

Základy klinické cytogenetiky – chromozomy

Hanáková M.



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

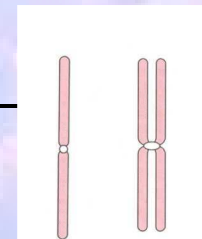
pojmy **chromatin** a **chromozomy** - týkají se téhož jaderného materiálu, odlišnost ve stupni spiralizace v závislosti na fázi buněčného cyklu

- **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 (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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



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
- 1 z chromozomů **X** v buňkách **samic savců** je tvořen euchromatinem, 2. heterochromatinem. Na počátku vývoje jedince byly oba euchromatinové, v rané fázi embryogeneze došlo k inaktivaci jednoho chromozomu.



CHROMATIN A CHROMOZOMY BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU

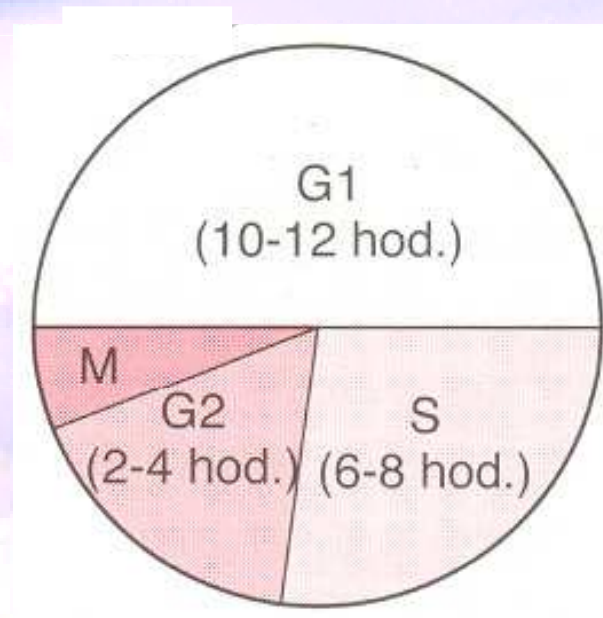
buněčný cyklus **somatických** buněk
(interfáze + mitóza)

- **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

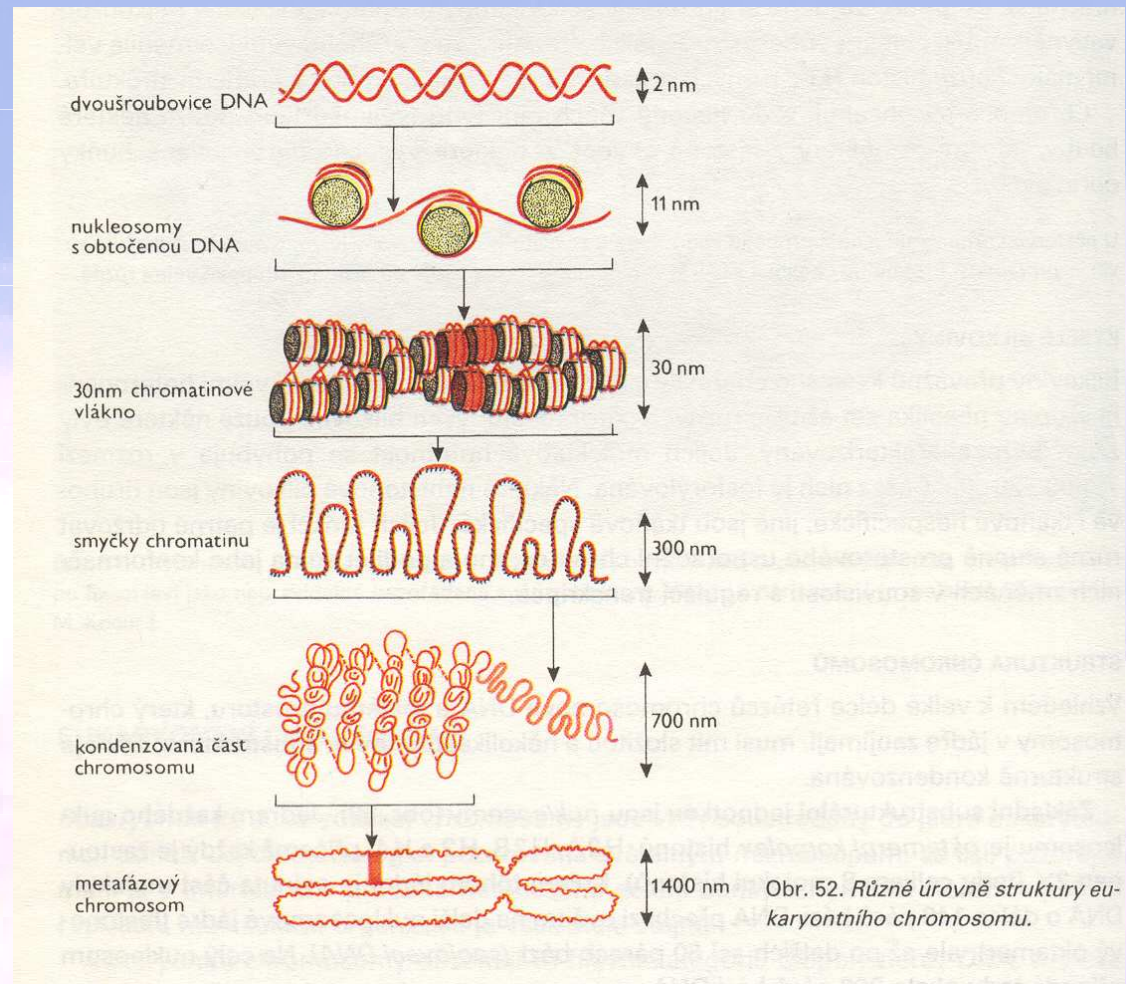


CHROMATIN A CHROMOZOMY

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)

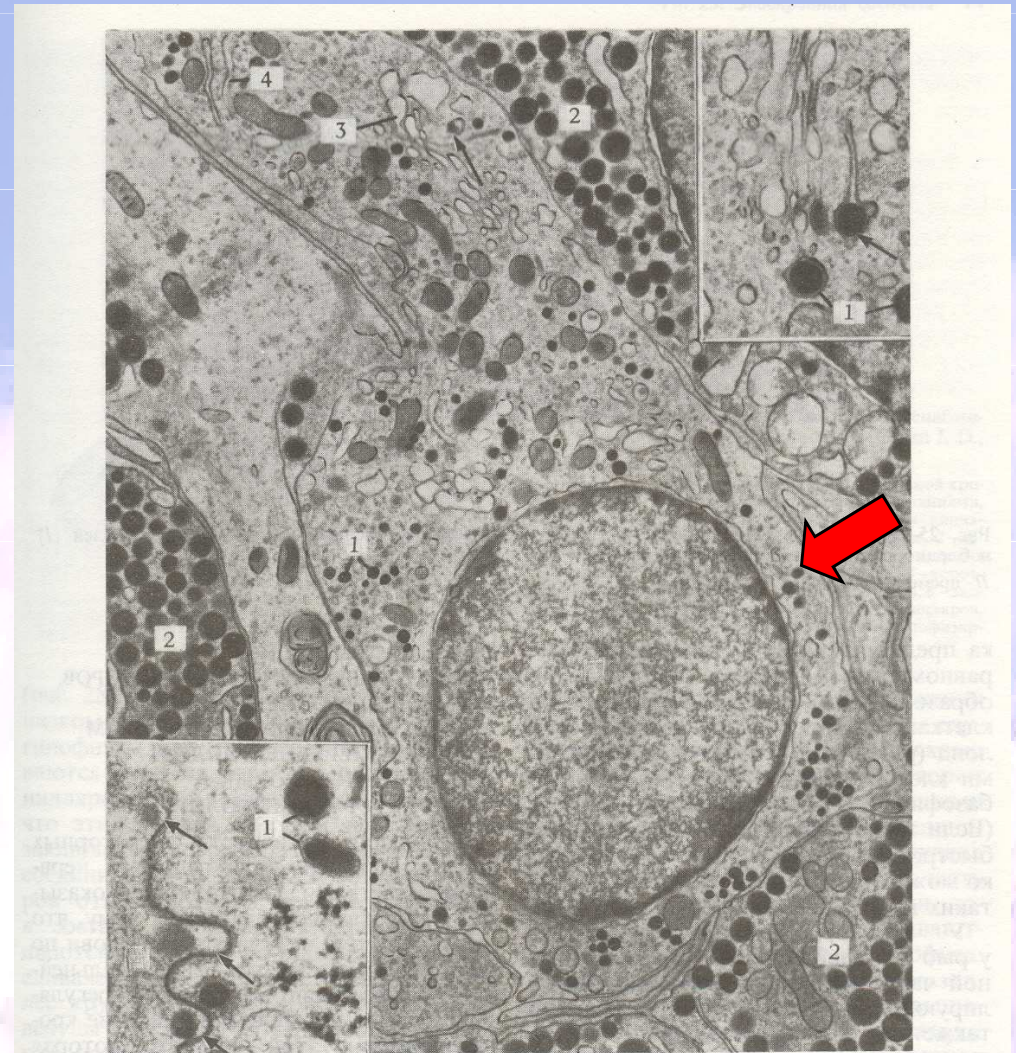
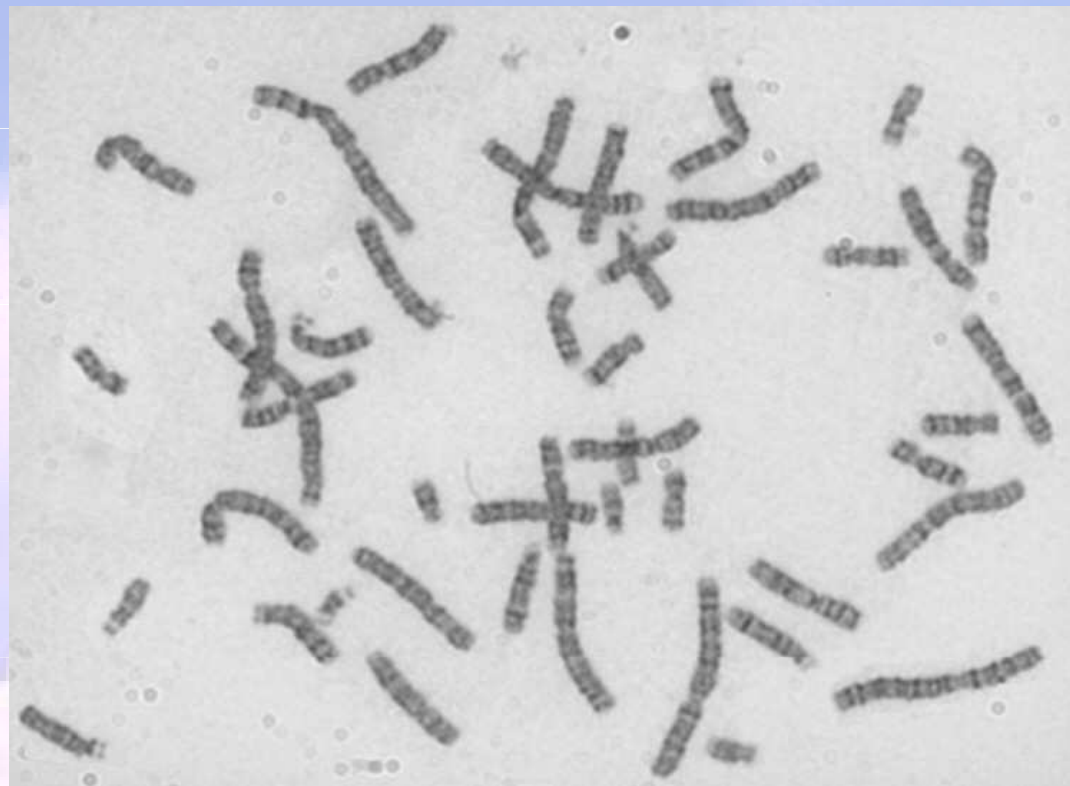


Рис. 25-11. Электронная микрофотография тиреотропной клетки из передней доли гипофиза крысы; × 6400 (Farquhar M. G., 1971).

CHROMATIN A CHROMOZOMY BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU- metafáze mitózy

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



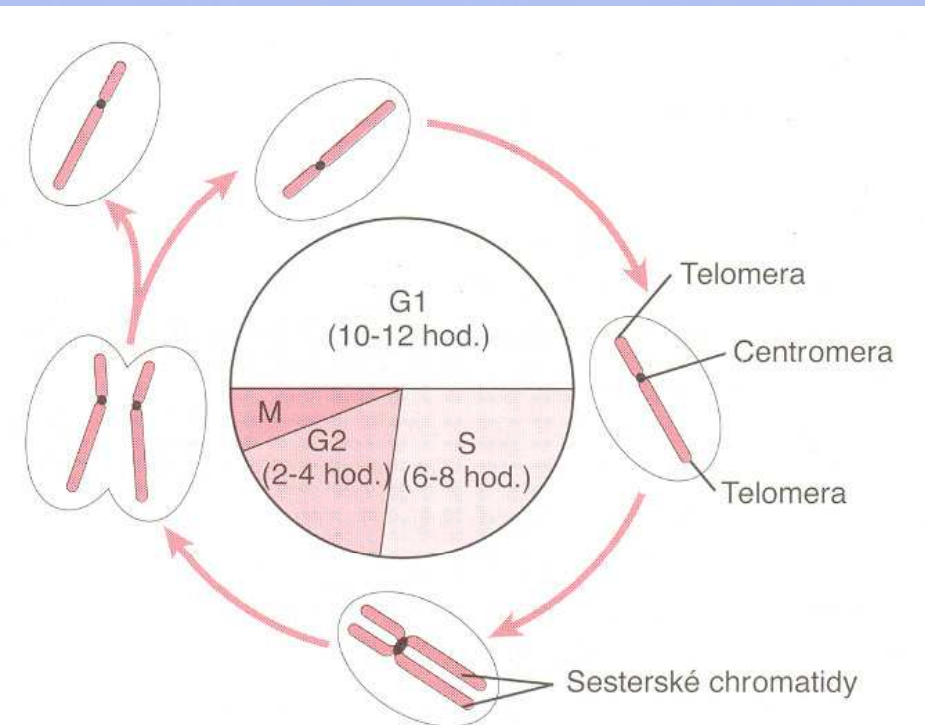
zvětšení 1250x

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

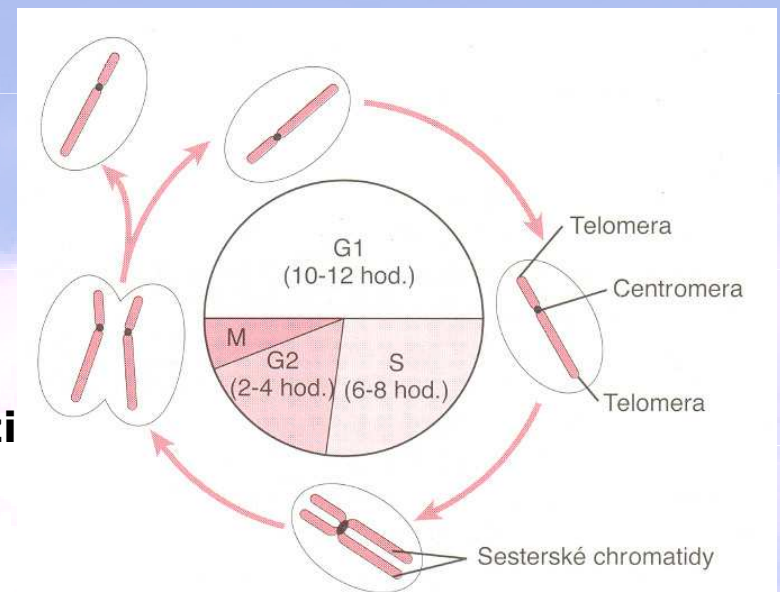
M fáze = MITÓZA

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

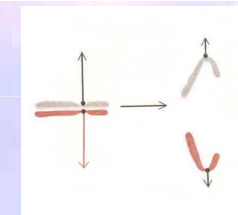
oddělení sesterských chromatid v centromere v **anafázi** (chromozomů je dvojnásobný počet a jsou tvořeny **jednou chromatidou**) – podélné dělení centromery

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

CHROMATIN A CHROMOZOMY BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU fáze mitózy

- profáze – počátek kondenzace chromozomů, tvorba dělicího vřeténka
- prometafáze – pokračuje kondenzace, začátek pohybu chromozomů do ekvatoriální roviny
- metafáze – chromozomy maximálně kondenzované, seřazeny v ekvatoriální rovině buňky
- anafáze – oddělení chromozomů v centromere, sesterské chromatidy putují k protilehlým pólům buňky
- telofáze – počátek dekonenzace chromozomů, tvorba jaderného obalu kolem dceřinných jader
- cytokineze – rozdělení cytoplazmy původně mateřské buňky

chromatin



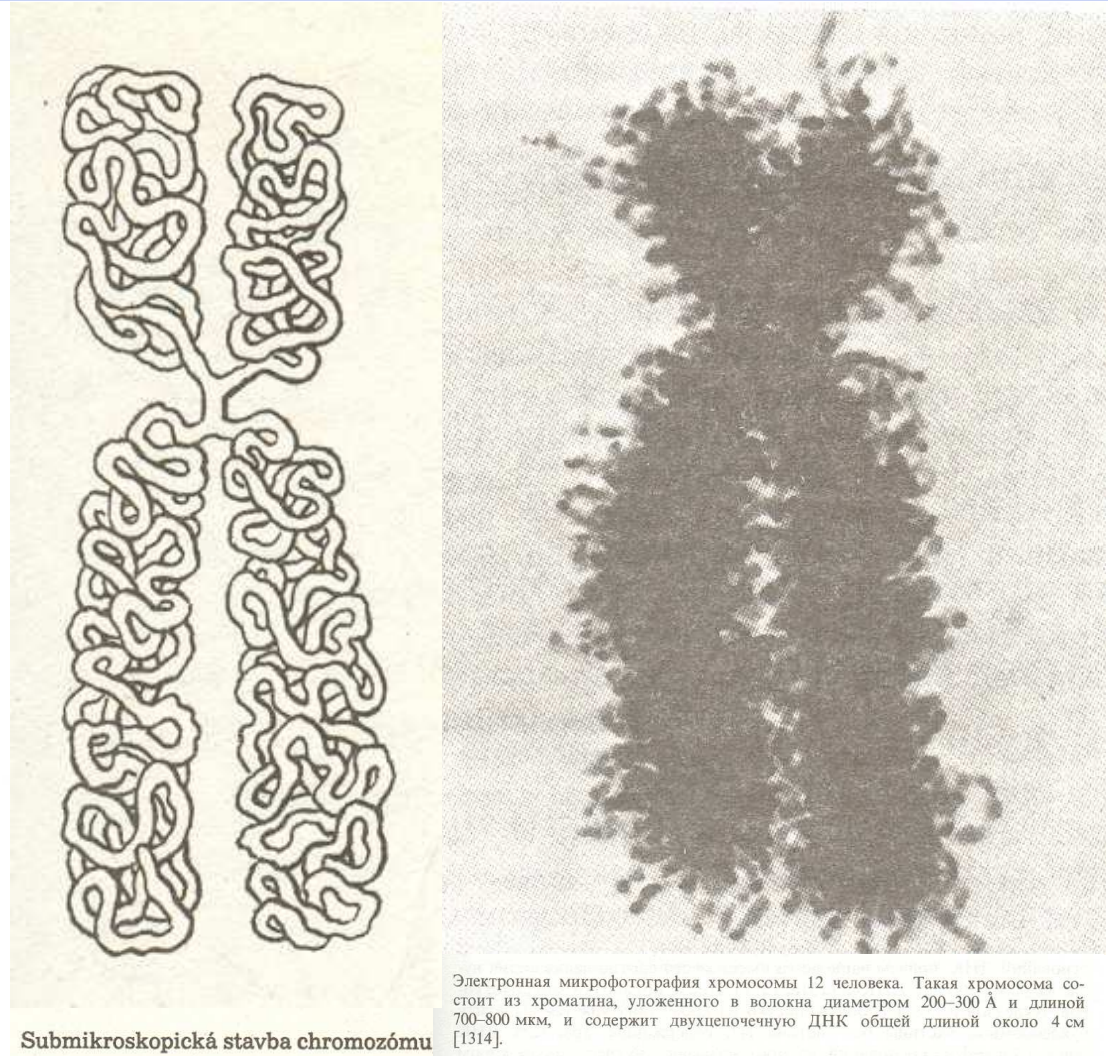
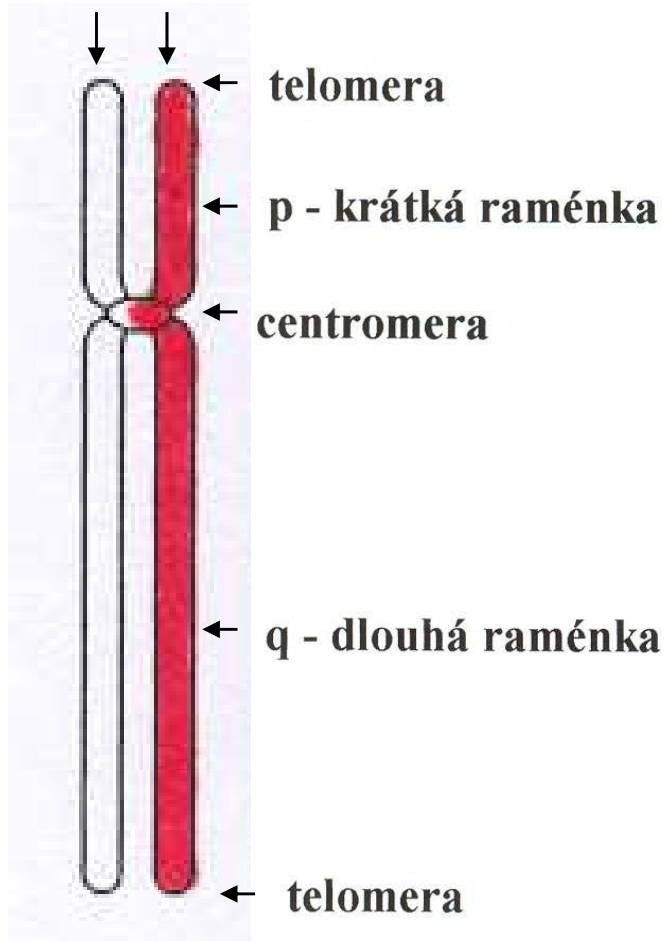
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



CHROMOZOM

tyčinková organela

sesterské chromatidy
(identické kopie)



