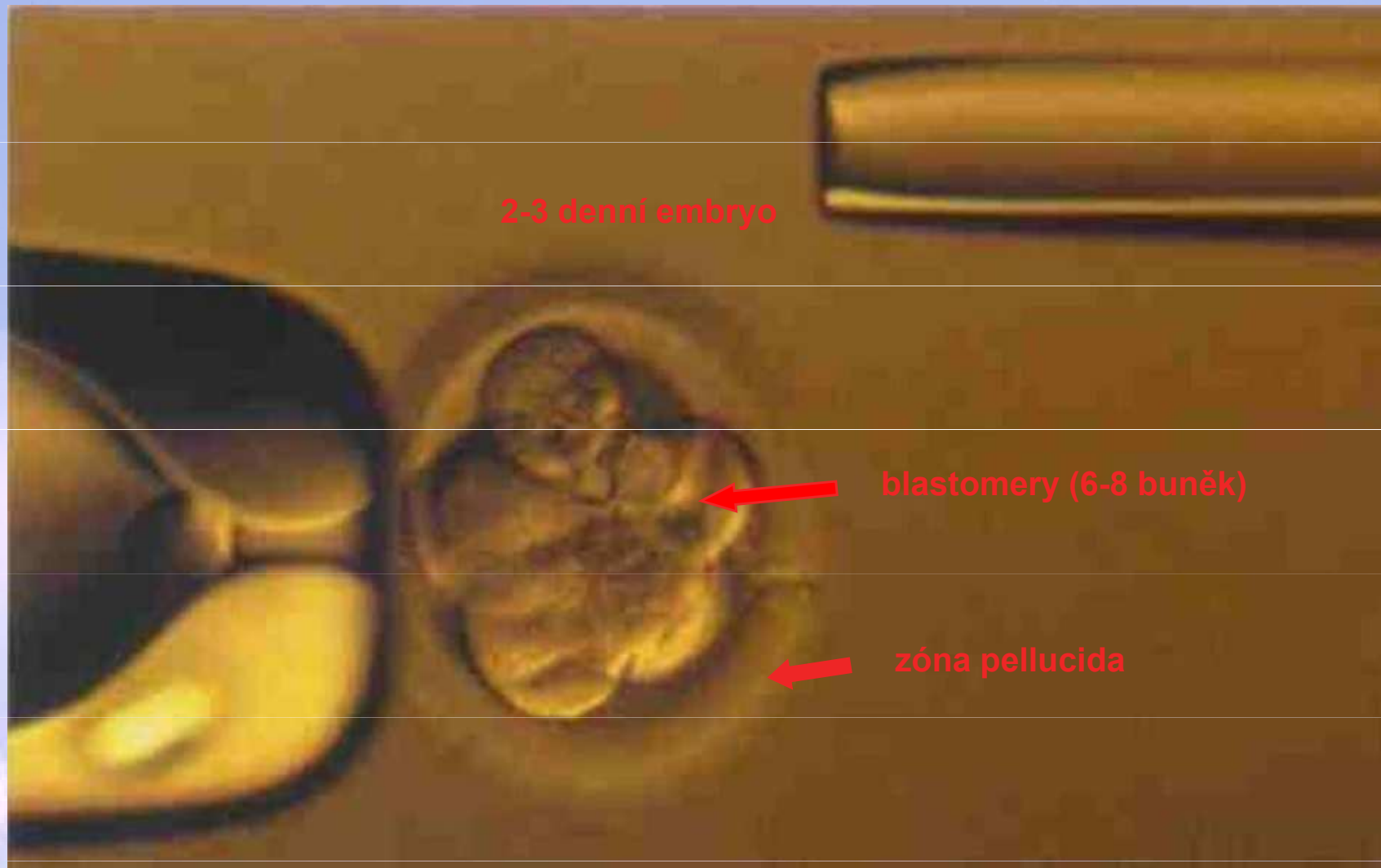
- časná prenatální diagnostiku, která je vázaná na techniky umělého oplodnění.
- genetické vyšetření jedné nebo dvou buněk (blastomer) odebraných z vyvíjejícího se vícebuněčného embrya (stáří 2-3 dny), lze odhalit genetické abnormality budoucího plodu
- k transferu do dělohy lze vybrat pouze embrya bez genetické zátěže
- cílem je zvýšit úspěšnost metod asistované reprodukce a snížit riziko spontánních potratů



