

# Základy klinické cytogenetiky I

Mgr. Hanáková



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno

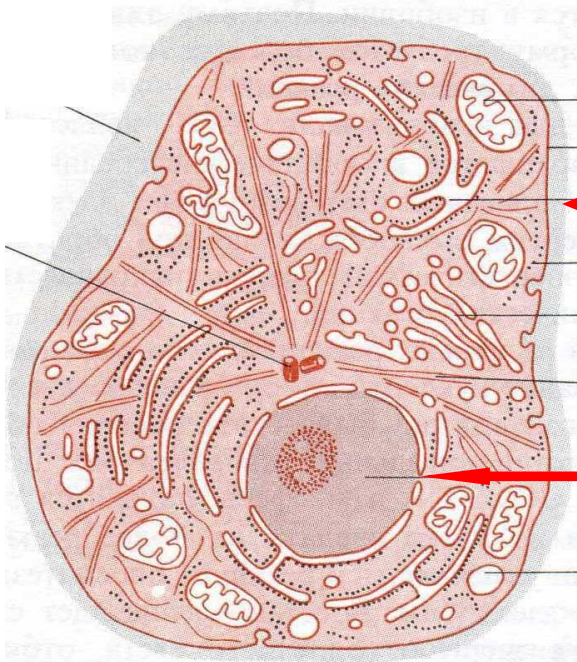


# DEFINICE A HISTORIE

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



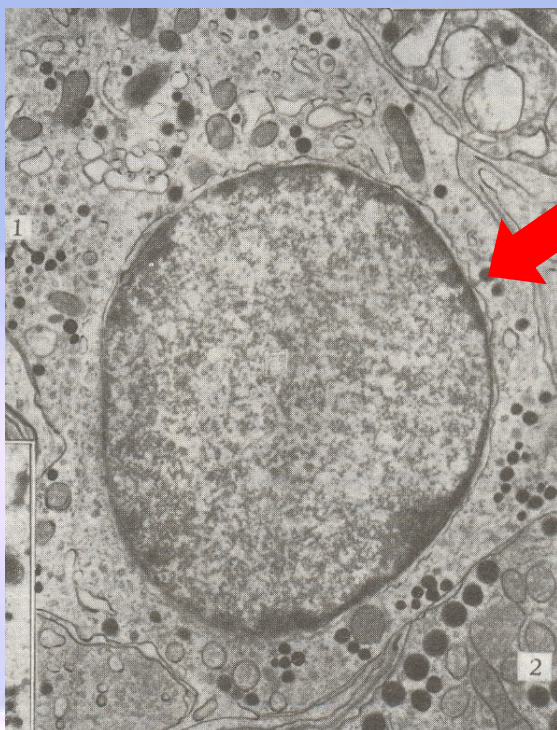
# SCHEMA LIDSKÉ SOMATICKÉ BUŇKY



**cytoplasma s organelami**

**buněčné jádro**

# DEFINICE KLINICKÉ CYTOGENETIKY



DNA rozptýlená v buněčném jádře  
(interfáze)