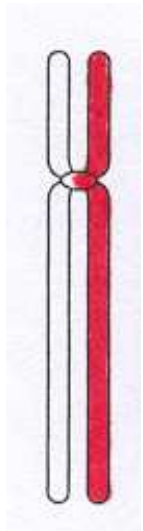
CHROMOZOM

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

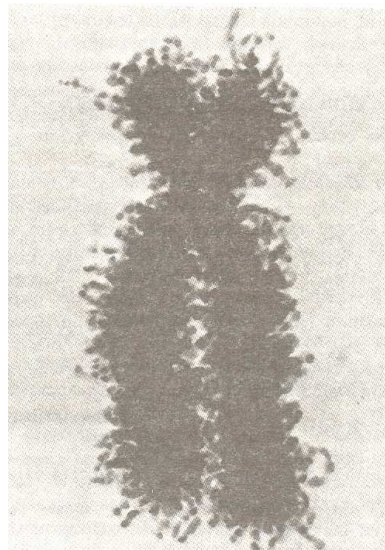


CHROMOZOMY V PRAXI

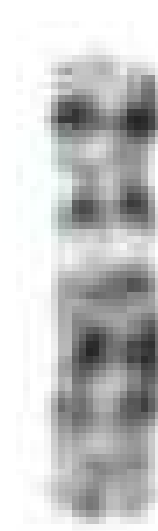
schema chromozomu



chromozom
z elektronového mikroskopu



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 **aberací** (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)



ZÁPIS KARYOTYPU

46,XX - normální ženský karyotyp

46,XY - normální mužský karyotyp

počet chromozomů v jádrech buněk jedince
druh pohlavních chromozomů

Příklady patologických karyotypů:

47,XX,+18 → nadbytečný autozom v jádrech buněk (početní změna)

45,X 47,XXY → chybějící nebo nadbytečný gonozom v karyotypu (početní změna)

46,XX,t(8;21)(p11.2;q22.3) → translokace v karyotypu (strukturní změna), ve druhé závorce zápis bodů zlomů na chromozomových raménkách podle cytogenetické nomenklatury

45,X[12] / 46,XX[188] → mozaika gonozomů – více (minimálně dvě) buněčné linie v karyotypu

Varianty satelitů a heterochromatinu v karyotypu:

46,XX,22ps+ 46,X,Yqh+ → nejedná se o patologii, ale mohou být přítomny i v buňkách s patologickým nálezem



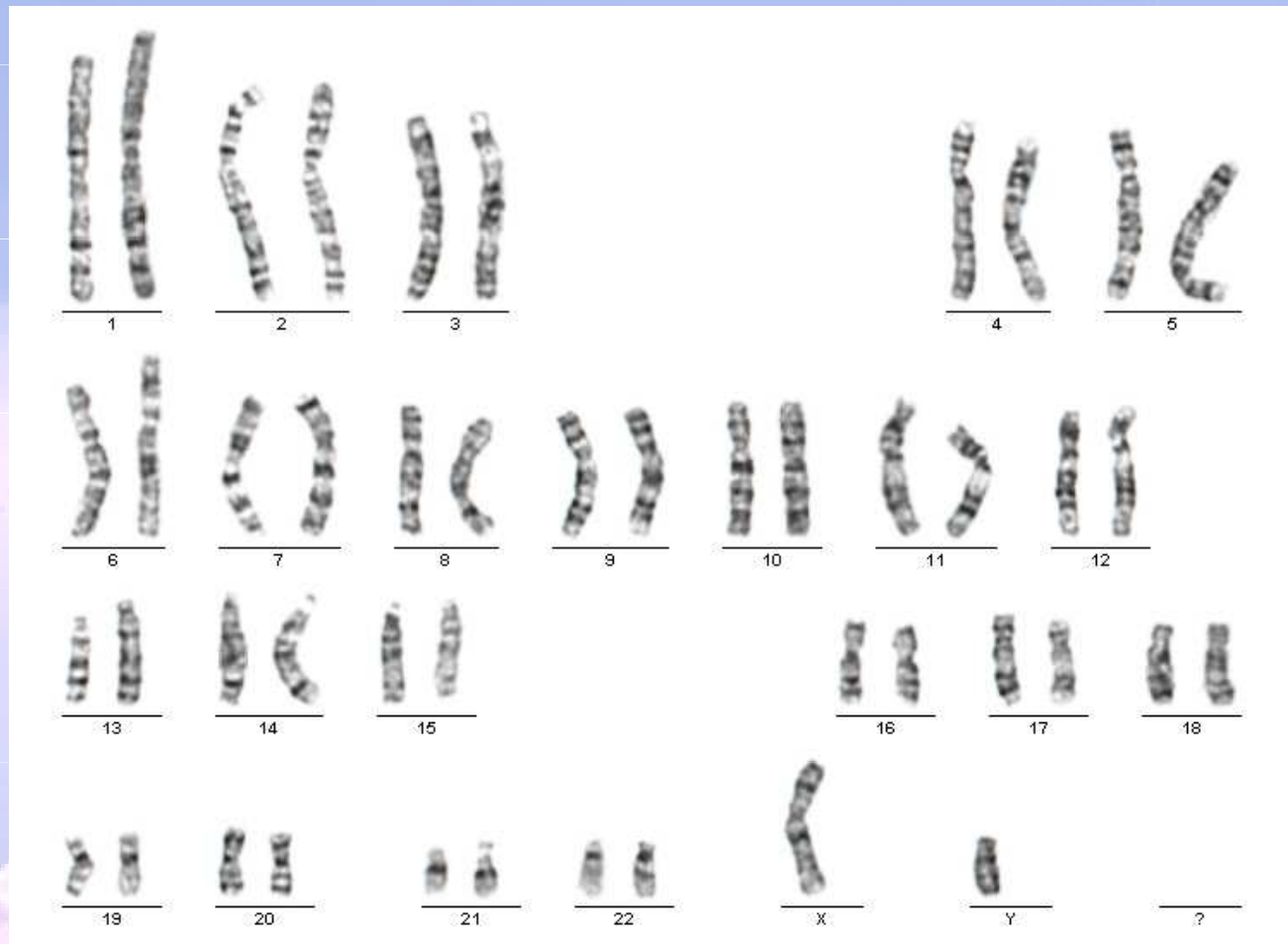
Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



CHROMOZOMY V PRAXI

normální mužský karyotyp

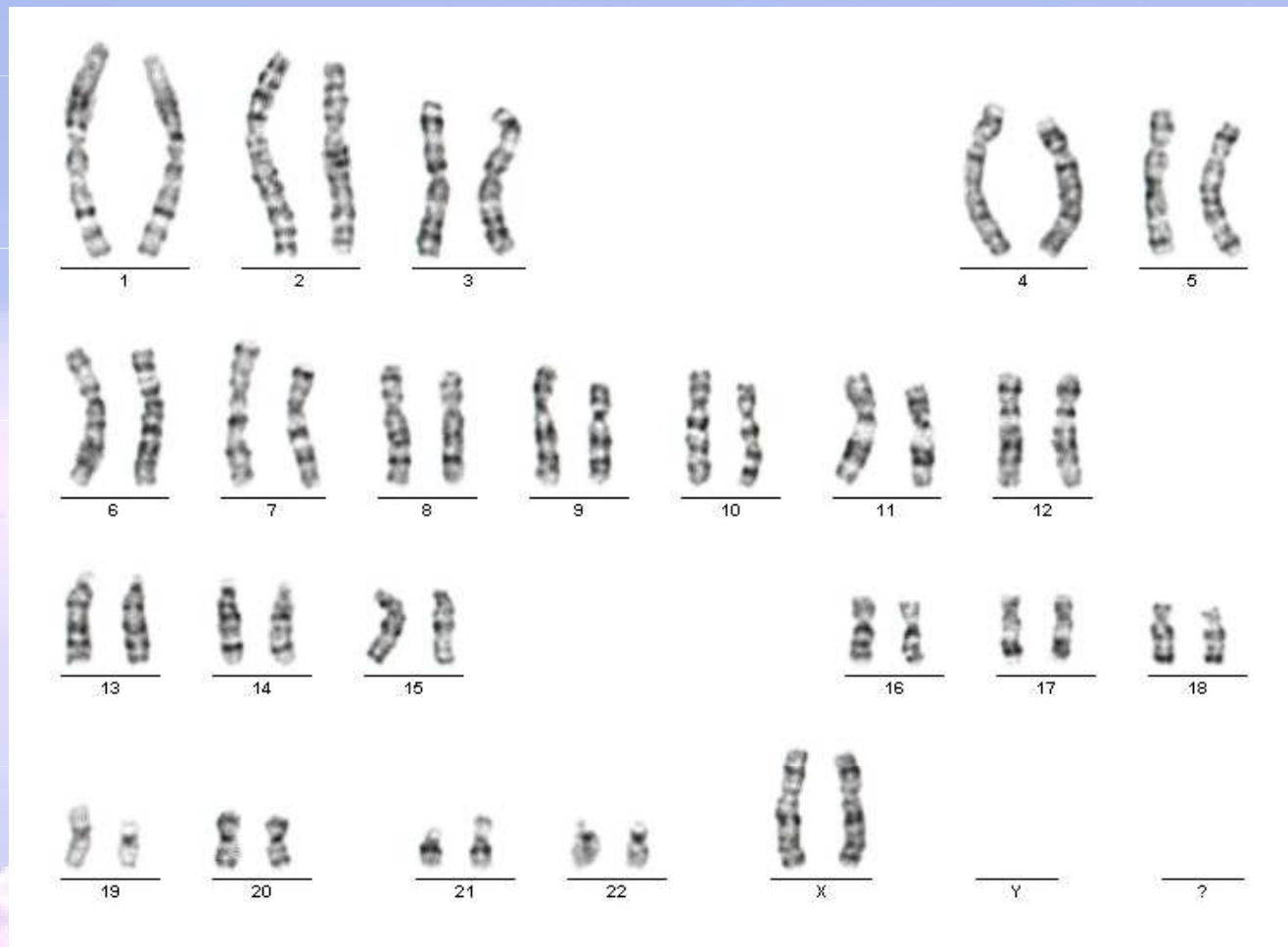
46,XY



CHROMOZOMY V PRAXI

normální ženský karyotyp

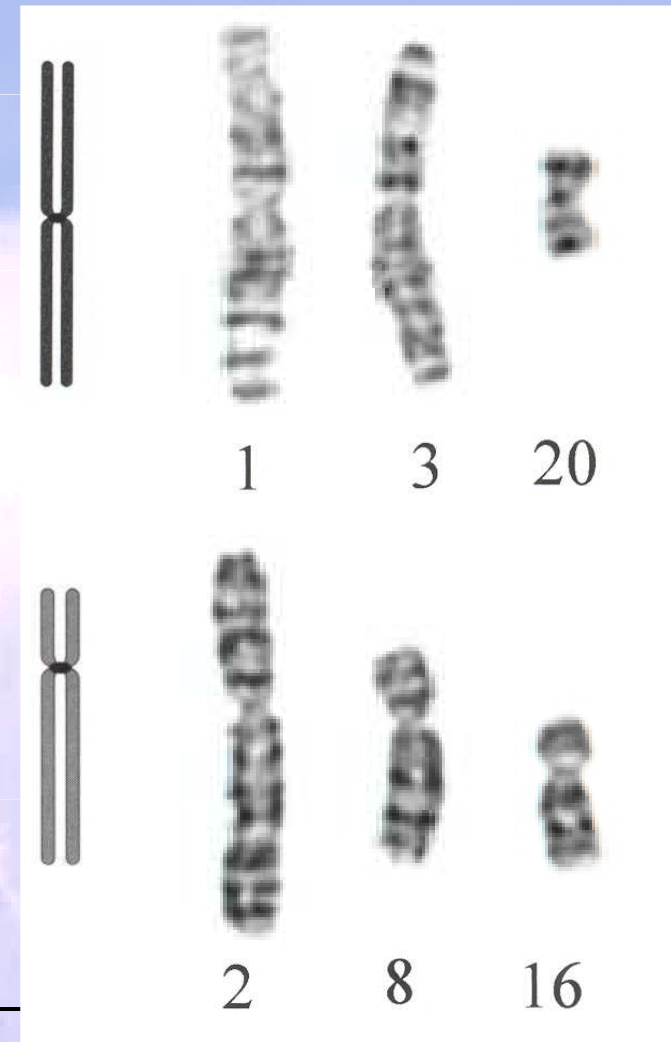
46,XX



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);

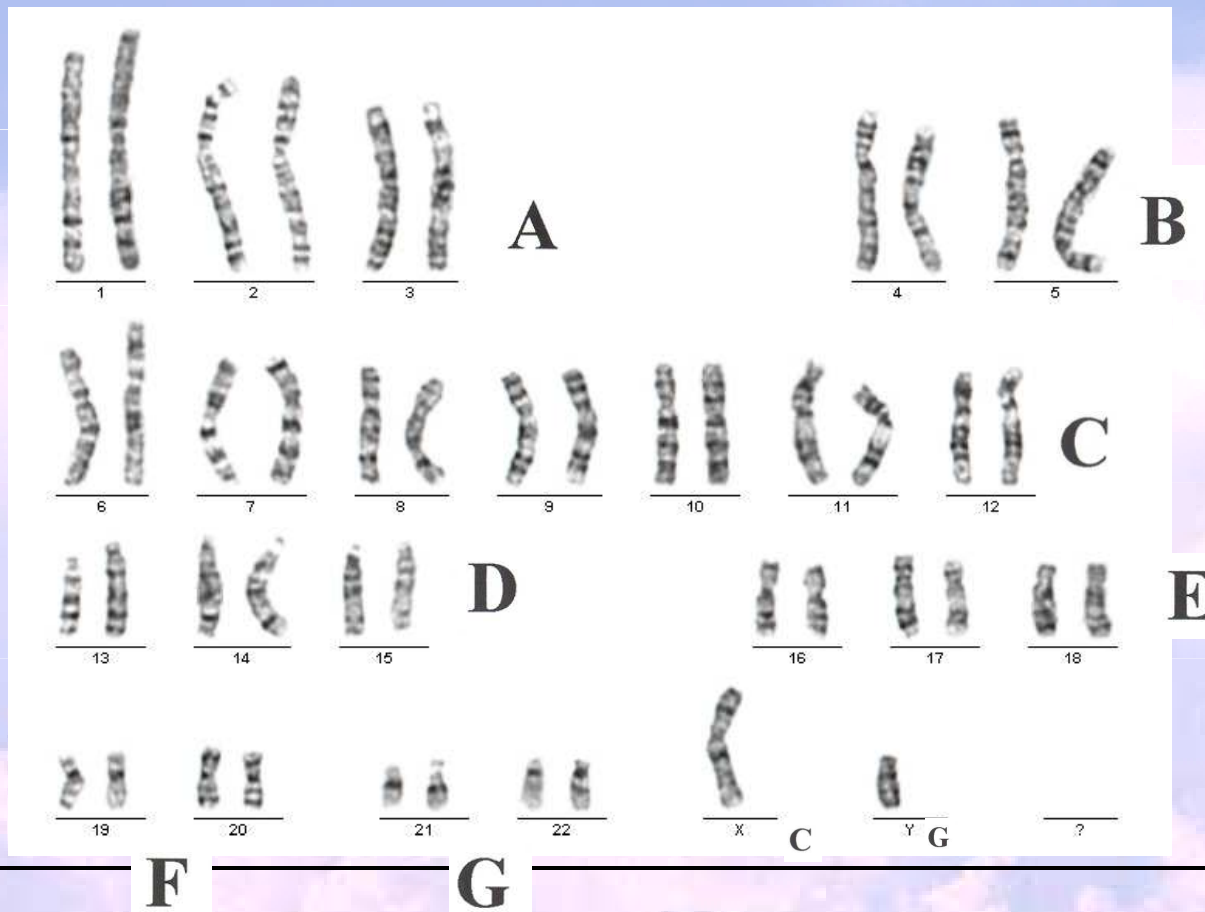
místo odškrcení = sekundární konstriktce (tenké stopky);

(sekundární konstriktce obsahuje kopie genů kódujících rRNA = organizátor jadérka)



CHROMOZOMY V PRAXI

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



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

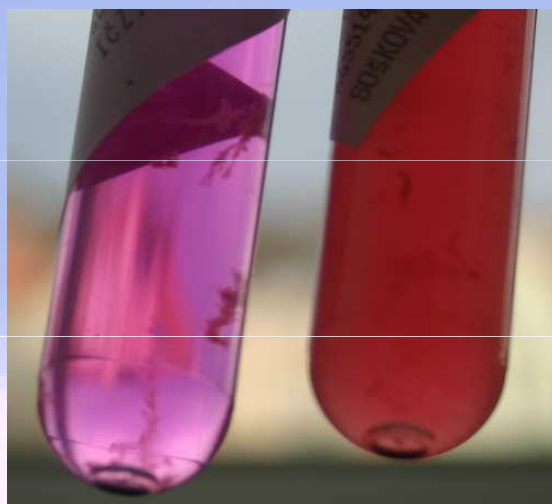


CHROMOZOMY V PRAXI

odběr materiálu



odebraná
periferní
krev



odebrané choriové klky



odběr plodové vody

CHROMOZOMY V PRAXI

kultivace materiálu

- **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 dřeň – 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

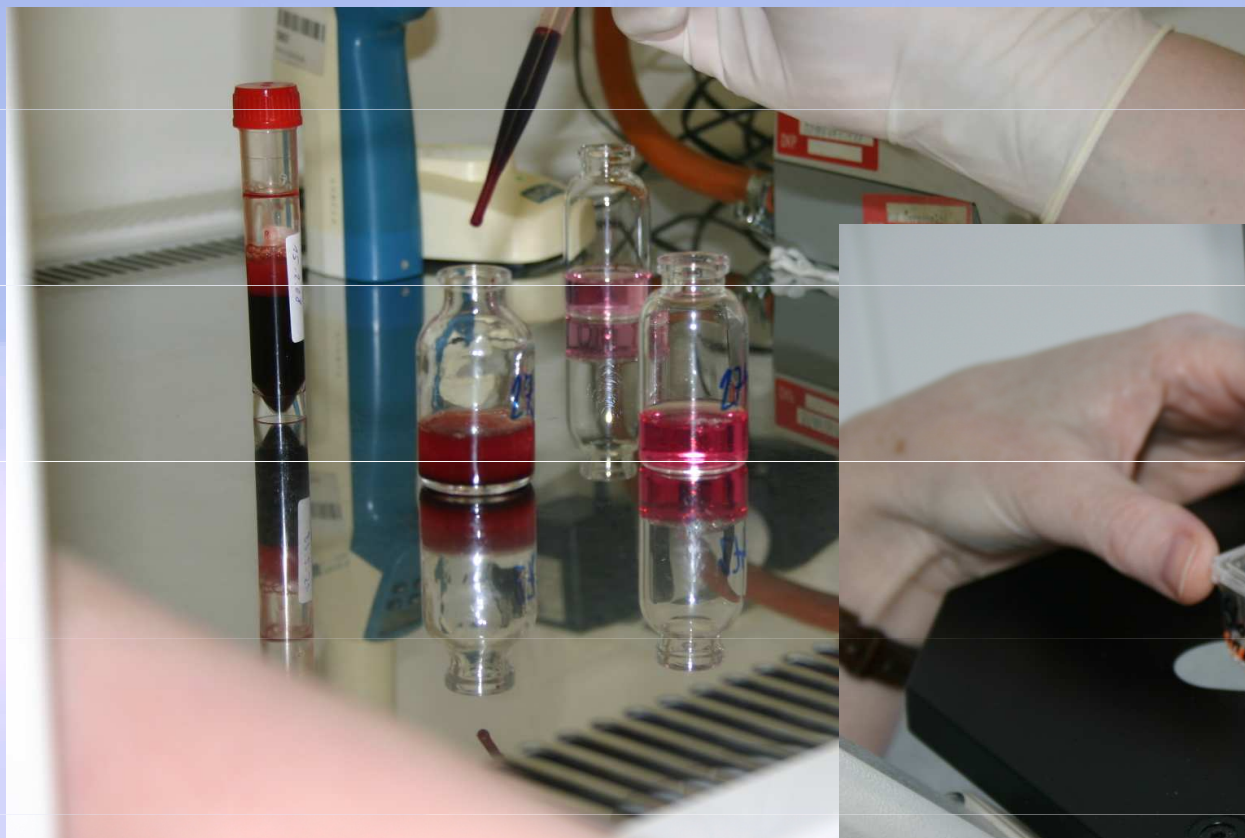
kultivace materiálu

- kultivace buněk **v suspenzi** (periferní krev, fetální krev, choriové klky, kostní dřeň)
- kultivace buněk **přichycených na dně** kultivační nádobky (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

kultivace T-lymfocytů z periferní krve

- **kultivace periferní krve v médiu s phytohemaglutininem (PHA) = výtažek z fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*)**
 - T-lymfocyty = zralé diferencované buňky s malou spontánní mitotickou aktivitou
 - vlivem PHA se dediferencují (přeměna na nezralé buňky lymfoblasty, které se dělí (tzn. vstupují do mitózy!))
(např. k nezralým buňkám – blastům z kostní dřeně onkologických pacientů není třeba PHA přidávat, dělí se samovolně)
 - význam kultivace – pomnožení T-lymfocytů



CHROMOZOMY V PRAXI

zpracování suspenze T-lymfocytů

- **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**
 - KCl
 - lýza erytrocytů