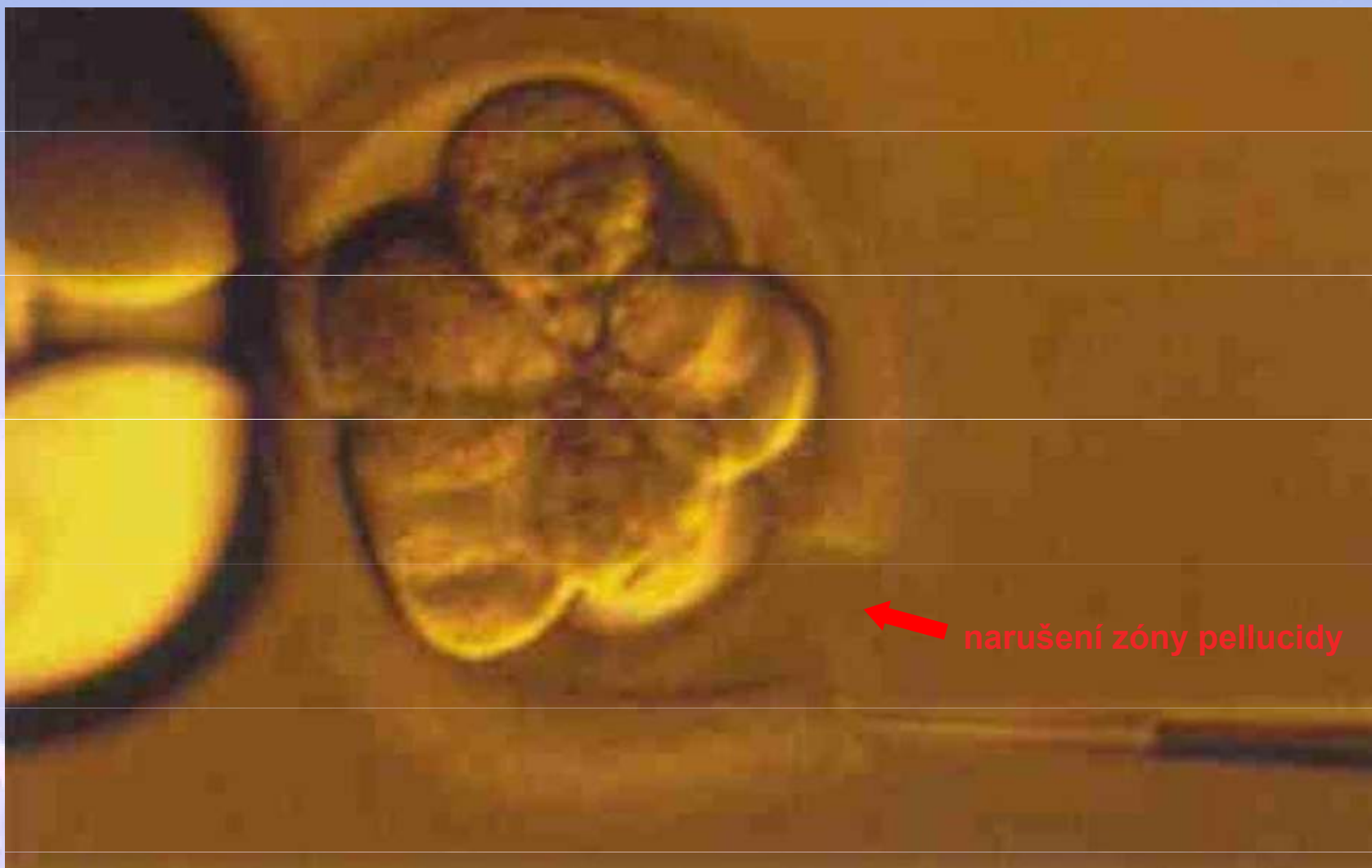
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