CHROMOZOMY V PRAXI

zpracování suspenze buněk

- **fixace** – získání suspenze buněk
 - kyselina octová + metanol
 - náhlé a trvalé zastavení veškerých životních pochodů buňky, odvodnění rozpuštění cytoplazmy, projasnění jader
- **vykapání suspenze buněk** na podložní sklíčko (krycí sklíčka nepoužíváme)
- **orientační vykapání a barvení** – zjištění hustoty suspenze



vykapávání
suspenze
buněk
na sklíčka

CHROMOZOMY V PRAXI

barvení / pruhování chromozomů

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

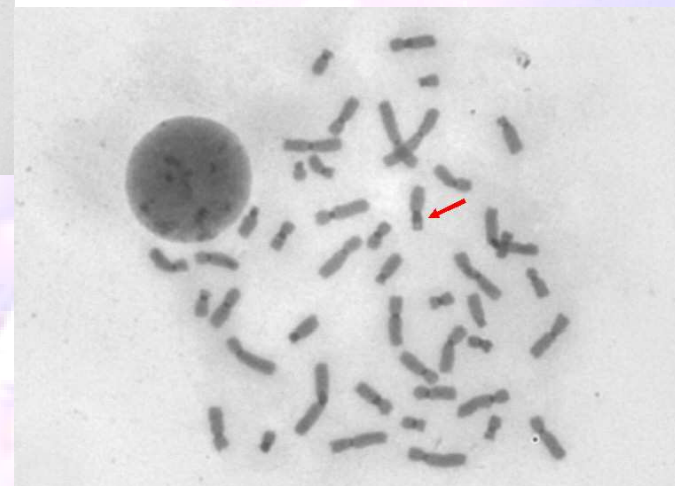


- **pruhování chromozomů (analýza karyotypu, karyotypu maligních klonů)**



chromozomy s G - pruhy

- **speciální barvení – „C“, „NOR“**
– dovyšetření nálezů
na chromozomech



„C“ barvení- nalezen heterochromatin na chromozomu

CHROMOZOMY V PRAXI

pruhování chromozomů

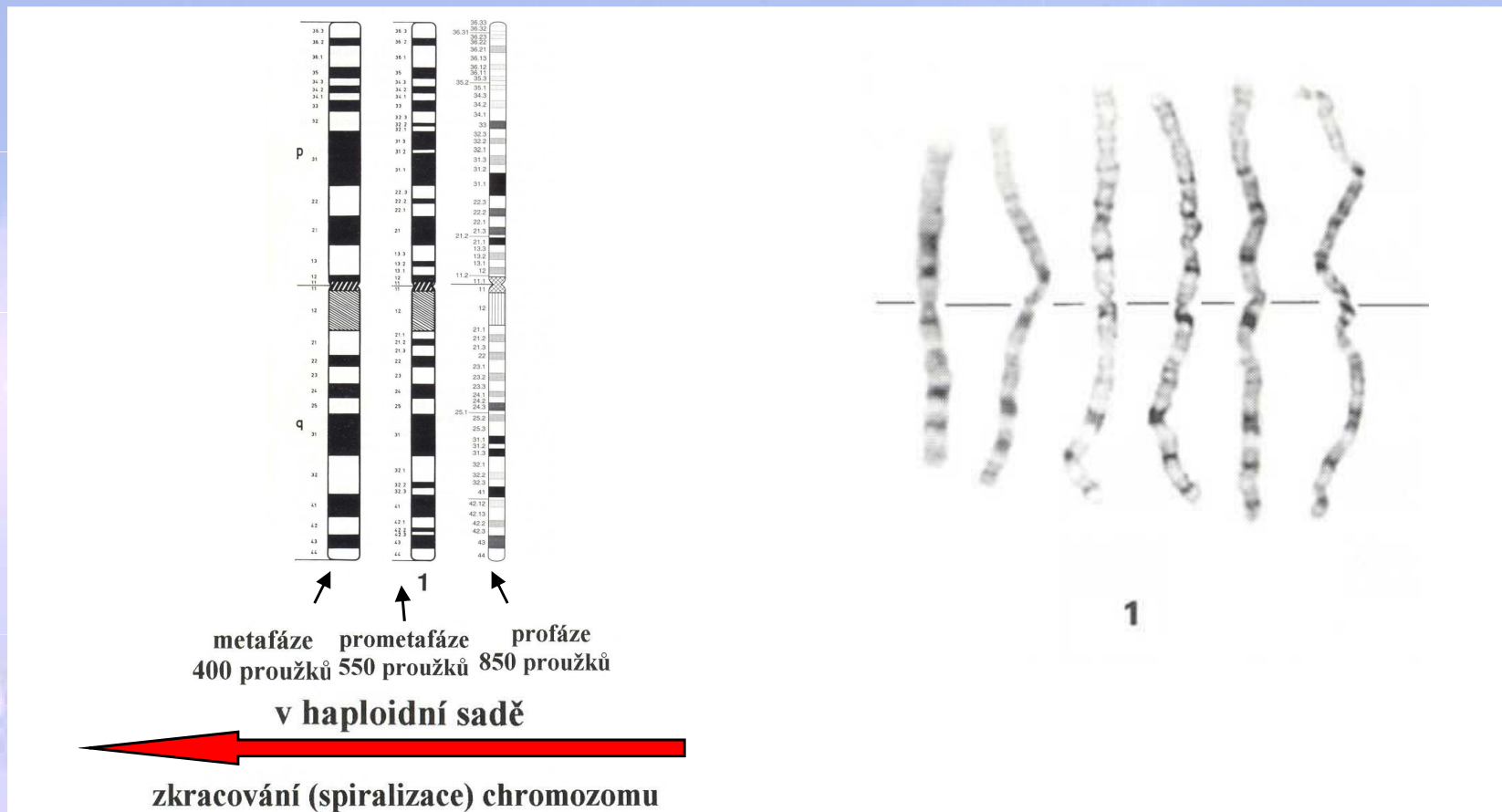
- pruhovací metody umožňují individuální diferenciaci jednotlivých chromozomů
(byly zavedeny v letech 1968 -71)
- do té doby bylo možné pouze obarvit chromozomy barvivem – orcein, karbolfuchsin, Feulgenovo barvivo a seřadit je do skupin podle velikosti a poměru krátkých a dlouhých ramének



CHROMOZOMY V PRAXI

pruhování chromozomů

G – pruhování chromozomu č. 1 – vzor a reálné chromozomy



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 (střídavé 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

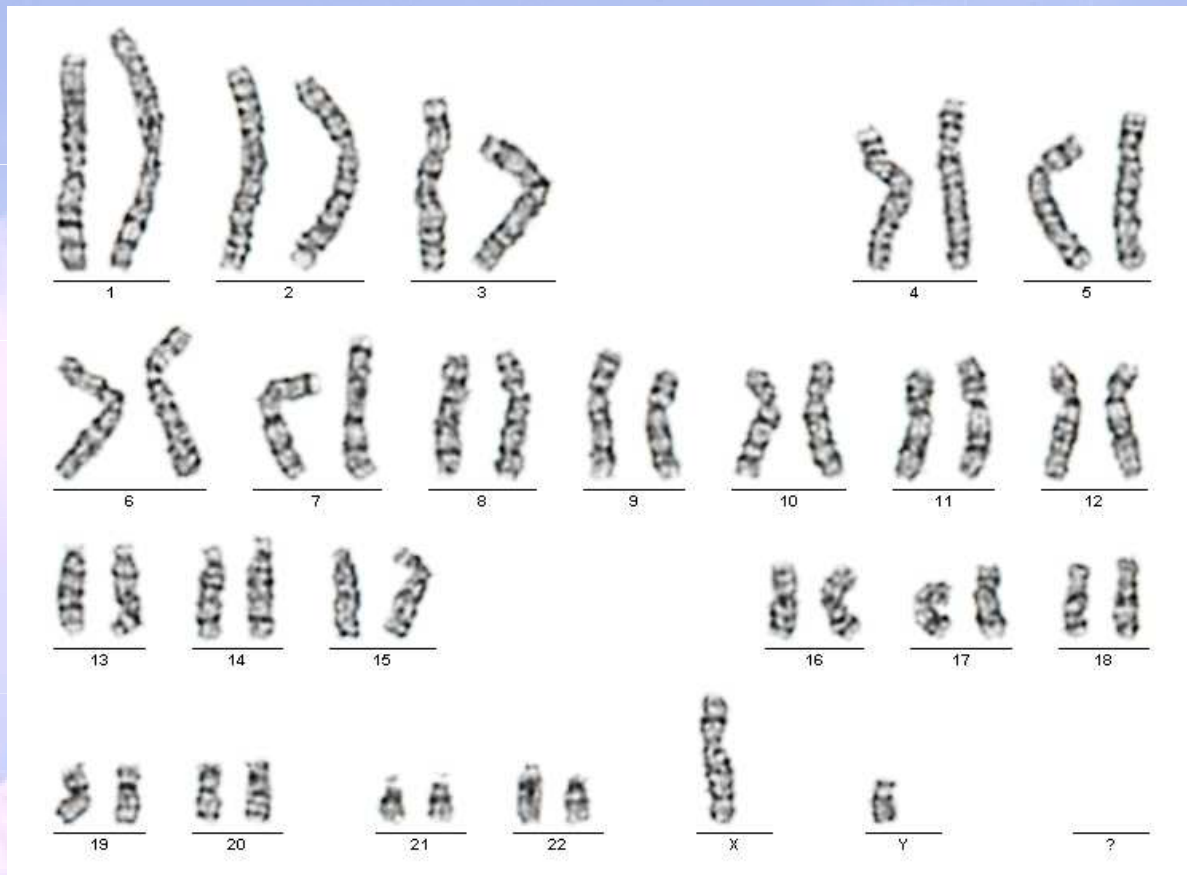


CHROMOZOMY V PRAXI

pruhování chromozomů

G – pruhování

normální mužský karyotyp 46,XY



CHROMOZOMY V PRAXI

pruhování chromozomů

Q - pruhování

- barvení akridinovými deriváty (fluoreskující látky – fluorochromy), akridin se specificky váže na oblasti bohaté na adenin (A) a thymin (T)
- Q - pruhy (světlé a tmavé), přibližně odpovídají G - pruhům
- nevýhody – je třeba speciální fluorescenční mikroskop a při delší expozici UV světlem fluorescence slábne

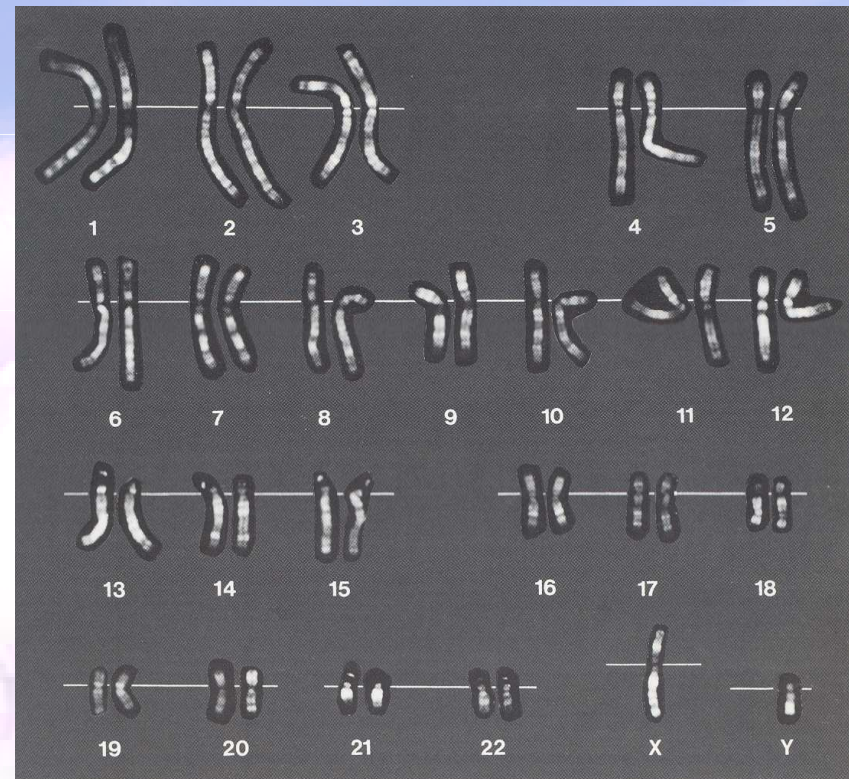


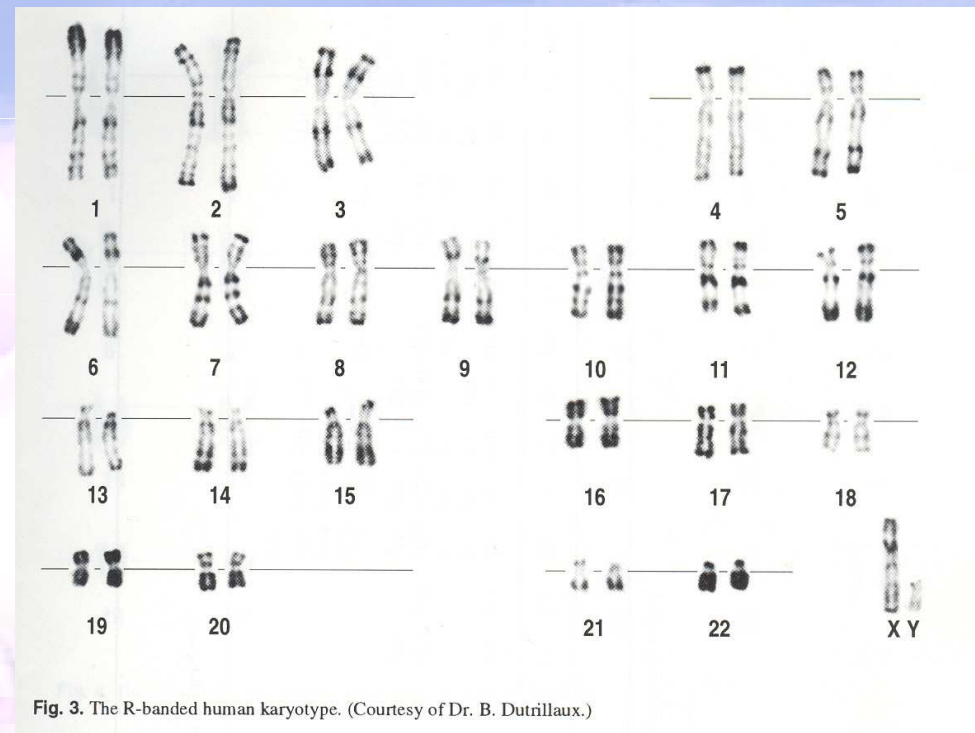
Fig. 1. The Q-banded human karyotype. (Courtesy of Dr. E. Magenis.)

CHROMOZOMY V PRAXI

pruhování chromozomů

R – pruhování

- vystavení chromozomů působení specifických vlivů před obarvením (zahřátí)
- R = reverse (opačný), tzn. R – pruhy jsou opačné ke G - a Q – pruhům (kde jsou G - a Q – pruhy světlé, tam jsou R – pruhy tmavé a opačně)



CHROMOZOMY V PRAXI

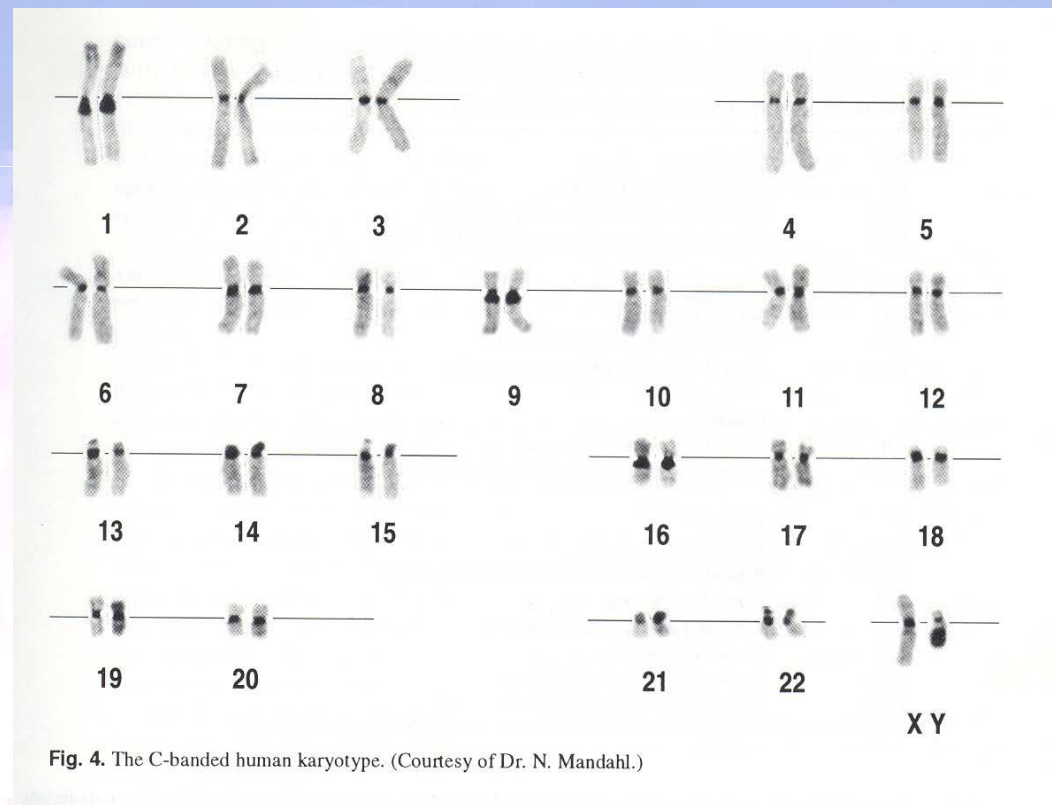
pruhování chromozomů

C - barvení

vizualizace konstitutivního heterochromatinu

(konstitutivní heterochromatin v oblasti centromer a na dlouhých raméncích některých chromozomů – 1q, 9q, 16q, Yq)

- metoda založena na denaturaci DNA působením různých agens (HCl, Ba(OH)₂) a následné reasociaci v teplém pufru

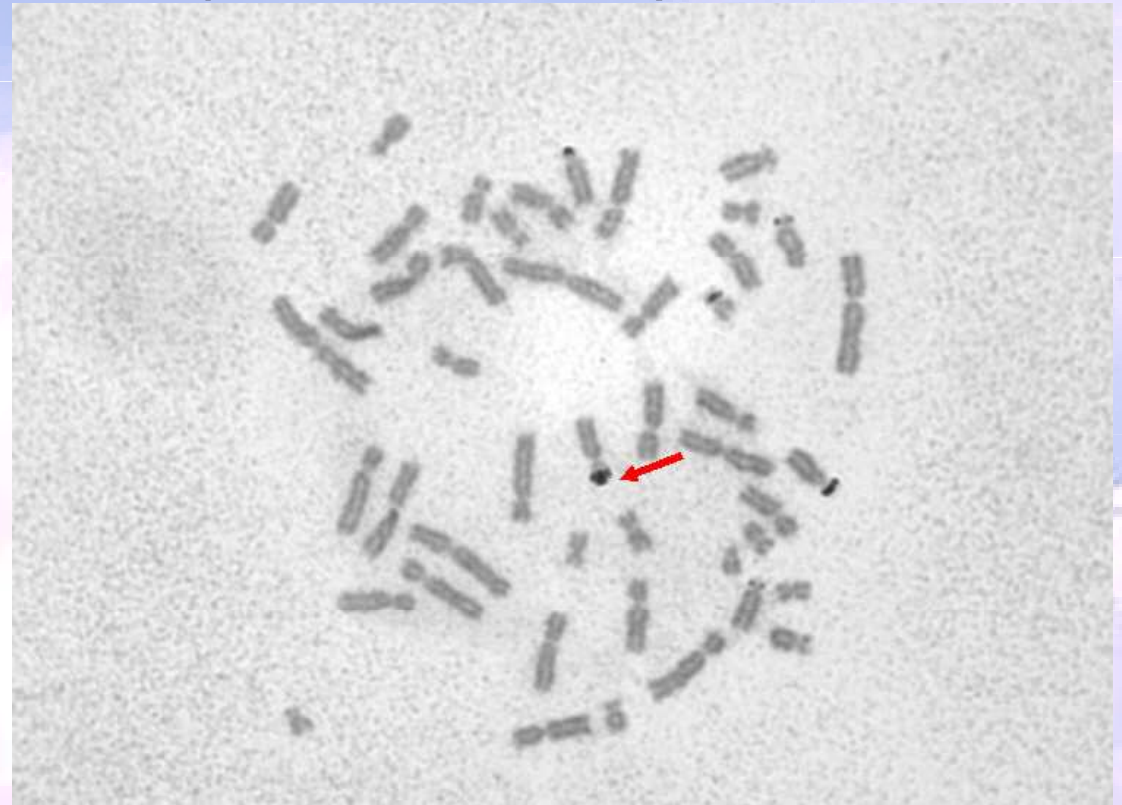


CHROMOZOMY V PRAXI

pruhování chromozomů

NOR - barvení

- **navázání zrn stříbra na aktivní oblast organizátoru jadérka** (sekundární konstrikce akrocentrických chromozomů)
- **stříbro se vyloučí z AgNO_3 za vyšší teploty a v kyselém prostředí**
- zjišťujeme, jestli jsou satelity schopny aktivity (jestli na nich není navázán euchromatin, který by aktivitě bránil a mohl by být nebalancovaným materiálem v karyotypu)
- každý akrocentr nemusí být aktivní ve všech buňkách



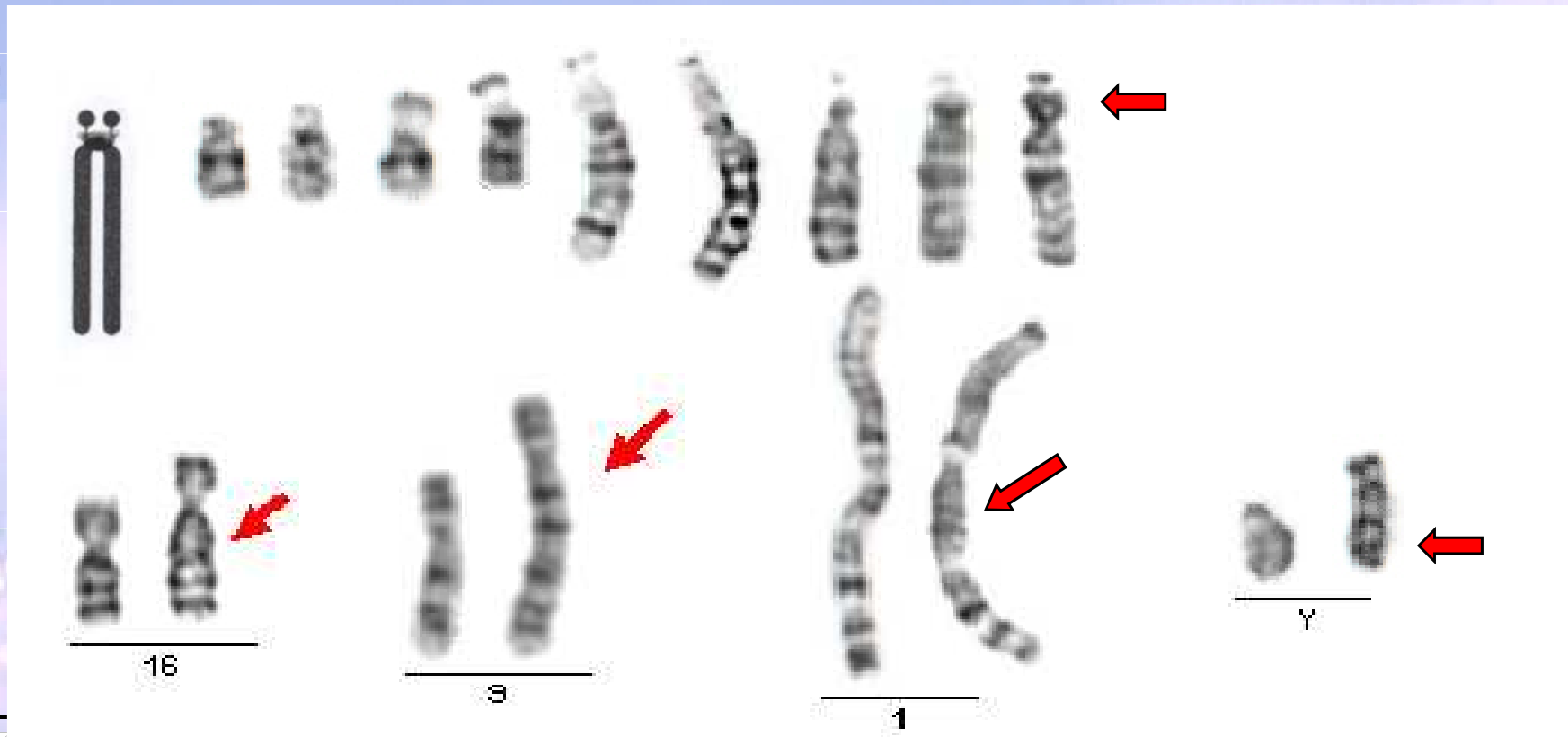
CHROMOZOMY V PRAXI

varianty chromozomů

heteromorfizmy

(G – pruhování)

varianty heterochromatinu a satelitů



CHROMOZOMY V PRAXI

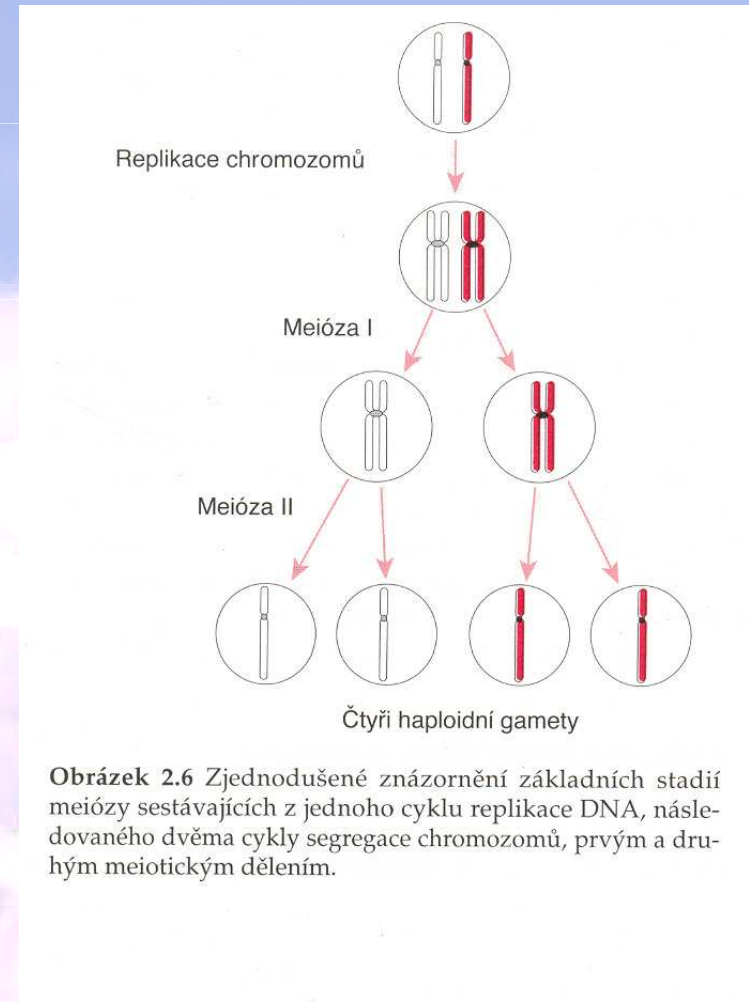
hodnocení

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

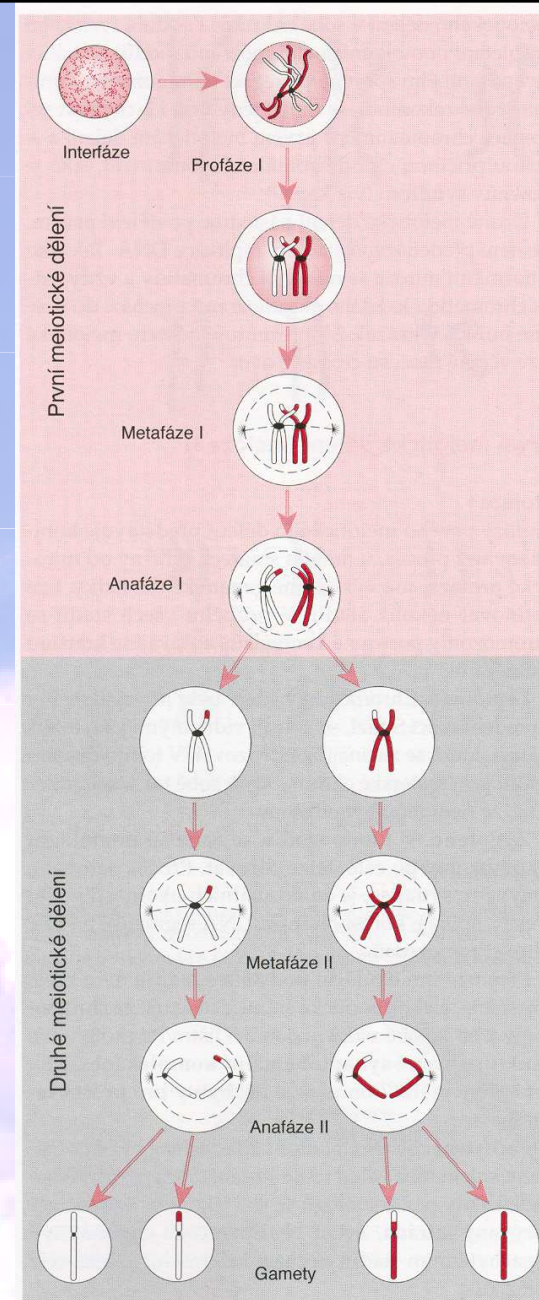


MEIÓZA

- 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, **prvnímu předchází fáze replikace DNA, druhému nikoli**



MEIÓZA



Obrázek 2.7 Schematické znázornění meiotického dělení a jeho důsledků. Je ukázán jeden chromozomální pár a jeden crossing-over vedoucí k produkci čtyř odlišných gamet.

Meióza I

- **počet chromozomů je redukován z diploidního na haploidní**
- v průběhu meiózy I se odehrává rekombinace genetického materiálu – **meiotický crossing-over** (v profázi), v průběhu kterého dochází k výměně homologních segmentů DNA mezi nesesterskými chromatidami v párech homologních chromozomů (mezi chromatidami maternálního a paternálního původu)
- význam crossing-overu – výsledné gamety nejsou ani v jednom případě identické
- v meióze I se každý chromozom skládá ze 2 chromatid (chromozomový pár ze 4 chromatid), **rozcházejí se homologní chromozomy**, nikoli sesterské chromatidy
- po meióze I následuje dělení buňky na **2 haploidní dceřinné buňky**, které vstupují do velmi krátké meiotické interfáze, v níž chybí S-fáze (syntetická fáze) – **nereplikuje se DNA**



Meióza II

- podobnost s mitózou – podélné dělení centromery, **rozchod sesterských chromatid**
- odlišnost od mitózy – počet chromozomů vstupujících do meiózy II je **haploidní**
- **konečný výsledek – 4 haploidní buňky**, každá obsahuje 23 chromozomů, které jsou tvořeny jednou chromatidou
- v důsledku crossing-overu, který proběhl v 1. meiotickém dělení, nejsou chromozomy výsledných gamet identické

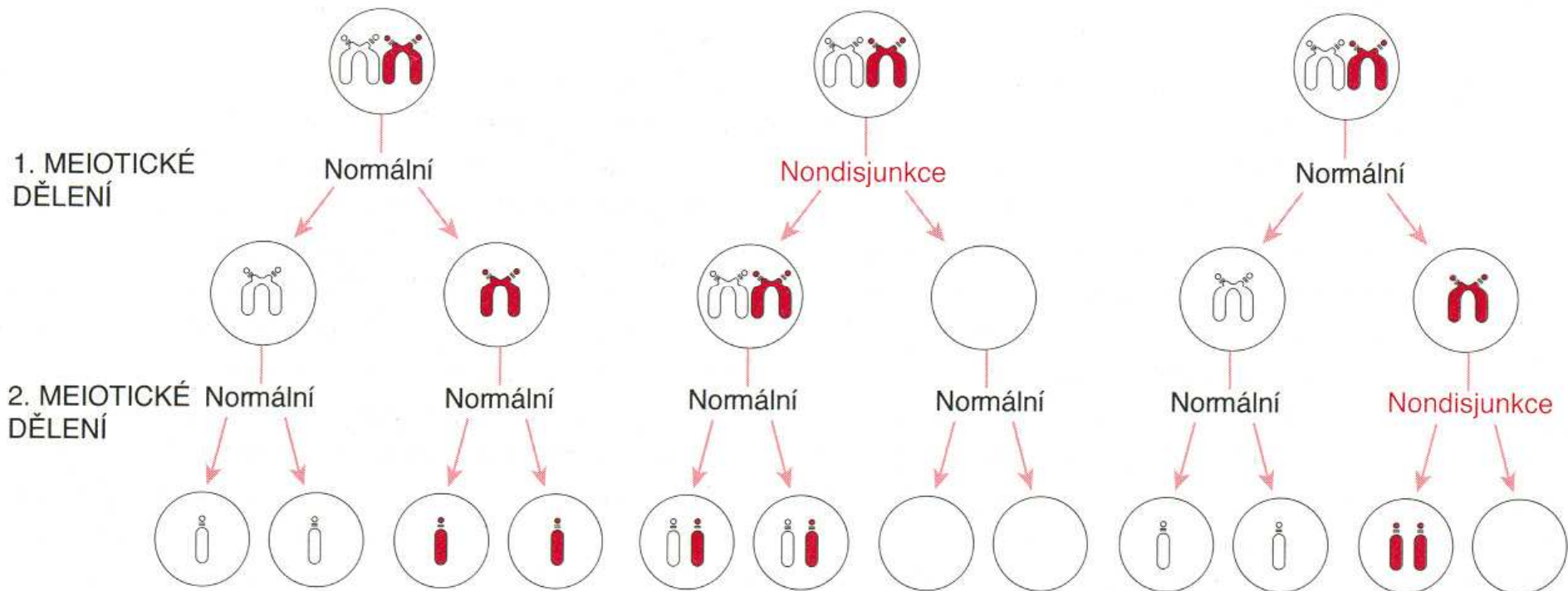


PORUCHY V MEIÓZE

- **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**
- důsledky nondisjunkce během 1. a 2. meiotického dělení jsou odlišné
 - meióza I – gameta obsahuje pár chromozomů, z nichž 1 je maternálního a 2. paternálního původu
 - meióza II - gameta s nadbytečným chromozomem obsahuje obě kopie buď pouze paternálního nebo pouze maternálního původu (platí pro centromery, protože v meióze I dochází k rekombinaci mezi paternálními a maternálními chromatidami, paternální a maternální úseky jsou na homologních chromozomech povyměňované)



PORUCHY V MEIÓZE



Obrázek 9.7 Odlišné důsledky nondisjunkce v prvním (uprostřed) a druhém meiotickém dělení (vpravo) ve srovnání s normálním rozchodem chromozomů (vlevo). Jestliže k poruše dojde v prvním meiotickém dělení, gamety buď obsahují oba chromozomy 21 nebo v nich chromozom 21 zcela chybí. Pokud se nondisjunkce uskuteční až ve druhém meiotickém dělení, obsahují abnormální gamety dvě kopie chromozomu 21 (obě od jediného rodiče) anebo v nich chromozom 21 není přítomen.

CHROMOZOMOVÉ ABNORMALITY (ABERACE)

- vrozené chromozomové aberace (VCA)
(vyšetření karyotypu) – početní - **vyšetřujeme 10 nebo 30 mitóz, případně dovyšetřujeme FISH do 200 mitóz**
 - strukturní – **vyšetřujeme 10 mitóz, potvrzujeme FISH**
- prenatalní 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), **vyšetřujeme 100 mitóz**



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** – 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 47,XXY (muž)
- 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

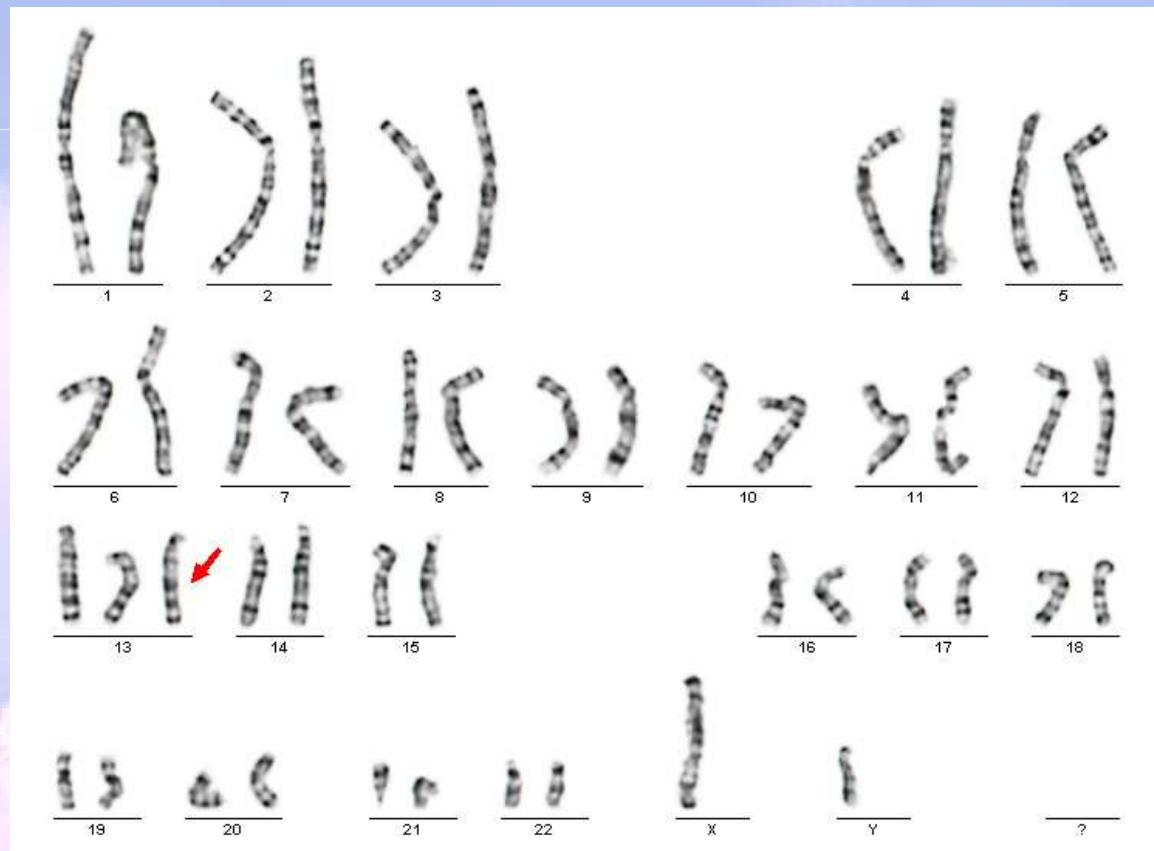
Edwardsův syndrom 47,XY,+18



VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA)

abnormality počtu autozomů
Patauův syndrom

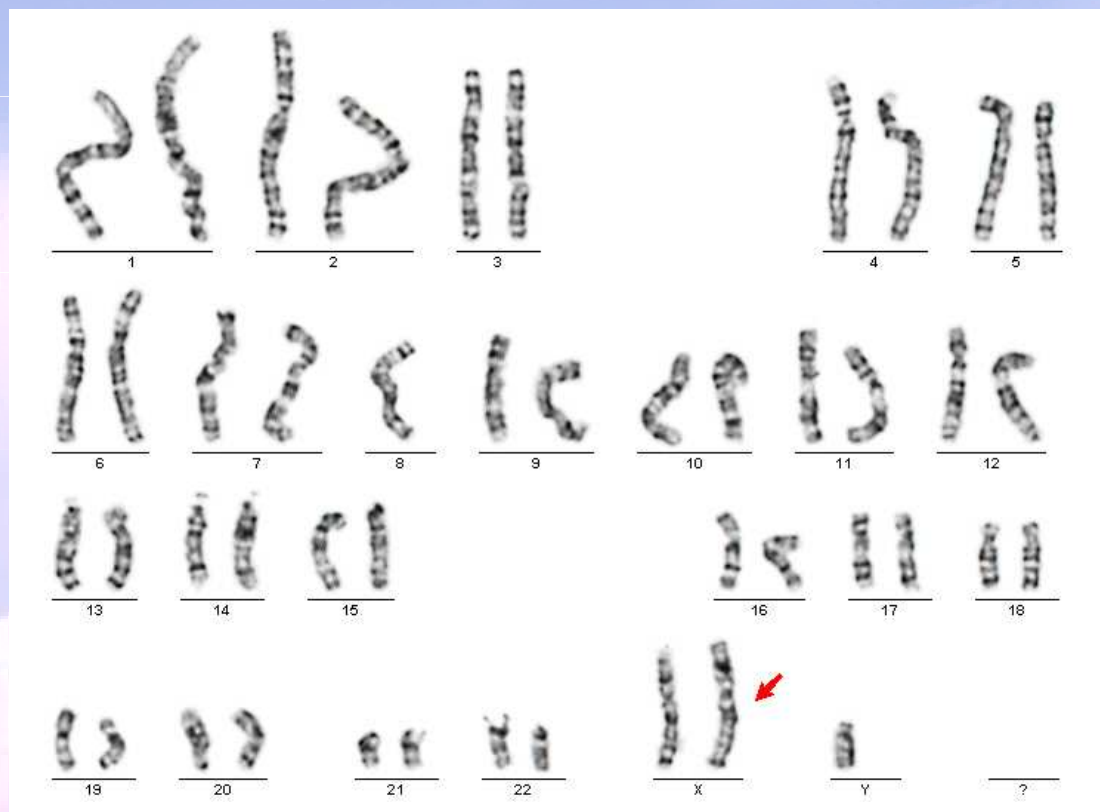
Patauův syndrom 47,XY,+13



VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA)

abnormality počtu gonozomů
Klinefelterův syndrom

Klinefelterův syndrom 47,XXY



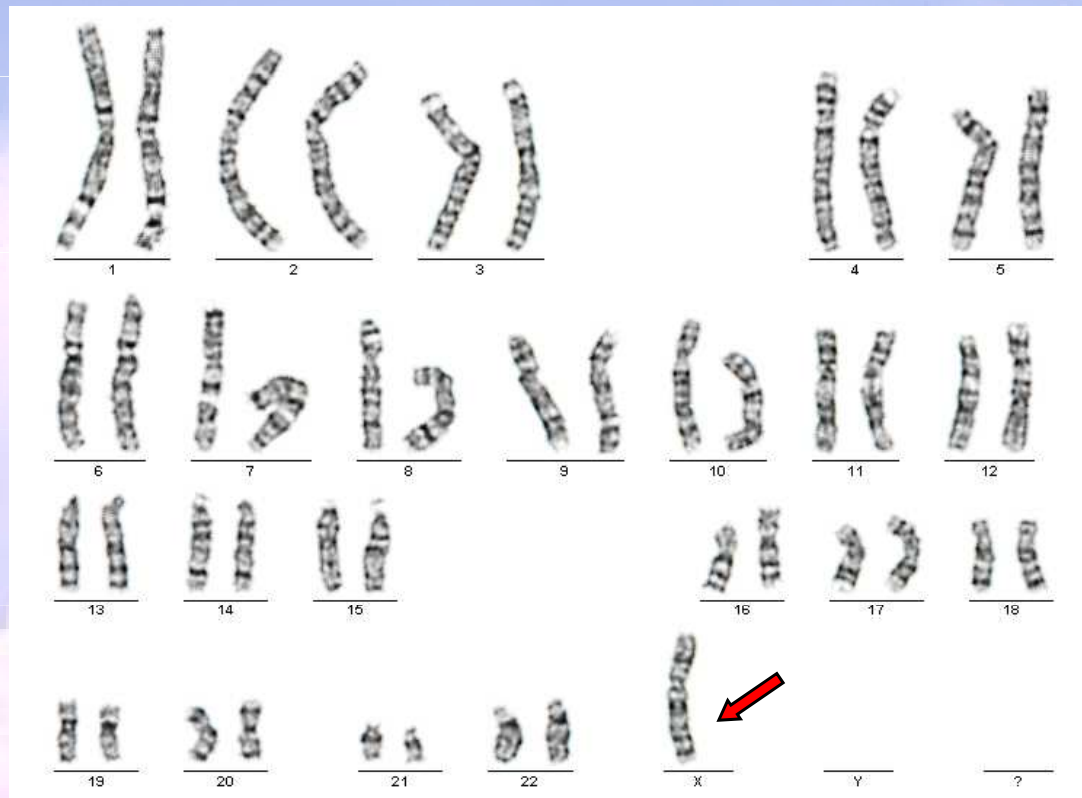
VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) abnormality počtu chromozomů aneuploidie

- **monozomie** – méně častá porucha
(místo 2 chromozomů v páru přítomen 1)
 - **monozomie gonozomu X** (Turnerův syndrom)
45,X (žena)
častý výskyt
 - **monozomie autozomů** – výjimečně se vyskytující porucha, slučitelná se životem jen u některých chromozomů a to 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)
45,XX,-18[10]/46,XX[190]



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

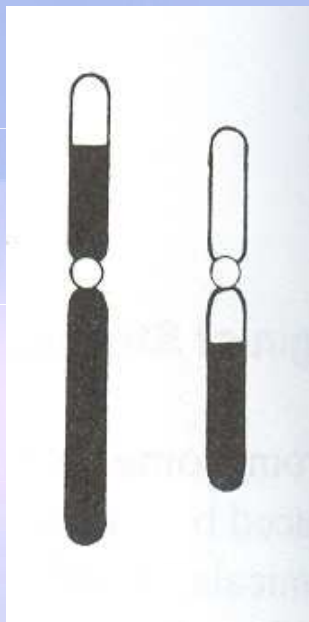


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

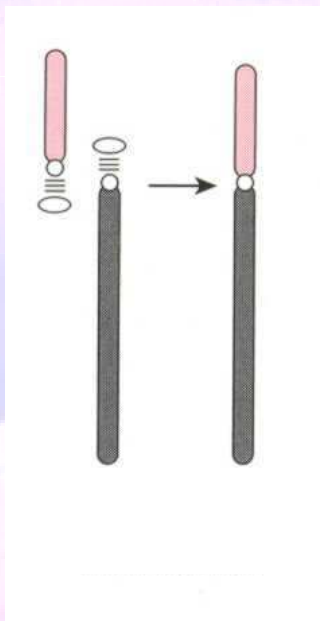


VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokace

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



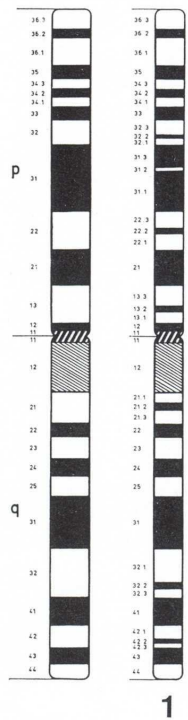
← balancované translokace –
výměny chromozomových segmentů
mezi dvěma, zpravidla nehomologními,
chromozomy