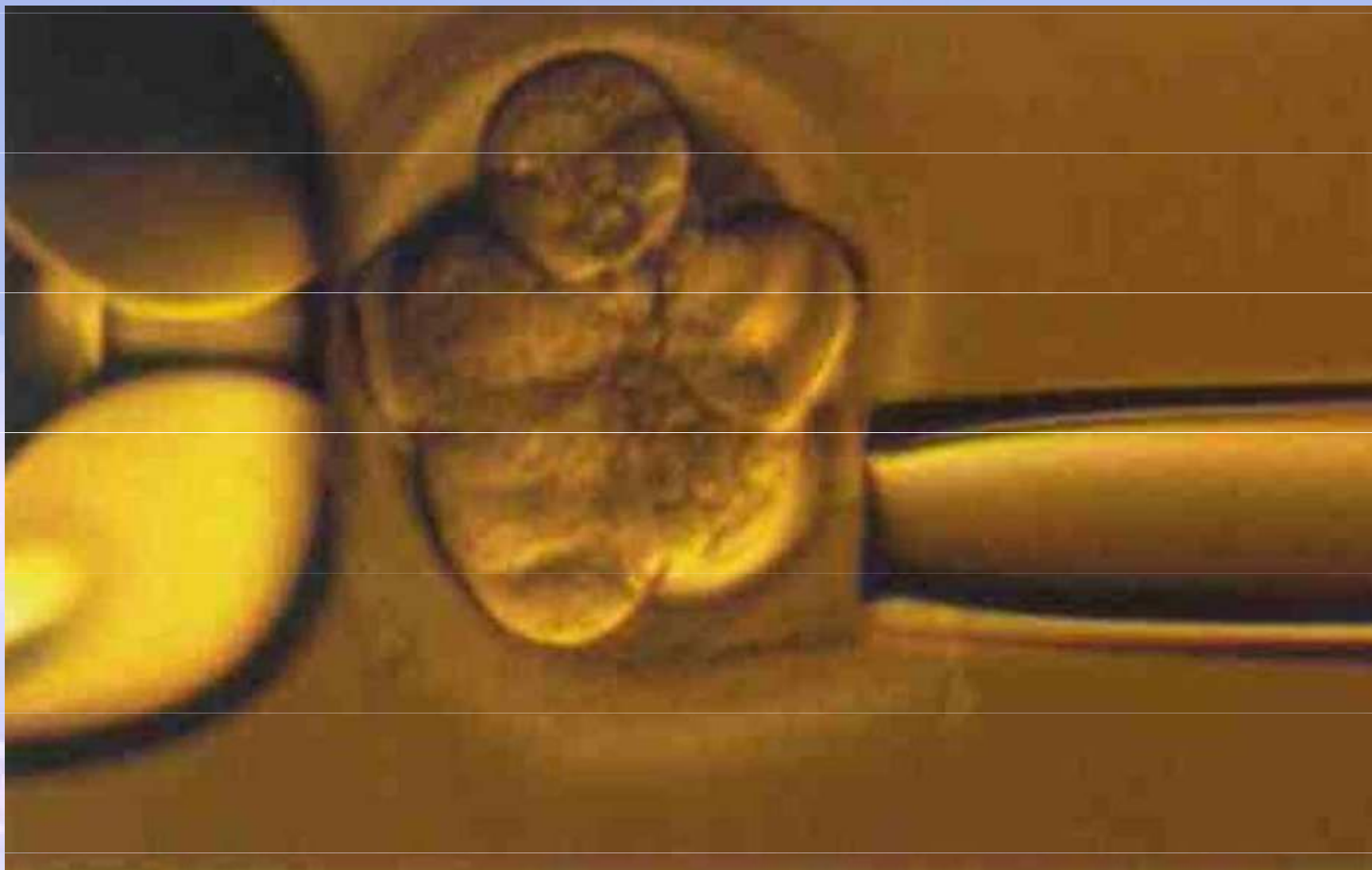
# PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA (PGD)



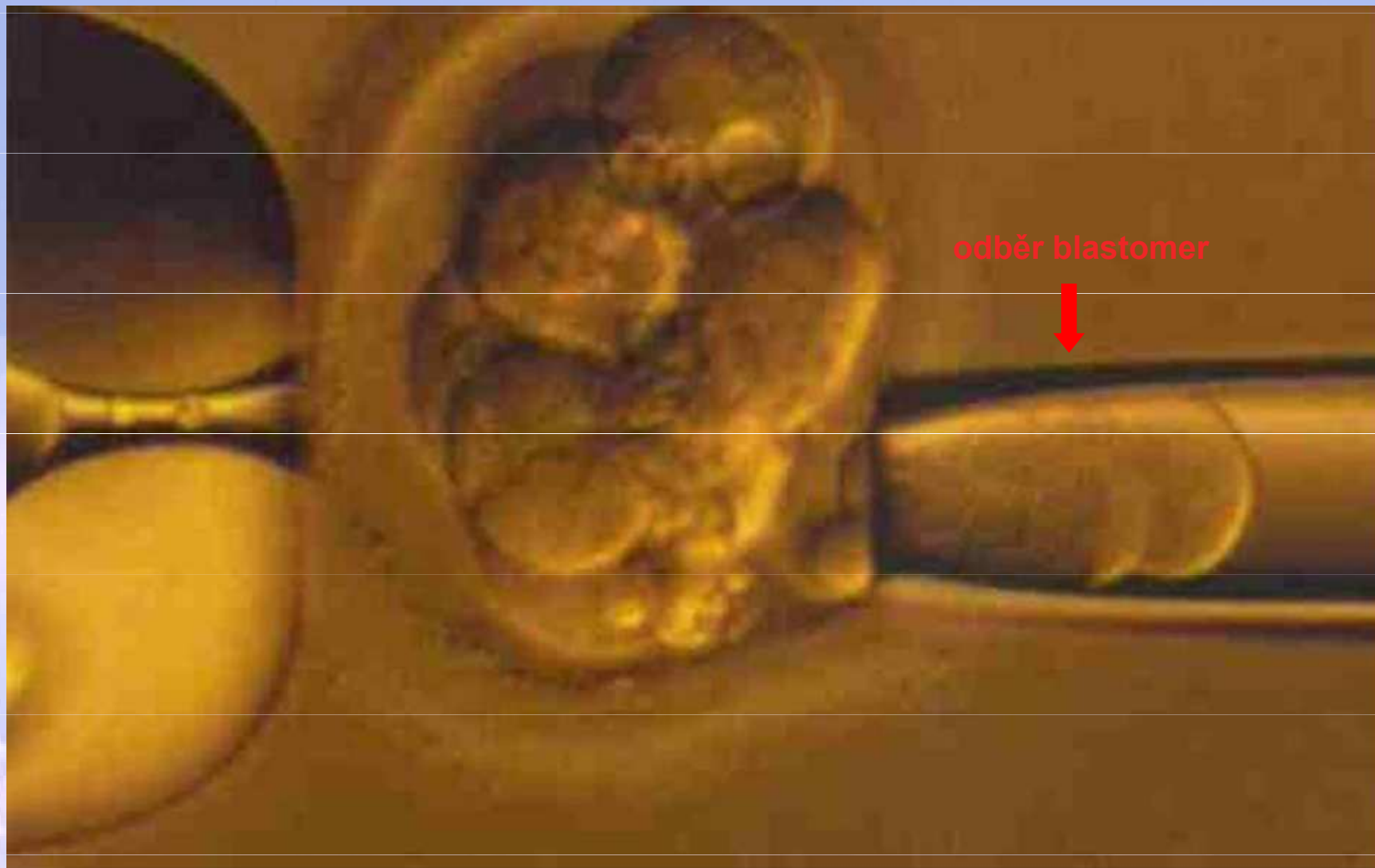
# PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA (PGD)



# PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA (PGD)



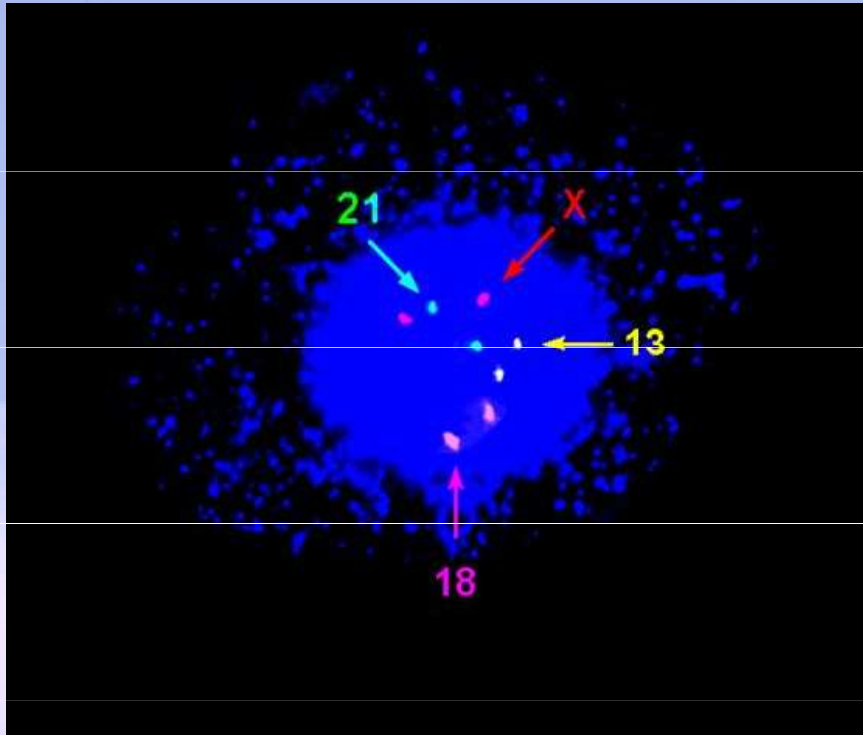
# PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA (PGD)



# PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA (PGD)



# PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA (PGD)



- aplikace FISH sond – detekce aneuploidií chromozomů
- možná cílená detekce dalších genetických onemocnění metodami molekulární cytogenetiky nebo molekulární genetiky

## Omezení a rizika metody

- limitovaný počet buněk dostupných genetické analýze
- možné riziko narušení vývoje vyšetřovaného embrya
- není vyloučená jiná genetická vada
- doplnění PGD amniocentézou



# Doporučená literatura

- Klinická genetika, Thompson 2001
- Základy klinické genetiky, Sršeň, Sršňová 1995, 2005
- Základy lékařské genetiky, Pritchard, Korf 2003

kontakt konzultace: [mhanakova@fnbrno.cz](mailto:mhanakova@fnbrno.cz)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



**Děkuji za pozornost**