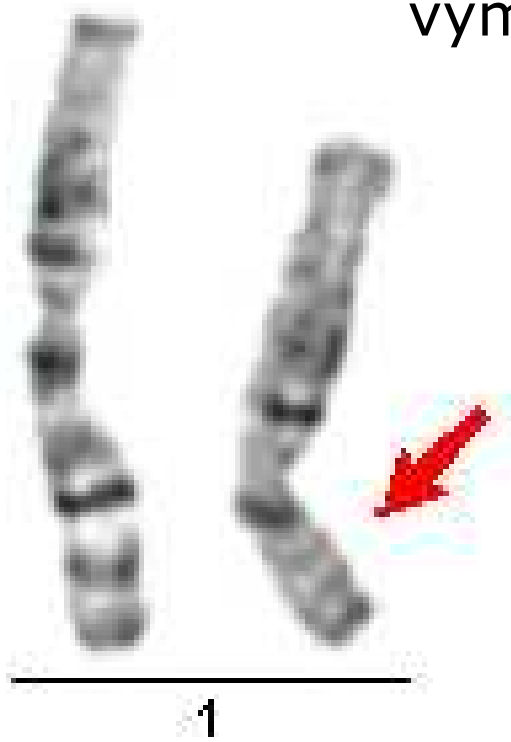
← robertsonovské translokace –
2 akrocentrické chromozomy
fúzíjí v oblasti centromery
a ztrácejí svá krátká
raménka (ztráta nemá vliv na
fenotyp), vznik zlomů v oblasti centromery

VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokace

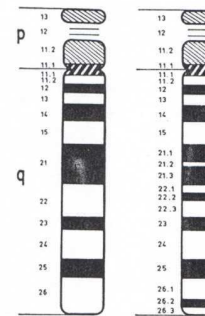
balancovaná translokace t(1;15)
výměna koncových úseků chromozomů



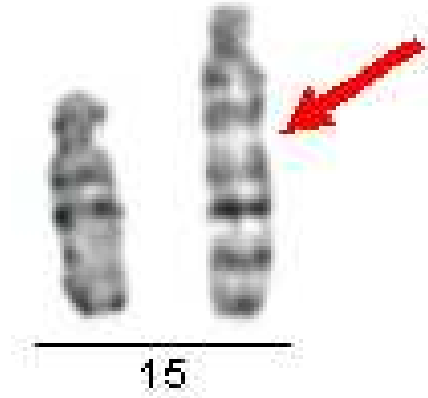
1



1



15



15



VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby balancovaná translokace t(1;15)



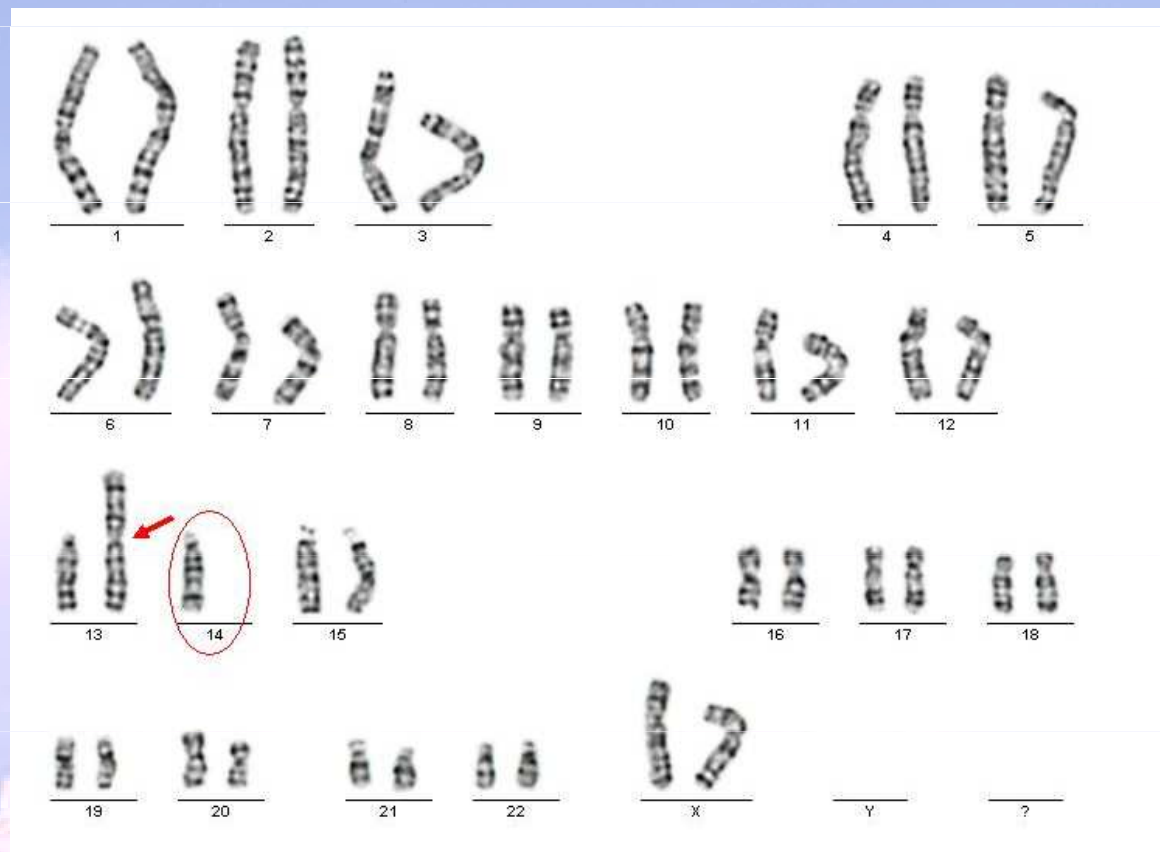
46,XX,t(1;15)(q12;q22)

VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokace

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

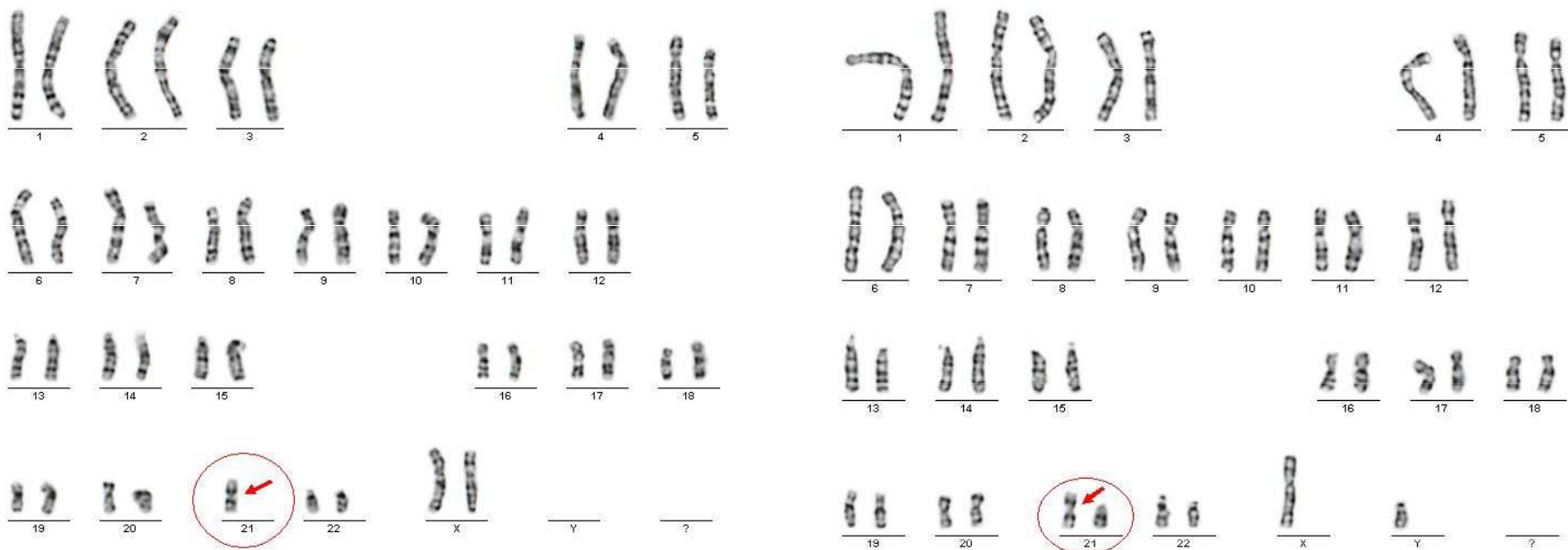


VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby robertsonovská translokace



45,XX,der(13;14)(q10;q10)

VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokační forma Downova syndromu



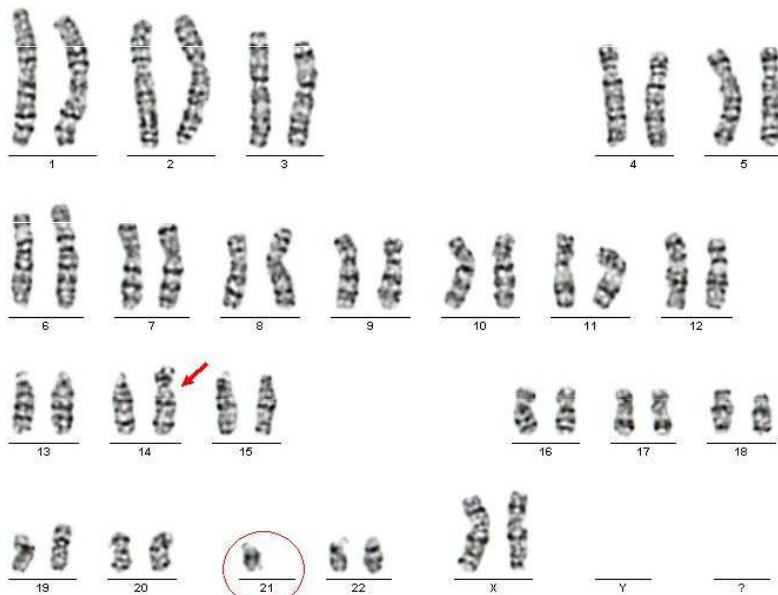
rodič

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

dítě

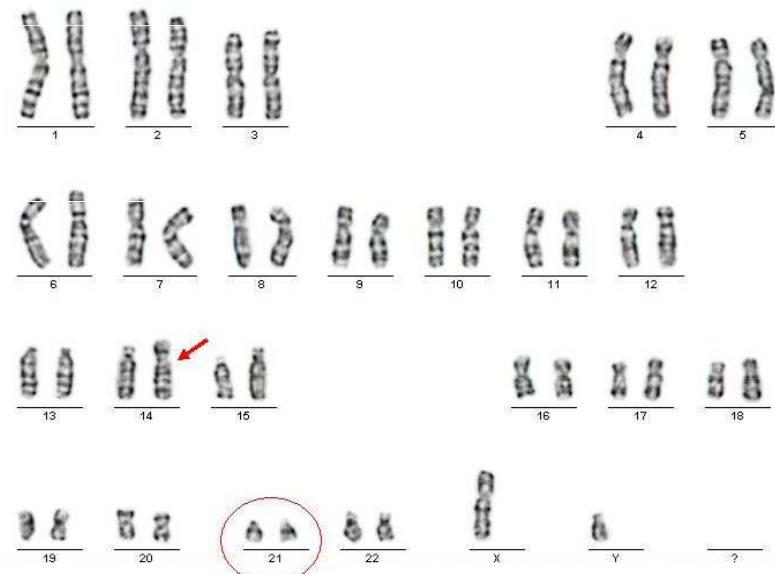
46,XY,der(21;21)(q10;q10),+21

VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokační forma Downova syndromu



rodě

45,XX,der(14;21)(q10;q10)



dítě

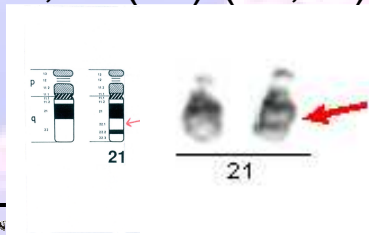
46,XY,der(14;21)(q10;q10),+21

VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokace

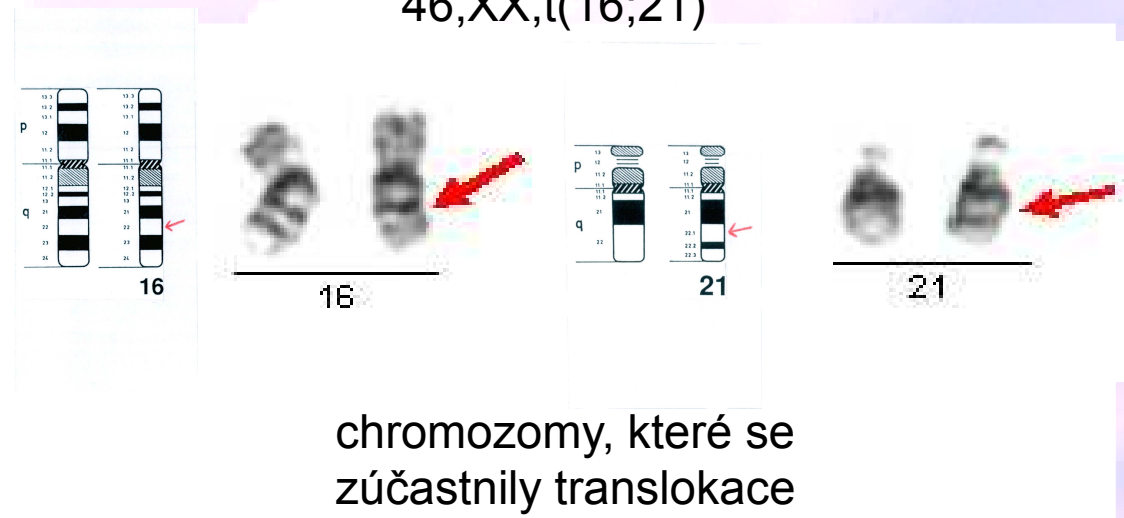
translokace u svých nositelů většinou nezpůsobují abnormální fenotyp, ale jsou spjaty s **vysokým rizikem vzniku nebalancovaných gamet** a s tím spjatých potratů nebo narození **potomků s nebalancovaným karyotypem** (parciální monozomie jednoho a parciální trizomie druhého chromozomu)



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

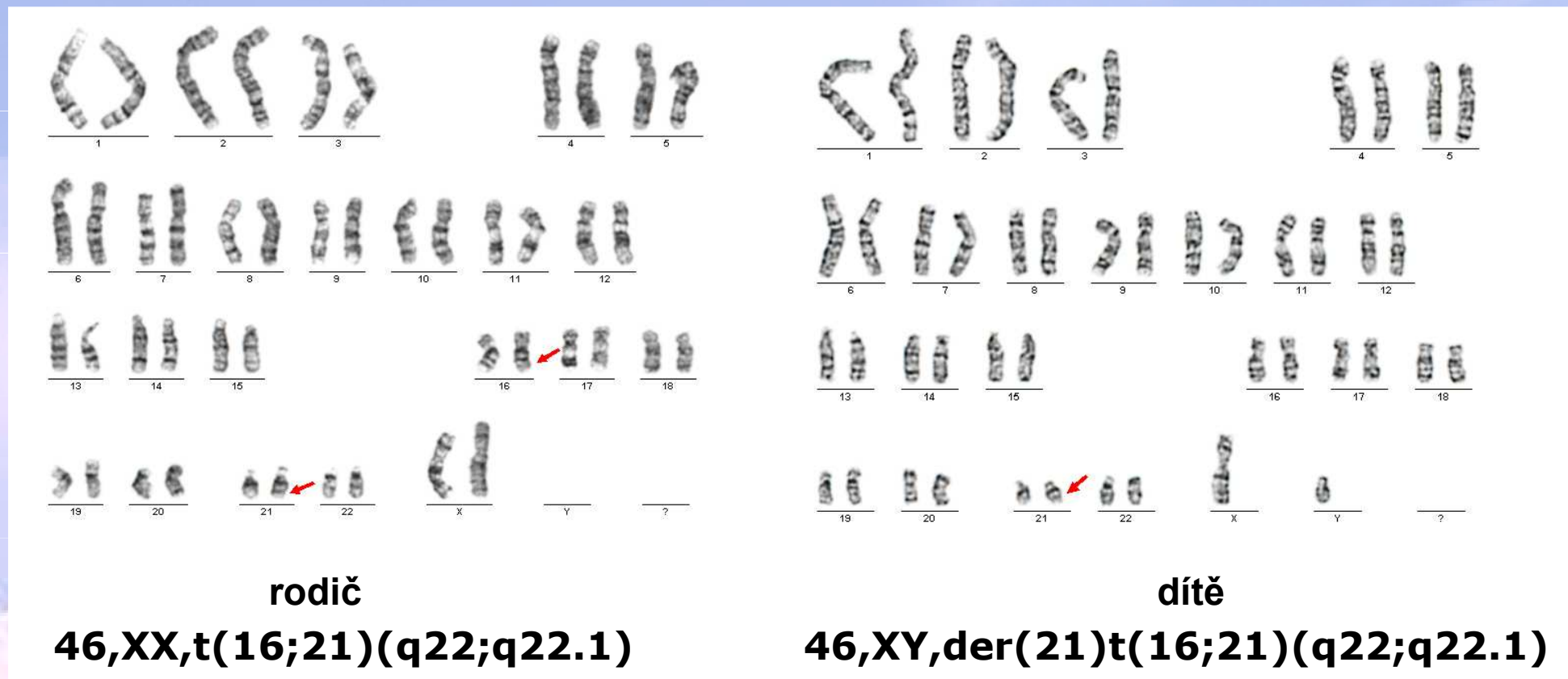


karyotyp matky
46,XX,t(16;21)



chromozomy, které se
zúčastnily translokace

VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokace



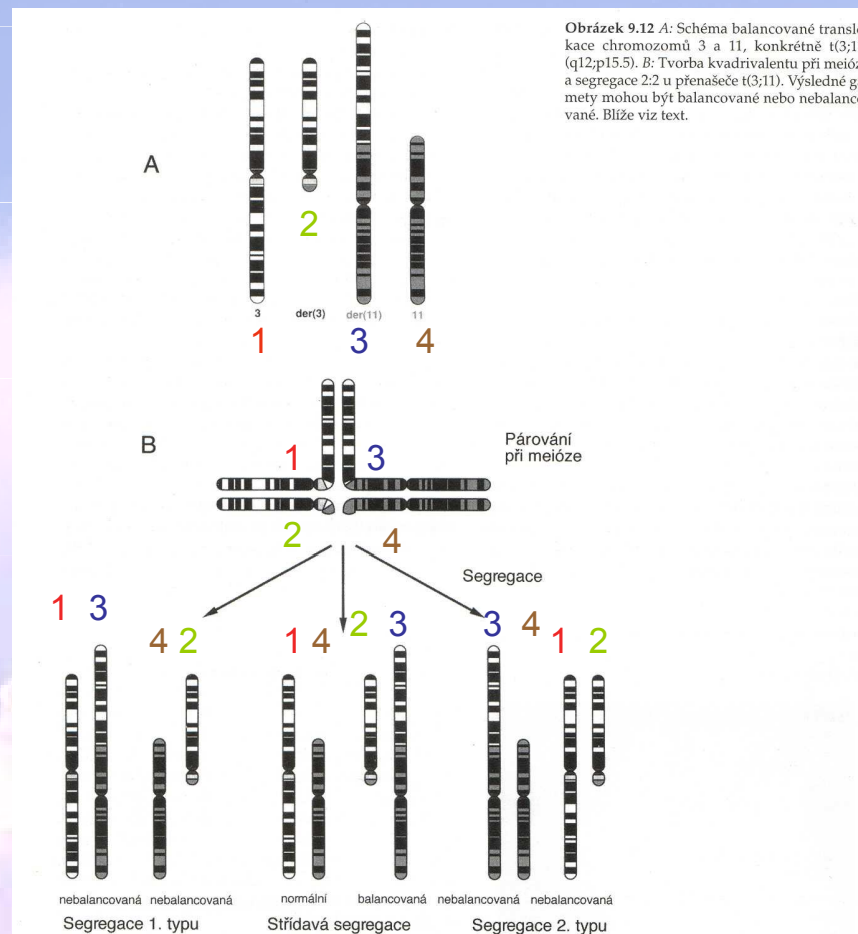
VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby translokace

- **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
 - mohou mít fenotypové vyjádření v případě, že jsou v důsledku přestavby vyřazeny některé geny z funkce, v místě zlomu vznikla malá delece, která není detekovatelná ad. (zdánlivě balancovaná chromozomová přestavba)
- **nebalancované přestavby** – část chromozomového materiálu v karyotypu chybí (parciální monozomie) a část přebývá (parciální trizomie)
 - většinou dochází k fenotypovým abnormalitám



VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA)

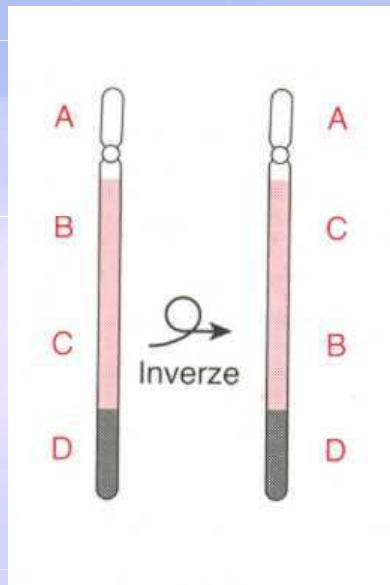
strukturní přestavby - translokace vznik nebalancovaných gamet v meióze



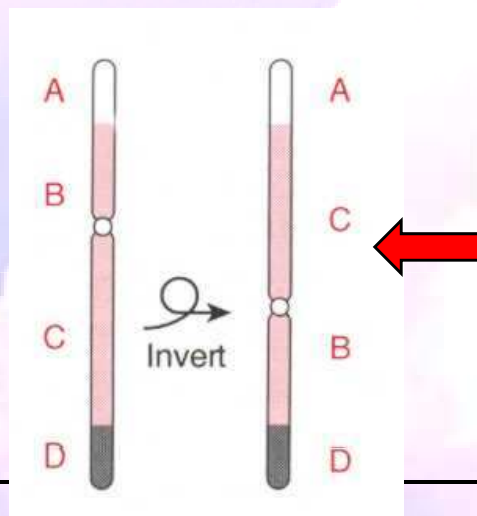
Obrázek 9.12 A: Schéma balancované translokace chromozomů 3 a 11, konkrétně t(3;11) (q12;p15.5). B: Tvorba kvadrivalentu při meióze a segregace 2:2 u přenašeče t(3;11). Výsledné gamety mohou být balancované nebo nebalancované. Blíže viz text.

VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inverze

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



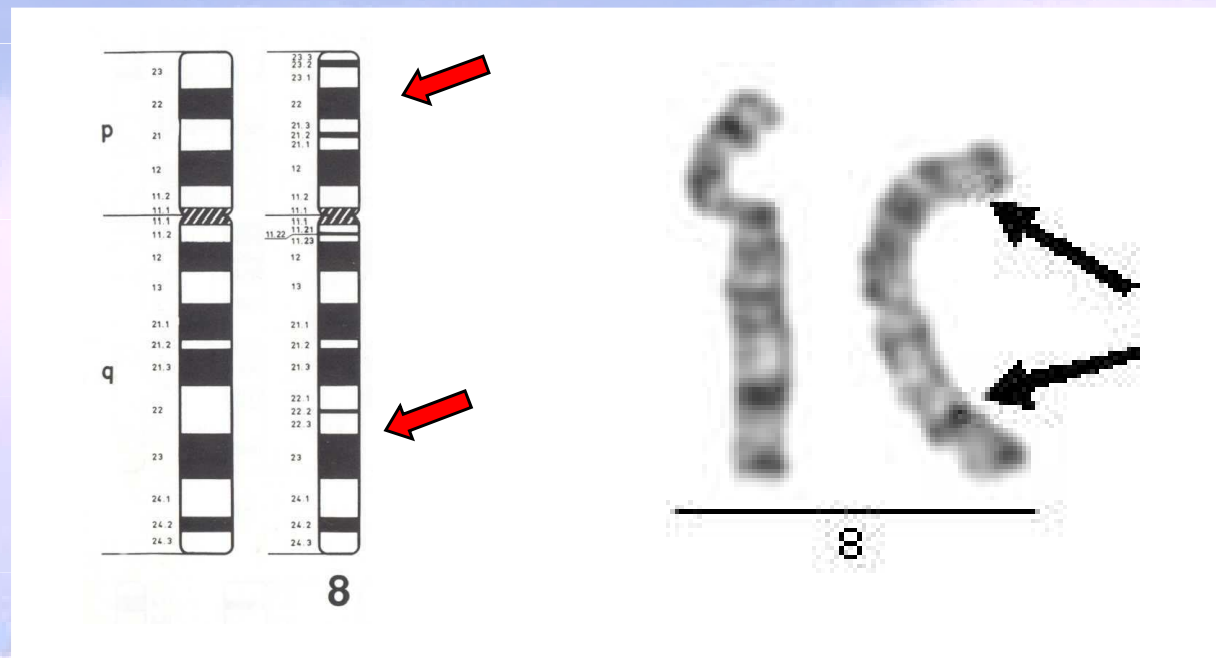
paracentrická inverze –
oba zlomy jsou na stejném raménku,
úsek nezahrnuje centromeru



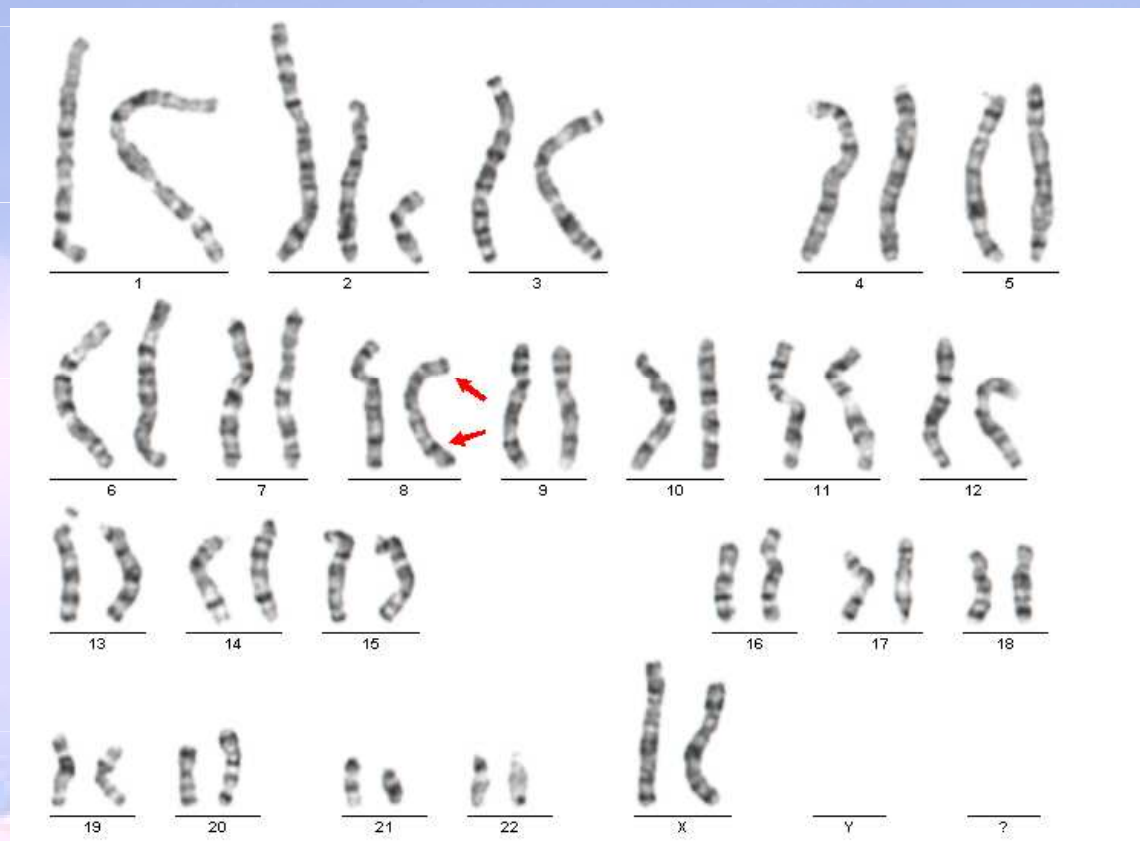
pericentrická inverze –
na každém raménku je jeden zlom,
invertovaný úsek zahrnuje
centromeru

VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inverze

pericentrická inverze inv(8)



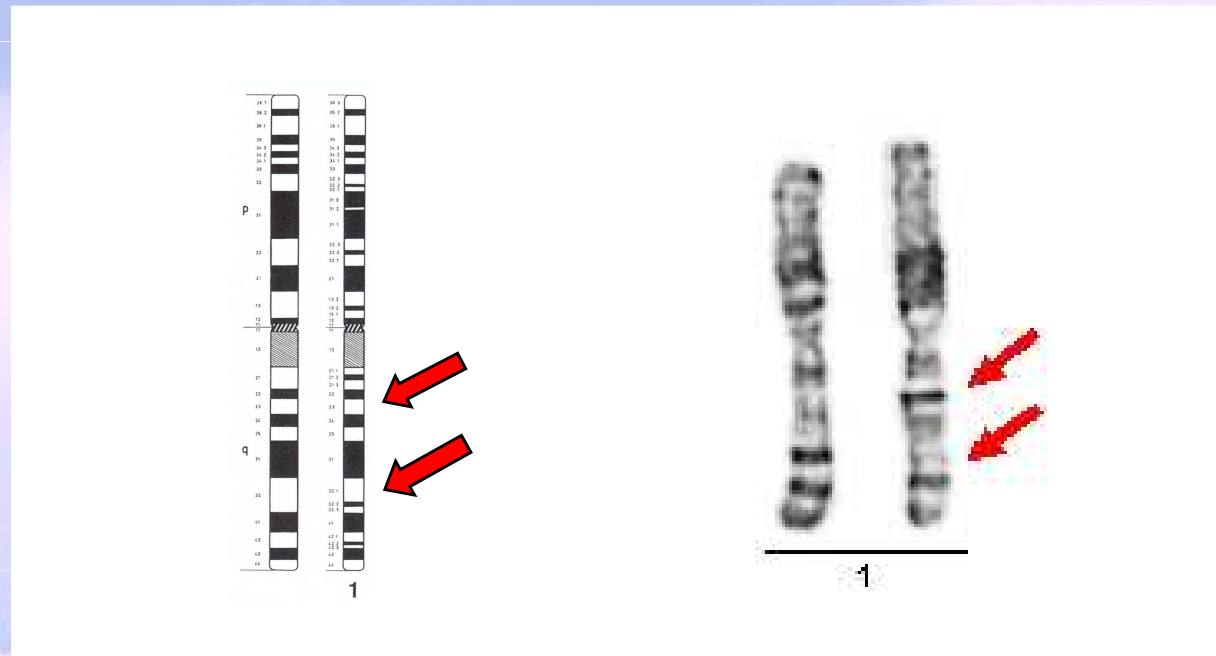
VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inverze



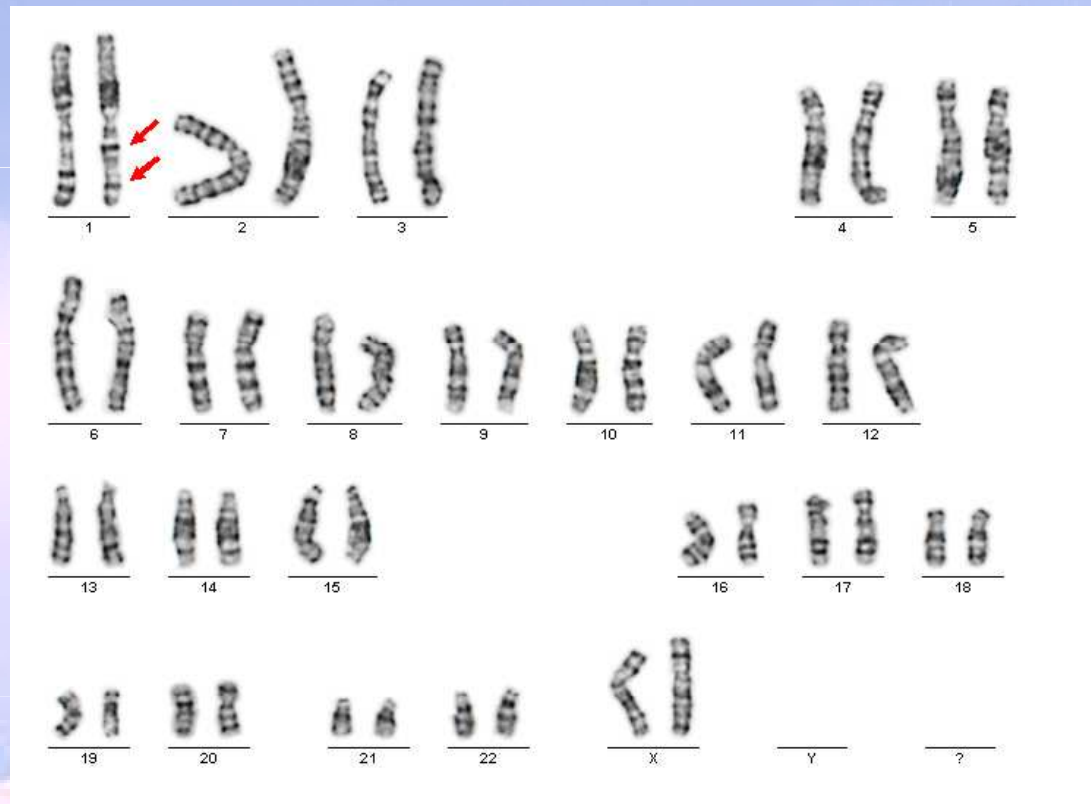
46,XX,inv(8)(p23.1?;q23?)

VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inverze

paracentrická inverze inv(1)



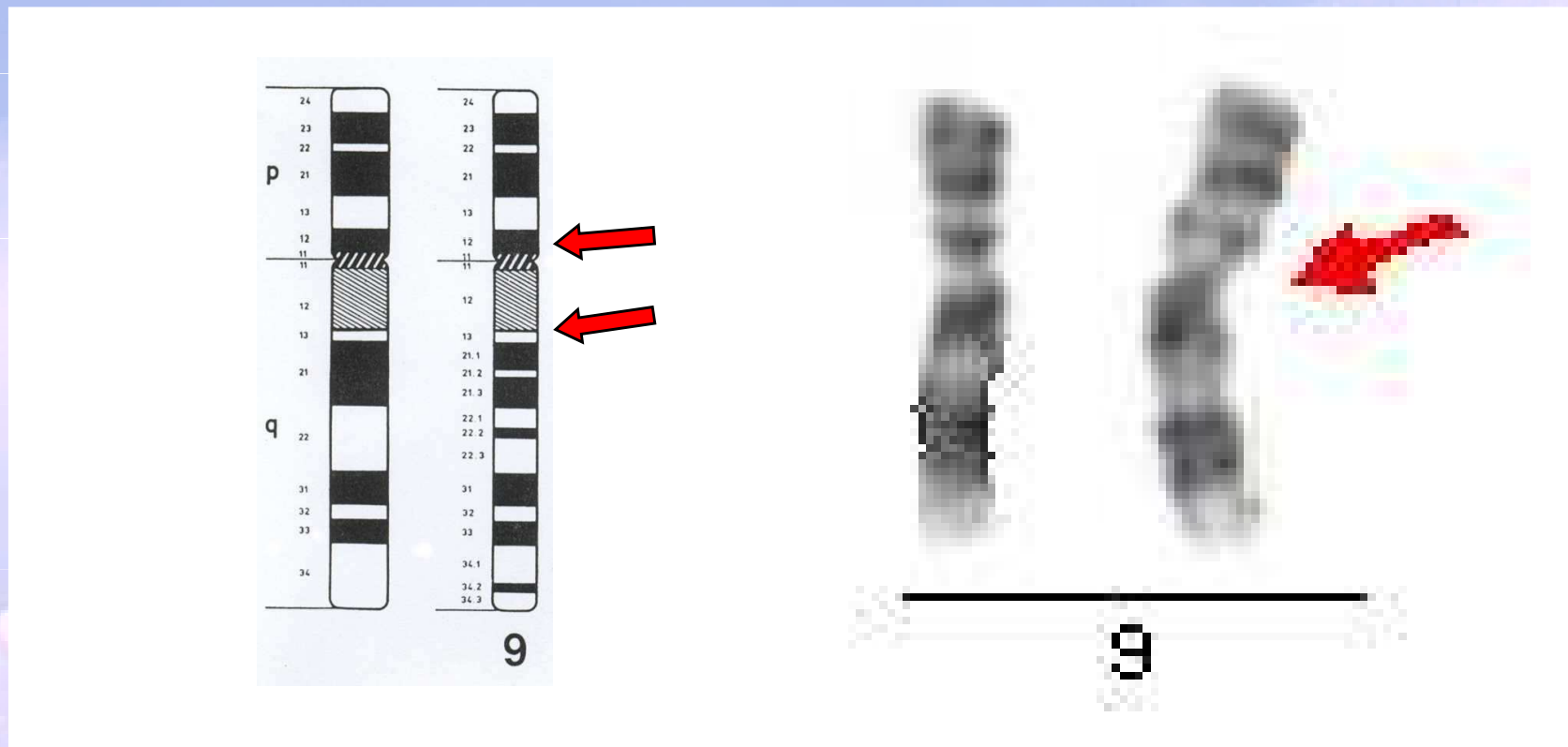
VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inverze



46,XX,inv(1)(q21;q32)

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 inverze

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

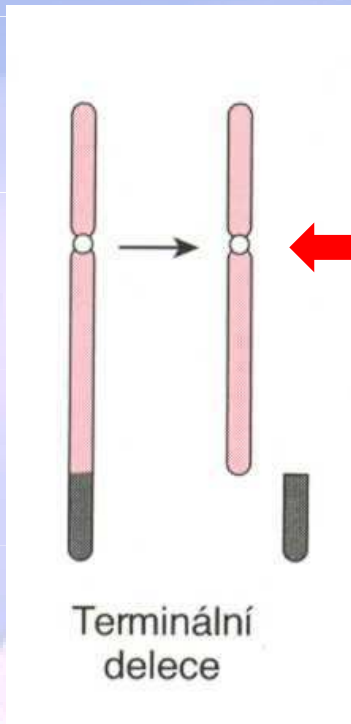


Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



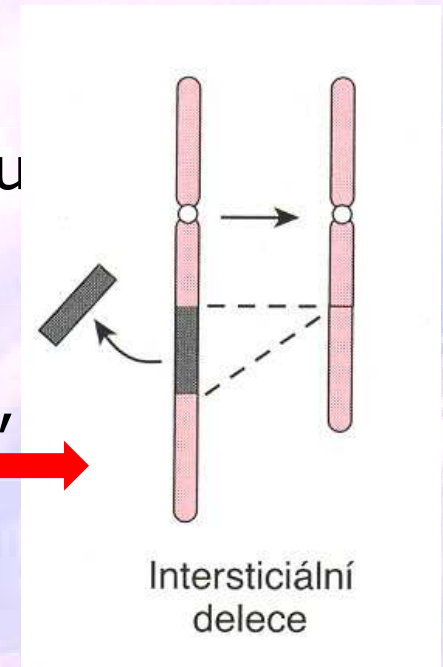
VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby delece

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



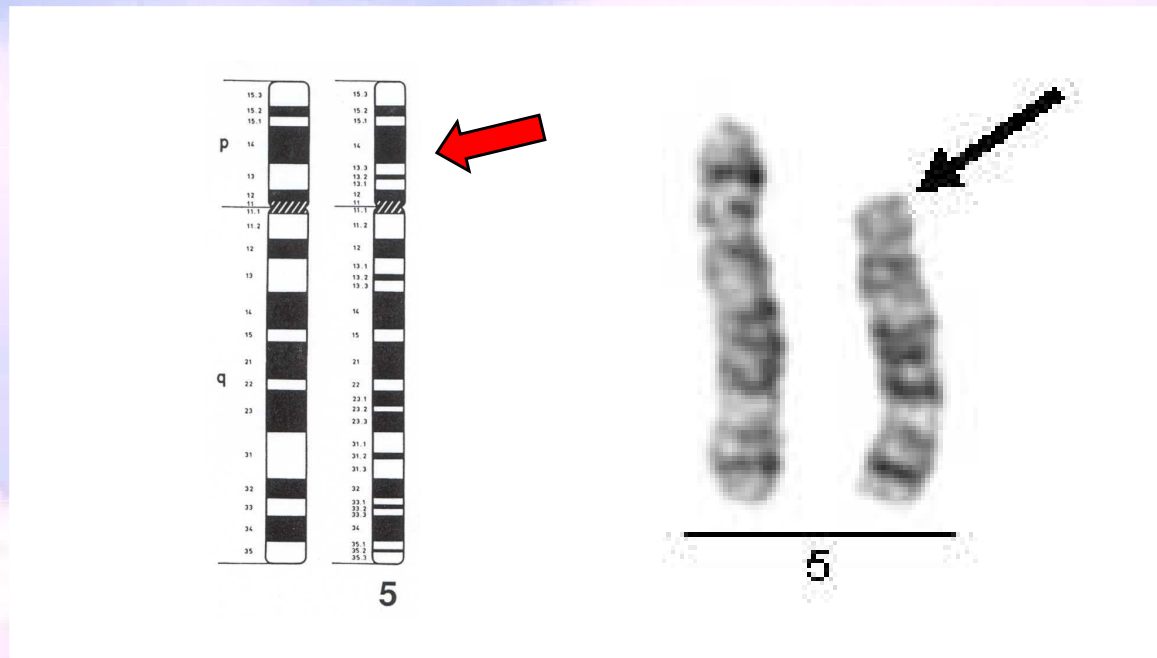
← terminální delece – vznik jednoho zlomu
ztráta koncového úseku chromozomu

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

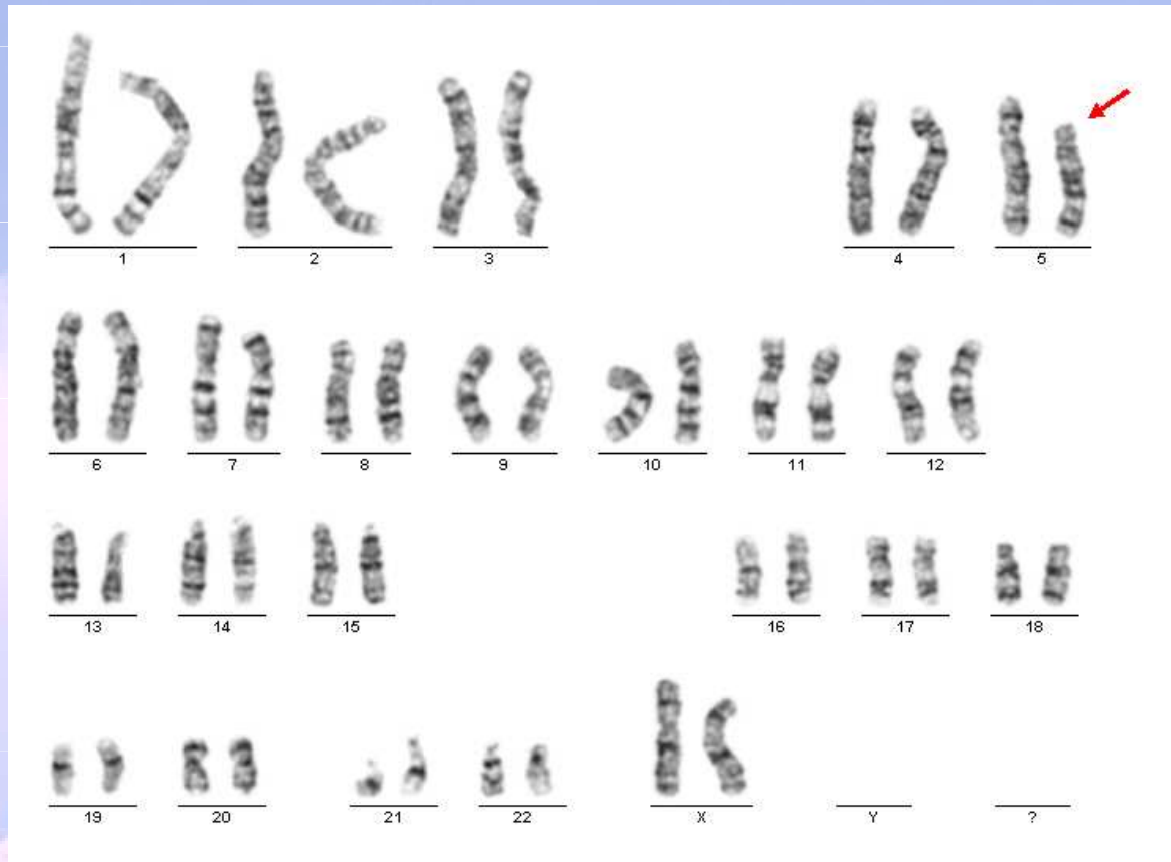


VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby delece

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



VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby delece



46,XX,del(5p)(p14.1-pter)

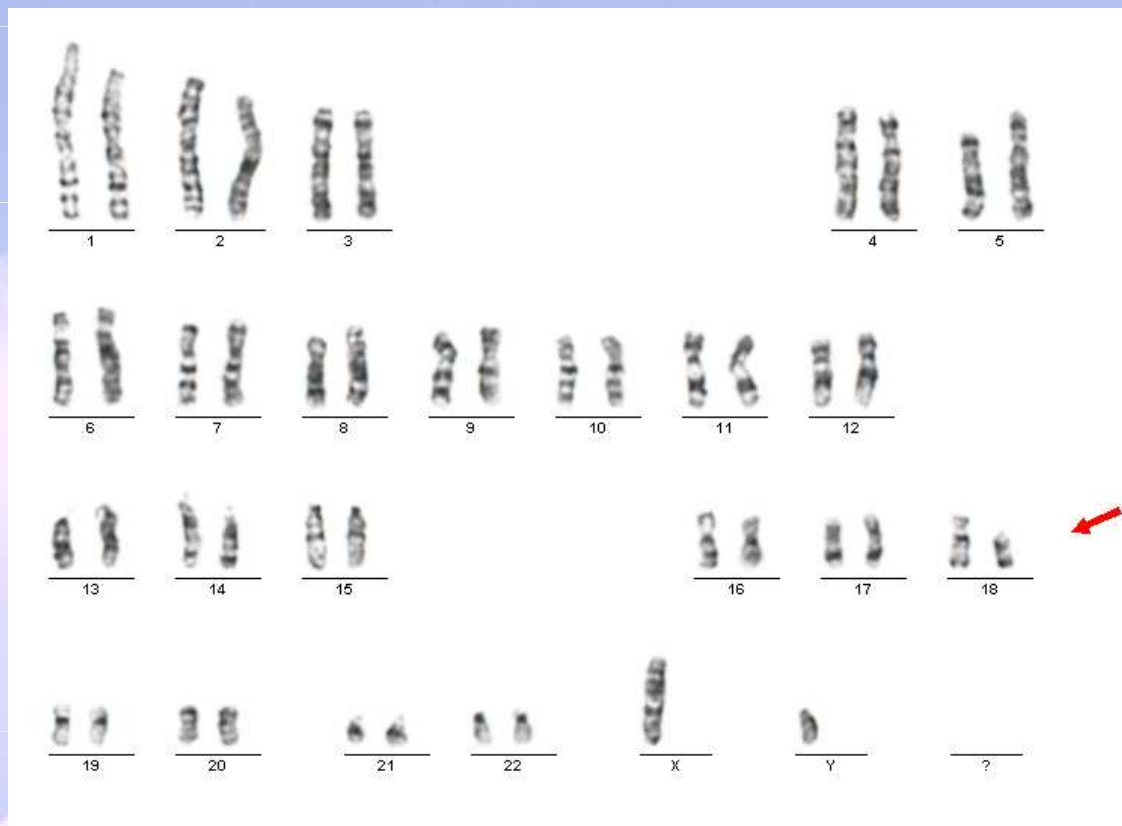
VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby delece

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

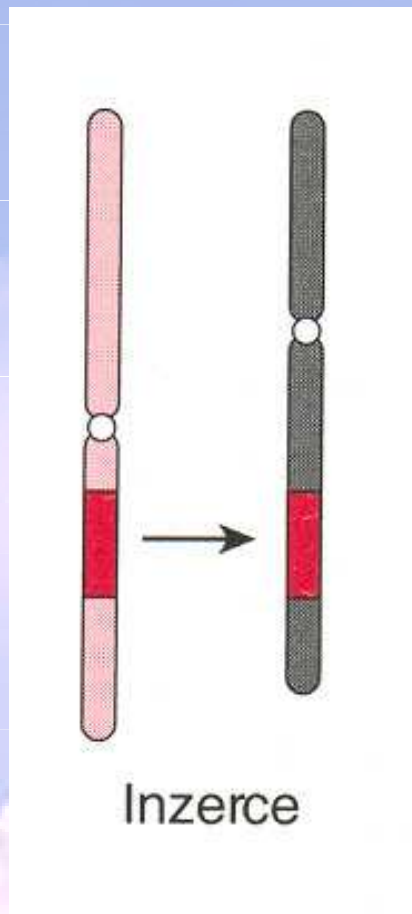


VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby delece



46,XY,del(18p)(p11.1-pter)

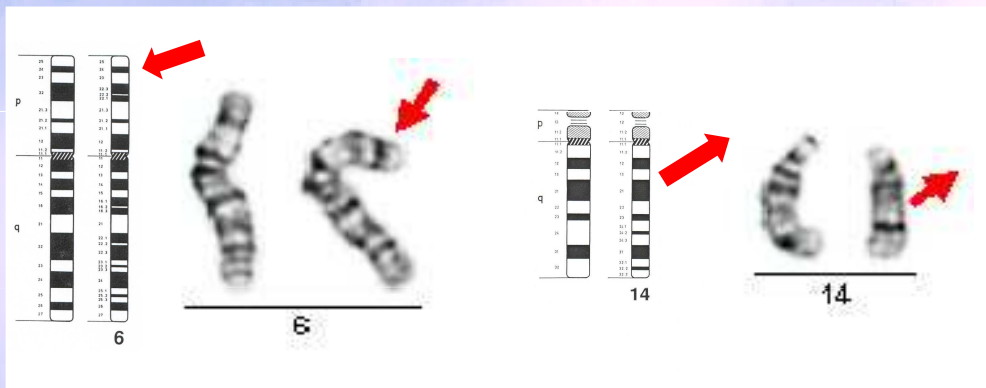
VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inzerce



- **inzerce** – nerekiproký typ translokace
 - segment z jednoho chromozomu je odstraněn a vložen 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

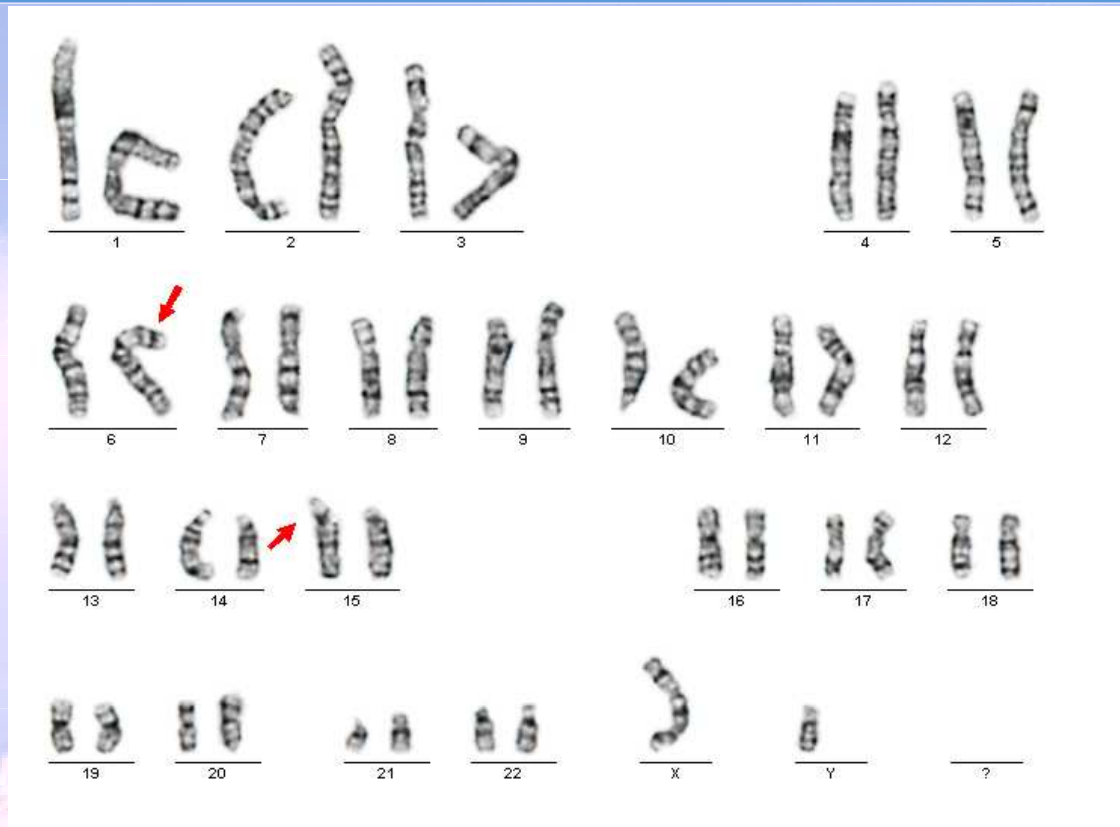
VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inzerce

inzerce úseku chromozomu č. 14 do chromozomu č. 6
příklad zdánlivě balancované přestavby



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

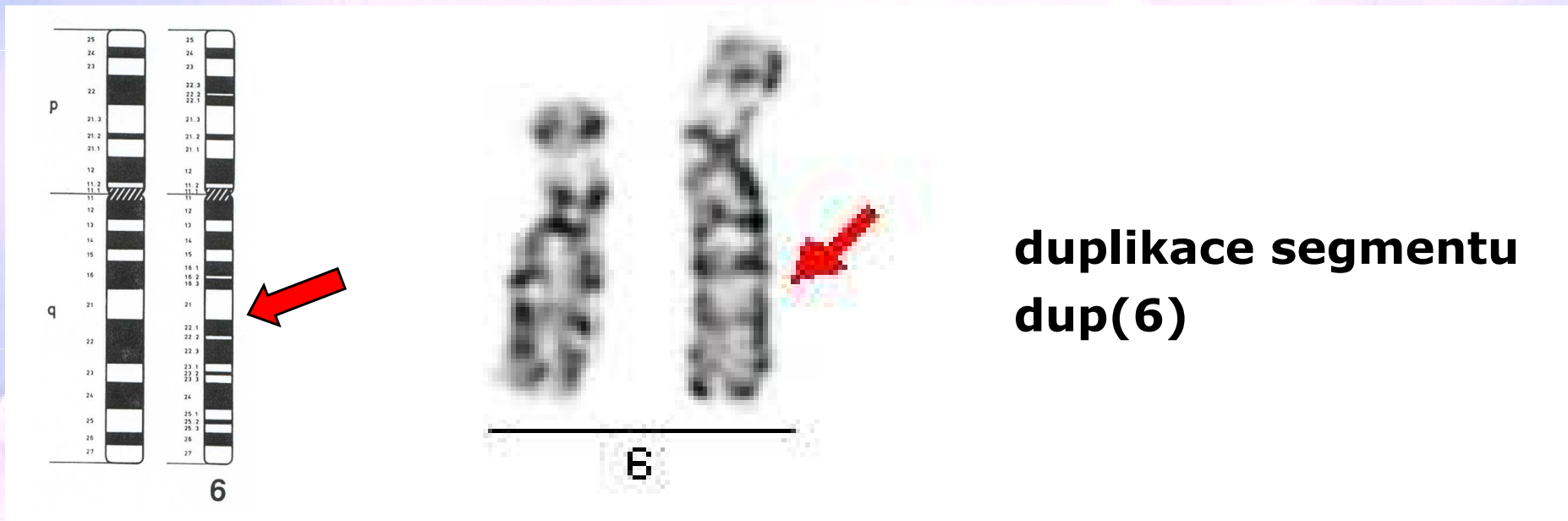
VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby inzerce



46,XY,ins(6;14)(p24;q13q22)

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 duplikace

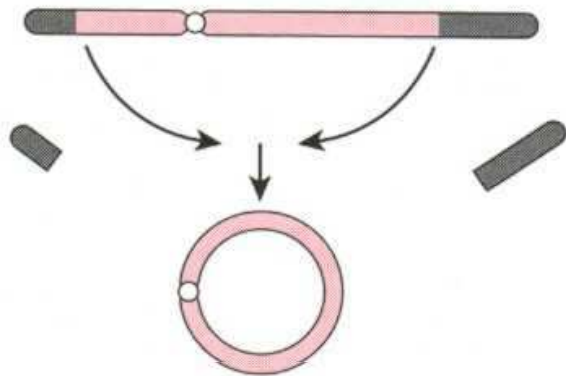
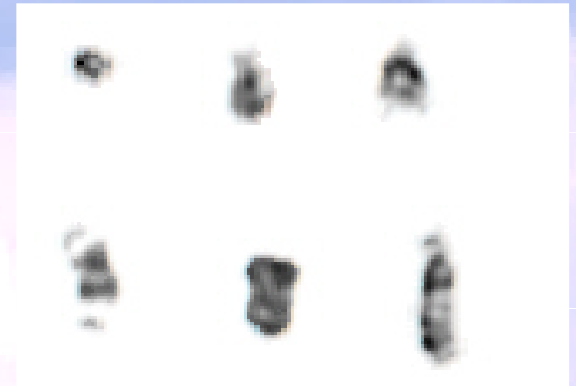


46,XX,dup(6)(q22-q23)

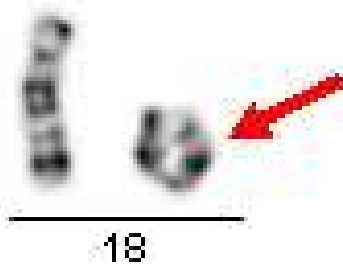
VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby neobvyklé typy chromozomů

marker chromozomy

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



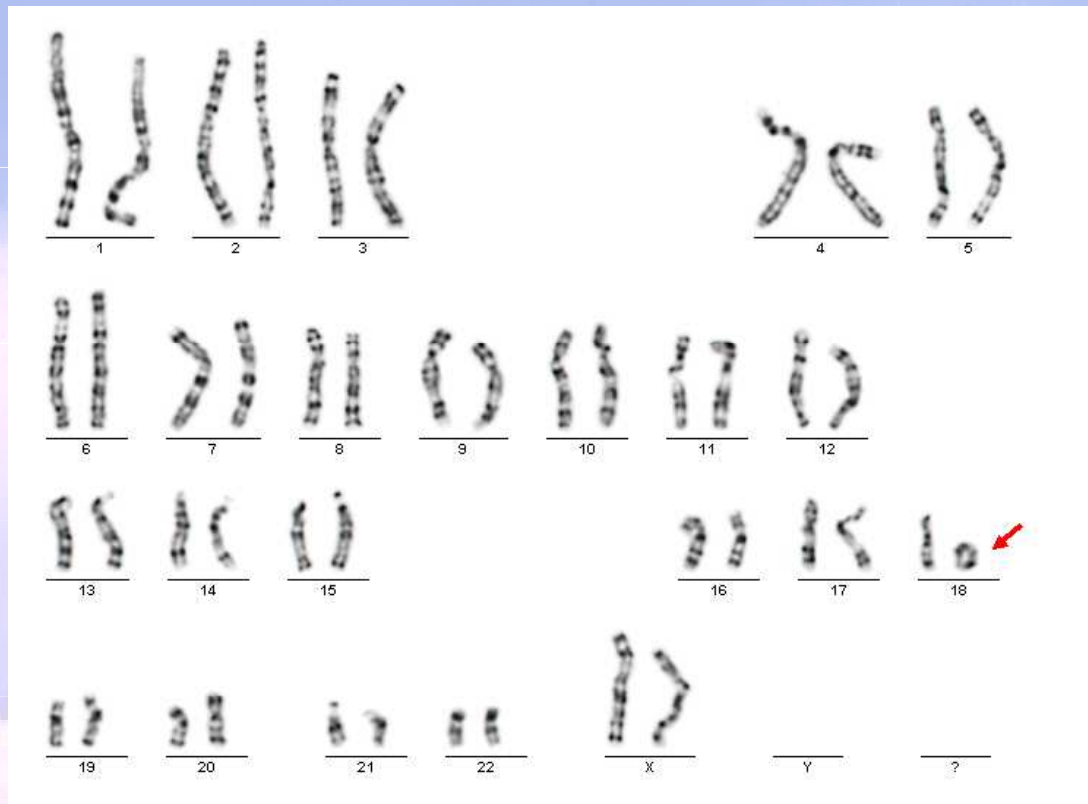
Kruhový
chromozom



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 ring chromozom



46,XX,r(18)

VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby marker chromozom



47,XX,+mar

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)

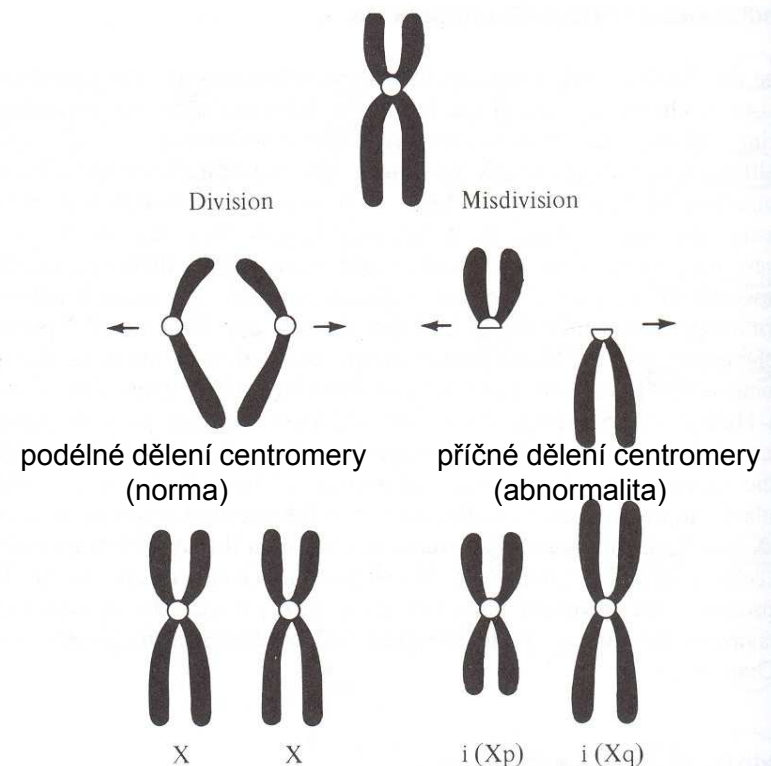
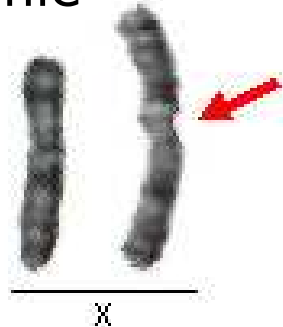
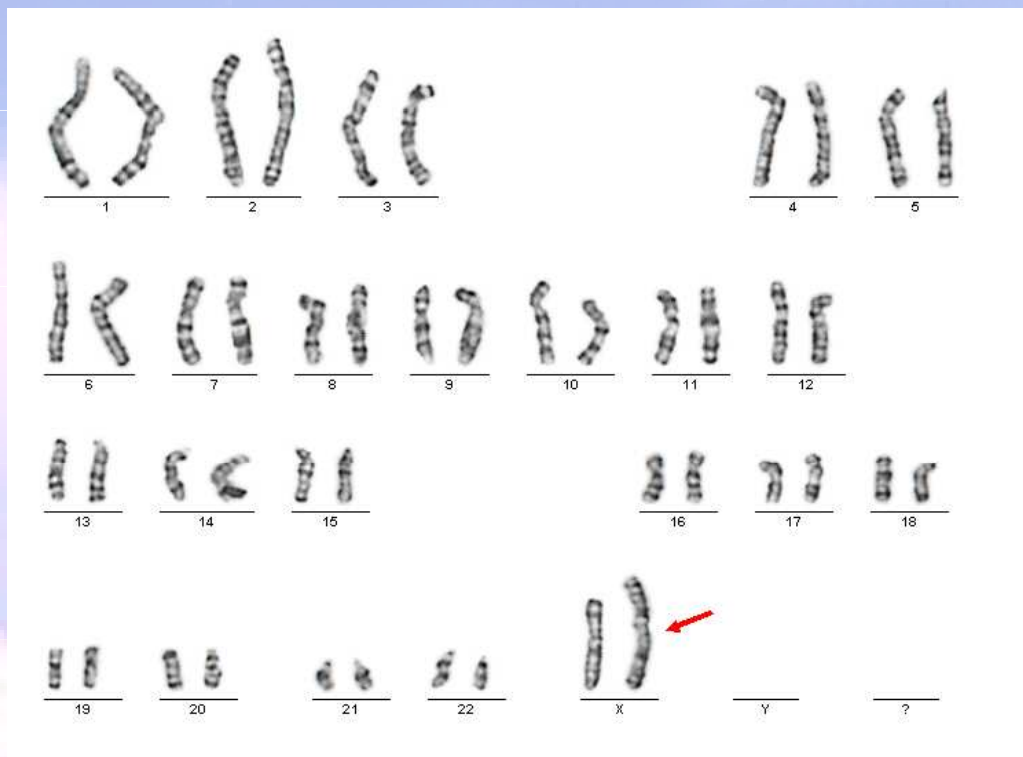


Figure 19.2. Misdivision of the human X chromosome resulting in the formation of a long-arm isochromosome i(Xq) and a short-arm isochromosome i(Xp) (presumably inviable).

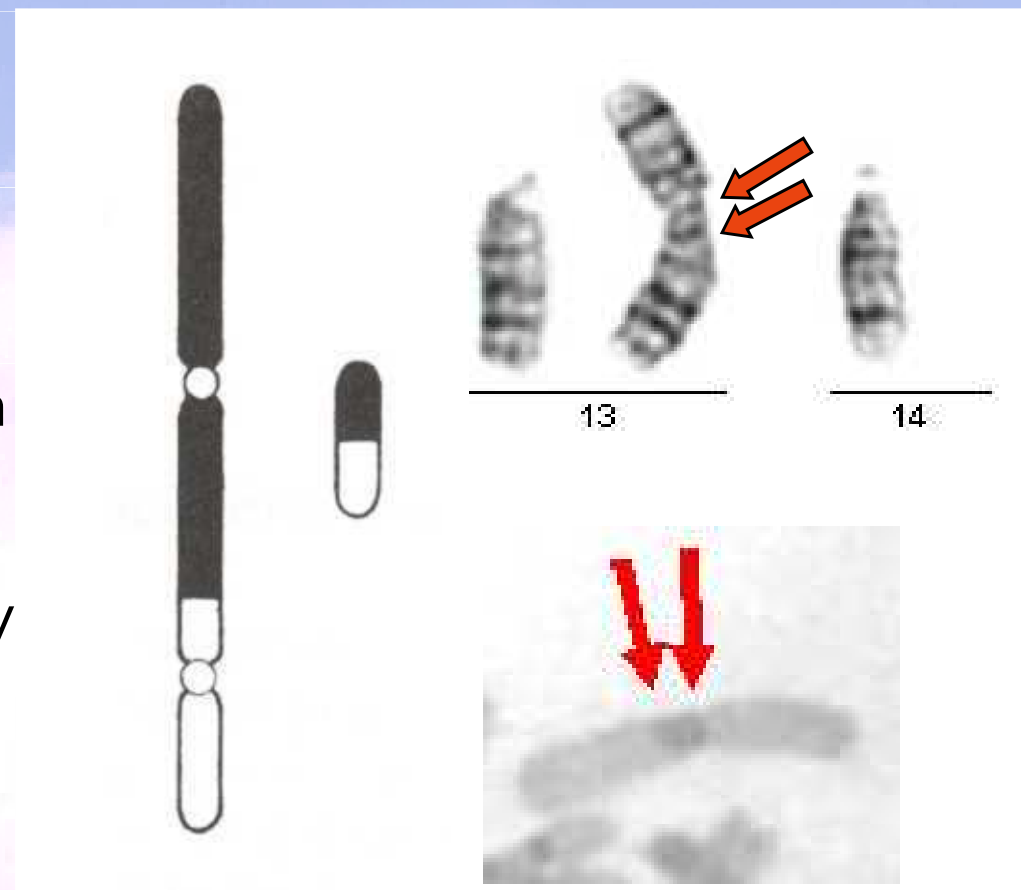
VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby izochromozom



46,X,idic(Xq)

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 acentrický fragment spojením úseků bez centromery



VROZENÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (VCA) strukturní přestavby dicentr



46,XY,dic(13;14)(q11;q11)

Klinické indikace k postnatálnímu stanovení karyotypu (VCA)

- podezření na syndrom podmíněný chromozomovou aberací (CHA) (+21,+18,+13, 4p-, 5p-, +8,+9, mikródeleční syndromy)
- novorozenci s mnohočetnými vadami postihujícími více systémů
- neprospívající kojenci + somatické odchylky, dysmorfie obličeje, změny svalového tonu
- psychomotorická retardace +(-) somatické odchylky
- děti s anomáliemi vnitřního i zevního genitálu
- poruchy pohlavního vývoje
- sterilní a dysfertilní páry (opakované samovolné aborty (SA), dva a více !!!)
- dárci gamet !!!
- partneři před IVF !!!
- děti určené k adopci



ZÍSKANÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (ZCA)

- **vyšetření vlivu mutagenních faktorů prostředí na člověka**
- změny nejsou vrozené (nejsou součástí karyotypu), jsou získané (vyskytují se v některých buňkách v důsledku vlivu vnějších faktorů, v různých buňkách se mohou vyskytovat různé změny)
- 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, vyšetřujeme 100 mitóz**



ZÍSKANÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (ZCA) charakteristika poškození

poškození chromozomů závisí na:

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



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.)



ZÍSKANÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození

typ poškození závisí na fázi buněčného cyklu v době působení mutagenu:

- chromatidové aberace
 - aberace na jedné chromatidě postiženého chromozomu (poškození už replikované DNA, chromozom se skládá ze 2 chromatid)
- chromozomové aberace
 - aberace na obou chromatidách postiženého chromozomu (poškození DNA před replikací, chromozom se skládá z 1 chromatidy, která se replikuje i s defektem)



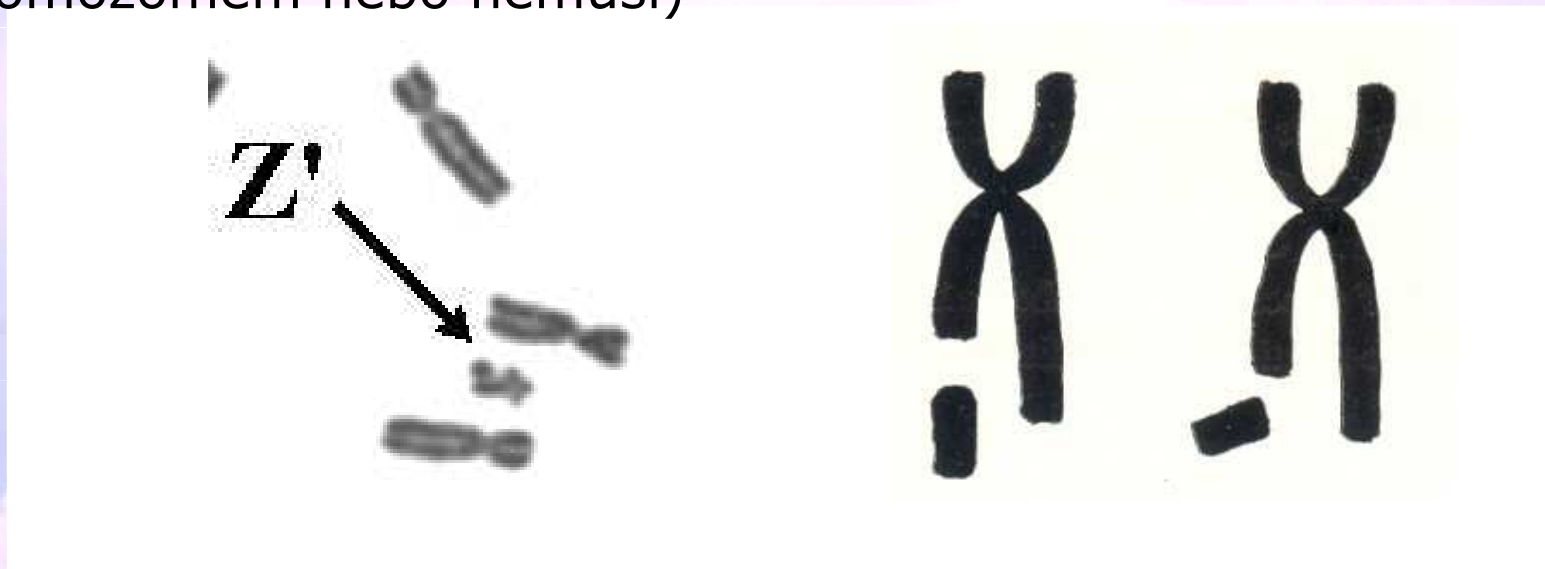
ZÍSKANÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové aberace

- **jednochromatidové gapy (mezery)**
(G´) - příčně slabě se barvící část chromatidy, také úplné přerušení chromatidy nepřesahující její šířku



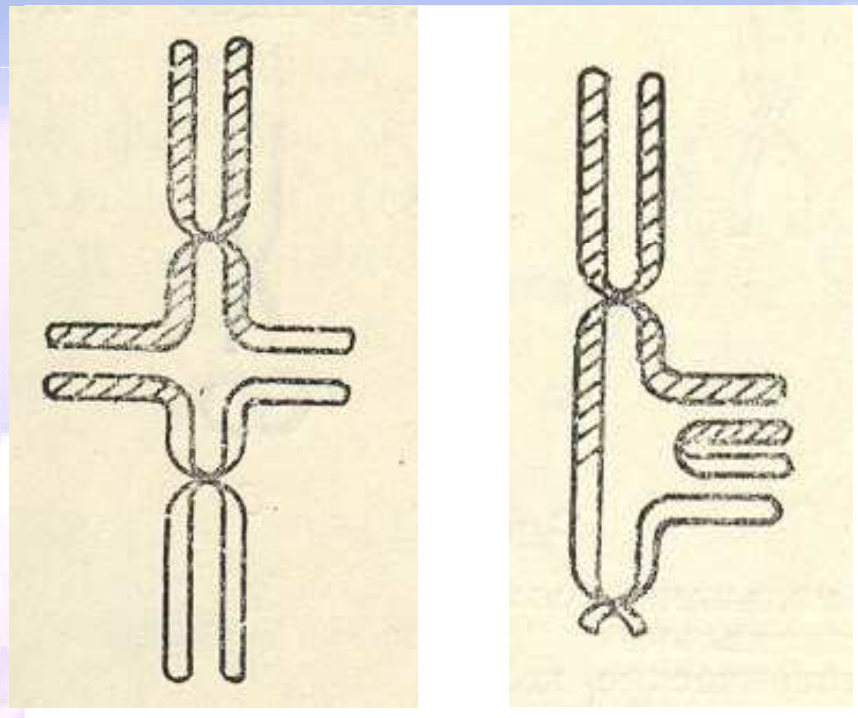
ZÍSKANÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové aberace

- **jednochromatidové zlomy (Z´),**
oddělení samostatného **fragmentu (F)** –
úplné přerušení chromatidy, pravděpodobně koncová delece
(fragменты мívají různé rozměry, mohou být v ose s původním
chromozomem nebo nemusí)

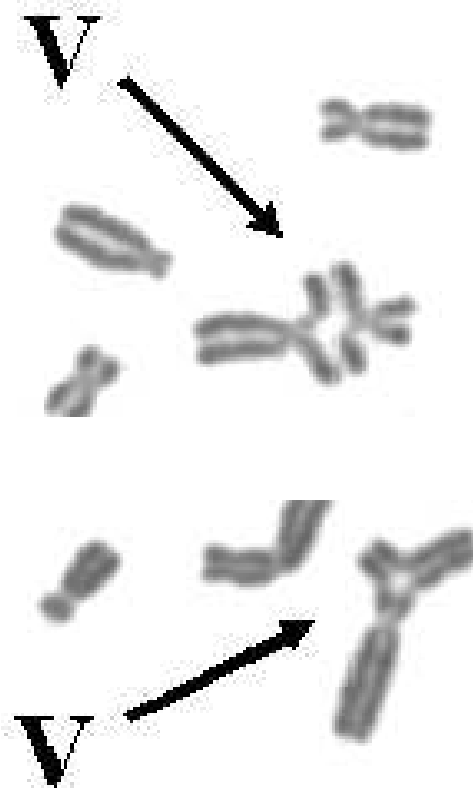
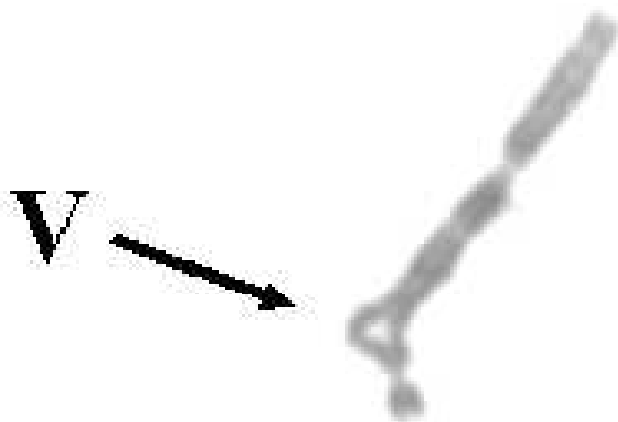
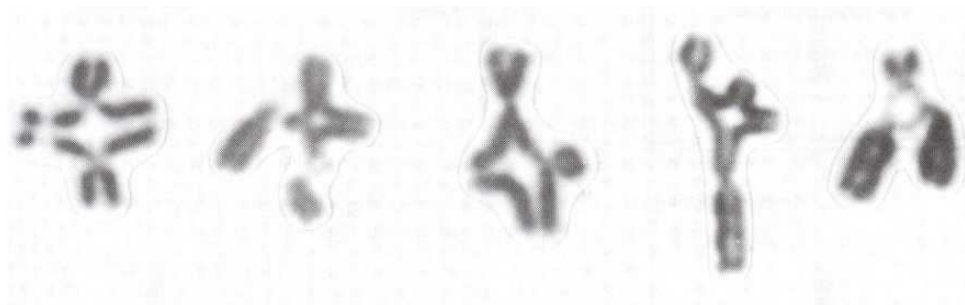


ZÍSKANÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové aberace

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



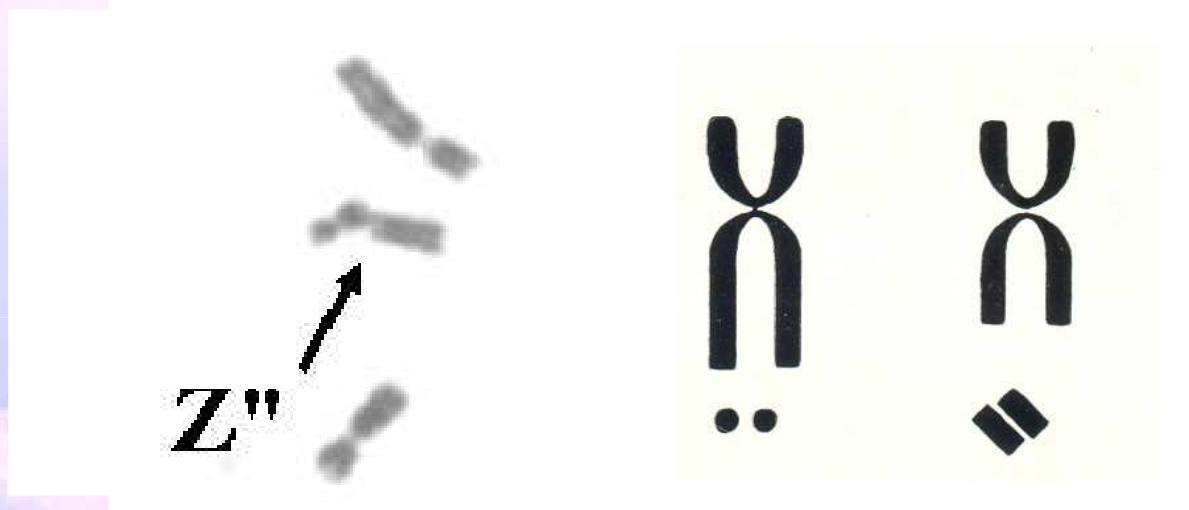
ZÍSKANÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromatidové aberace - výměny



ZÍSKANÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromozomové aberace

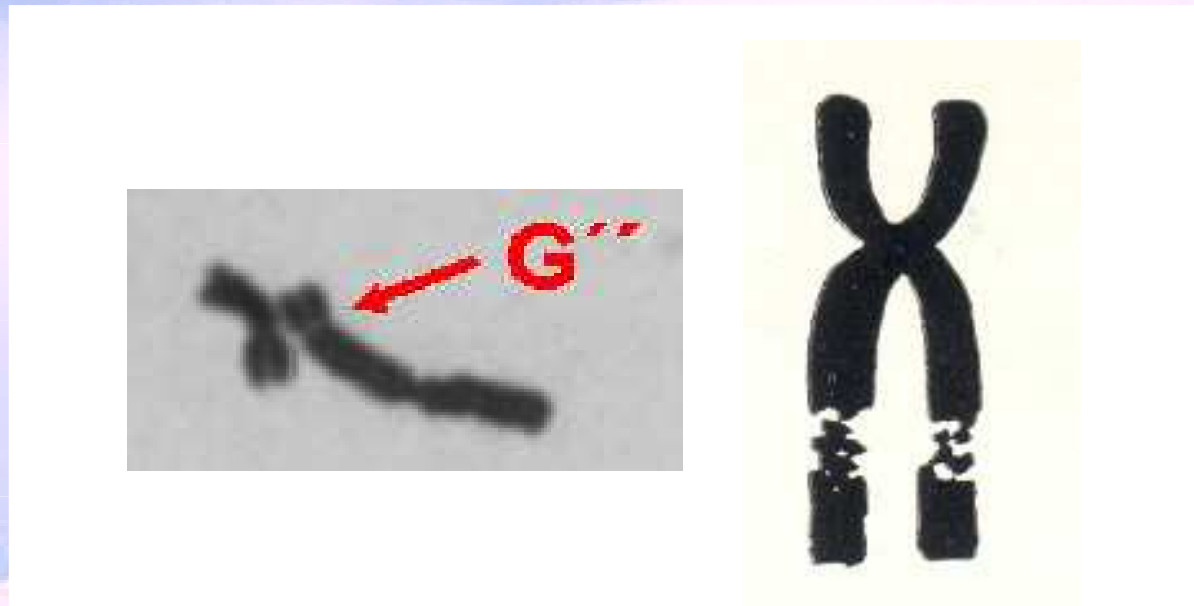
- **dvouchromatidové zlomy (Z´´),
oddělení párových fragmentů (DF)-**

úplné přerušení obou chromatid, pravděpodobně koncová delece (fragment obvykle leží paralelně, mívají různé rozměry, mohou být v ose s původním chromozomem nebo nemusí)



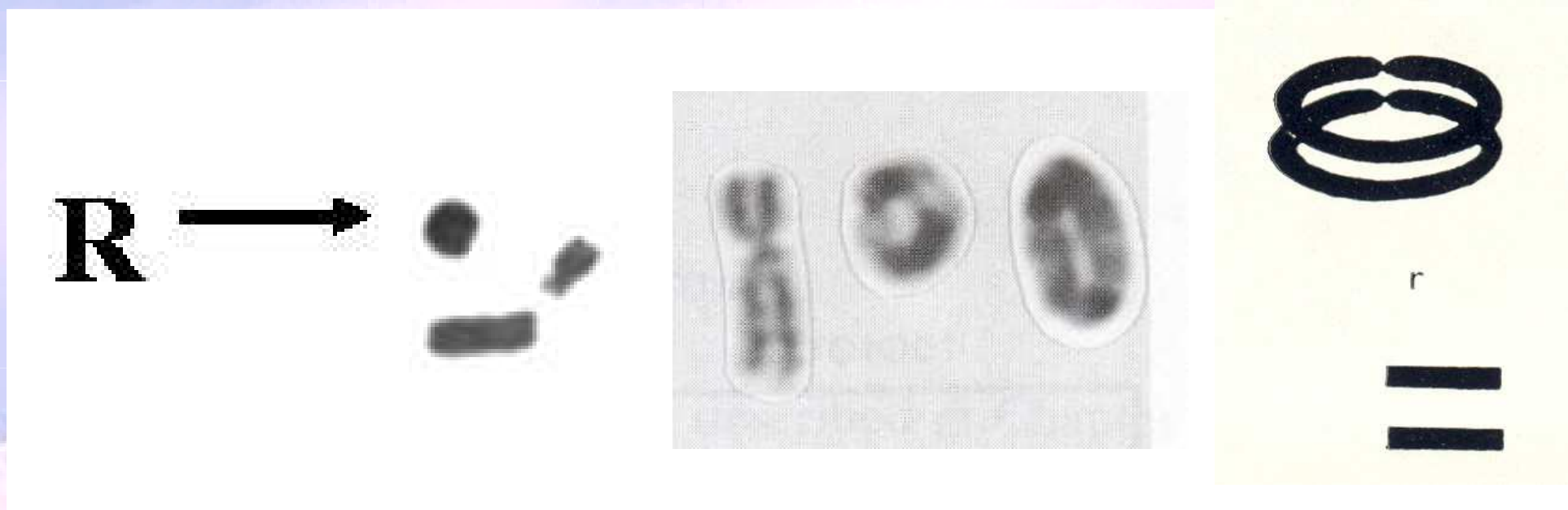
ZÍSKANÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromozomové aberace

- **izochromatidové gapy (mezery) (G'')-**
příčně slabě se barvící část chromozomu, také úplné přerušení chromozomu nepřesahující šířku chromatidy



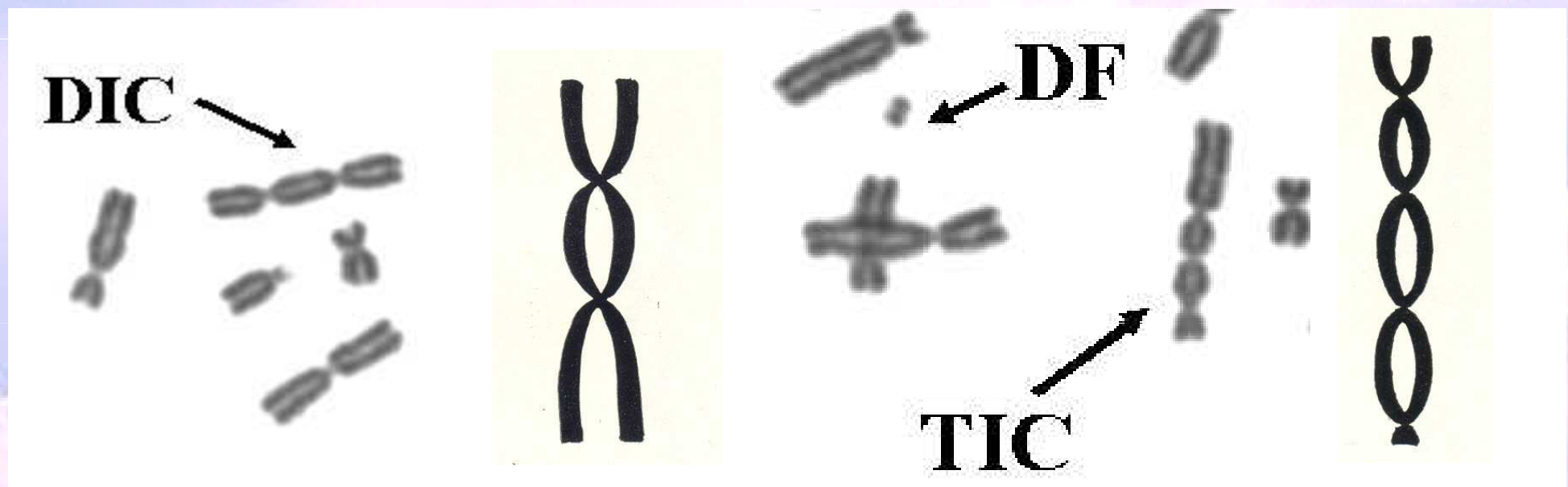
ZÍSKANÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (ZCA)- typ poškození – chromozomové aberace

- **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)- typ poškození – chromozomové aberace

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



ZÍSKANÉ CHROMOZOMOVÉ ABERACE (ZCA)- příprava preparátů

Příprava preparátů na ZCA se liší od přípravy preparátů na stanovení karyotypu (viz kultivace materiálu, zpracování, barvení):

- materiál – periferní krev
- kultivace buněk v suspenzi 48 hodin s přidáním PHA
- kolchicin, hypotonizace, fixace, vykapání suspenze na sklíčka
- **BARVENÍ GIEMSOVÝM BARVIVEM BEZ PRUHOVÁNÍ CHROMOZOMŮ**



Klinické indikace k vyšetření ZCA

- práce v riziku (kontakt se škodlivými látkami, zářením), vstupní prohlídky na pracovištích se zvýšeným rizikem
- podezření na syndromy se zvýšenou lomivostí chromozomů
- před chemoterapií, po chemoterapii, po jiné dlouhodobé léčbě
- v případě, že při vyšetření chromozomů na VCA byl zjištěn markantní nález chromozomových zlomů
- kontrolní vyšetření u podchycených případů



Doporučená literatura

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



Děkuji za pozornost