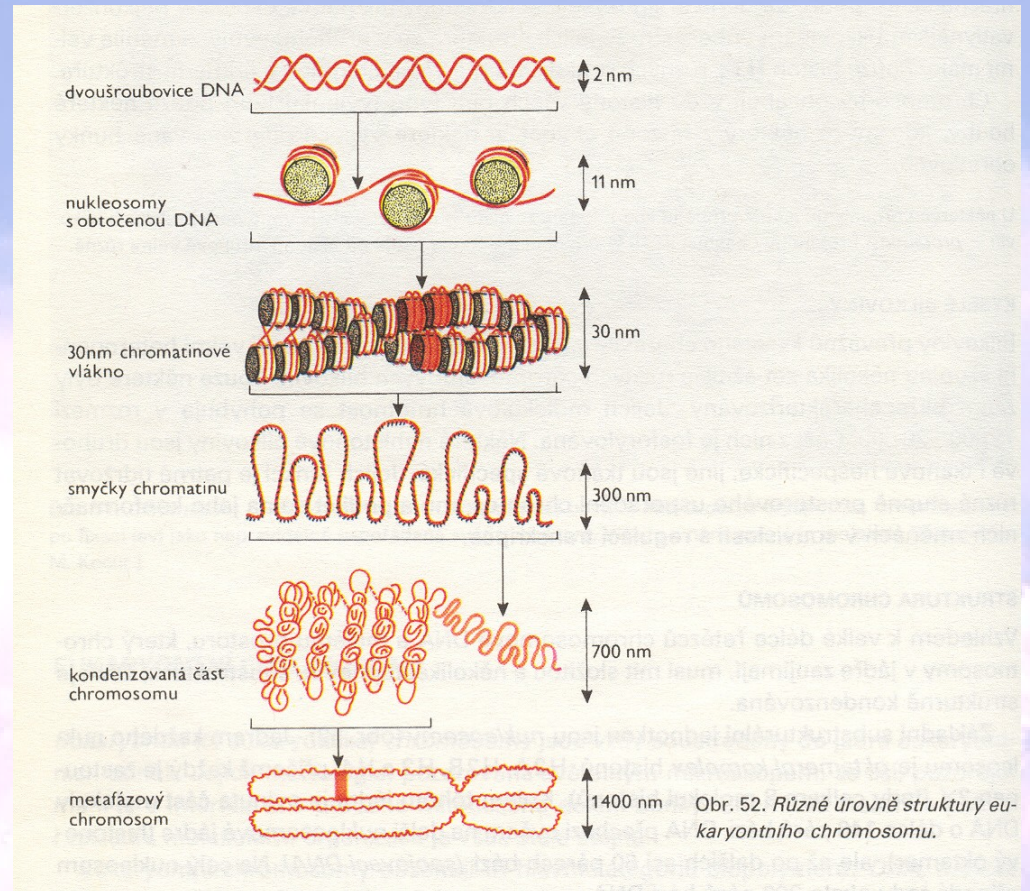


chromosomy = spiralizované molekuly DNA  
počet chromosomů člověka = 46  
(metafáze mitózy)

# CHROMATIN A CHROMOSOMY BĚHEM BUNĚČNÉHO CYKLU

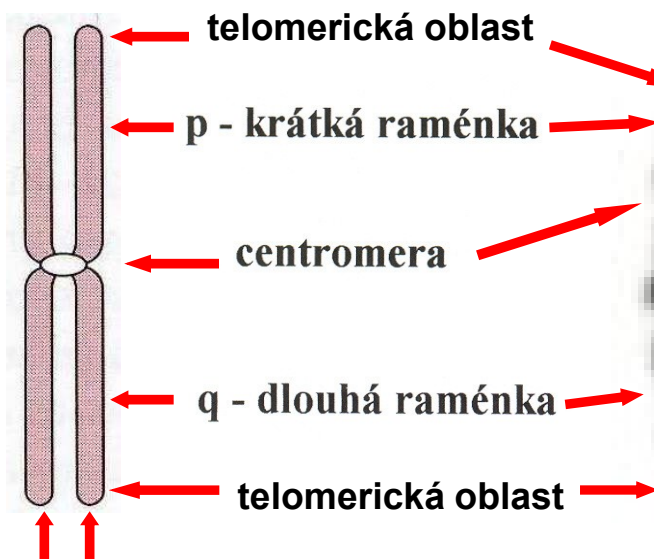
## kondenzace chromatinu, vznik chromosomů

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



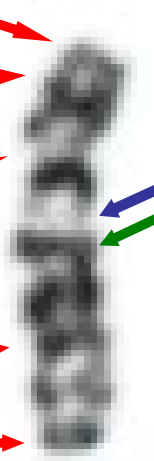
# CHROMOSOMY V PRAXI

schema chromosomu

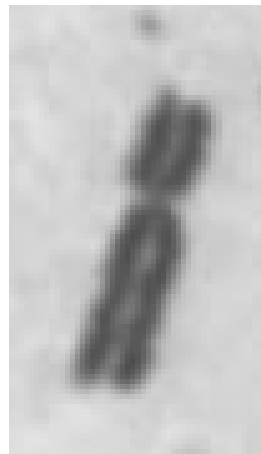


sesterské chromatidy  
(identické kopie)

Chromosom s G- pruhy



Chromosom obarvený po celé délce



dvouchromatidový metafázní chromosom

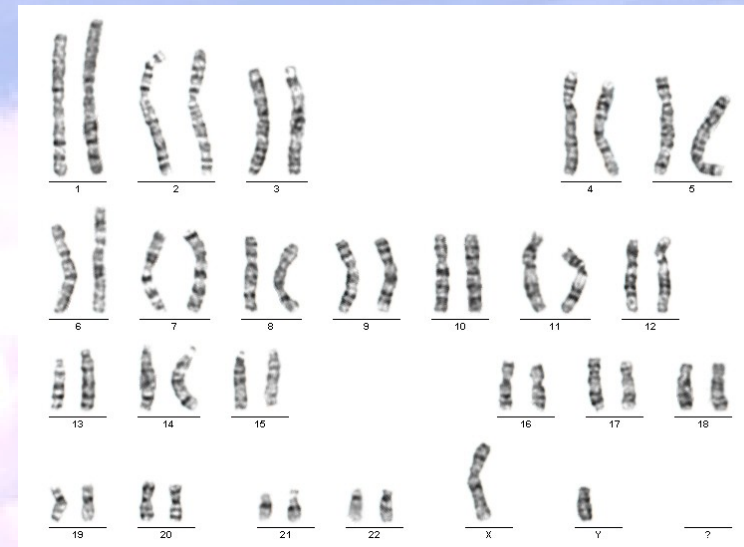
# CHROMOSOM

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

# CHROMOSOMY V PRAXI

## karyotyp

- **soubor chromosomů** jedince nebo buňky, označujeme **počet chromosomů, typ pohlavních chromosomů** a případné **aberrace** (zápis karyotypu např. 46,XY)
- lidský karyotyp se skládá ze **46 chromosomů**, z toho **22 párů autosomů** (nepohlavních chromosomů) a **2 gonosomů** (pohlavních chromosomů)
- chromosomový pár je tvořen **homologními** chromosomy, z nichž jeden je zděděn od otce a druhý od matky, nepárové chromosomy jsou **nehomologní** (somatické diploidní buňky)





# ZÁPIS KARYOTYPU

46,XX - normální ženský karyotyp

46,XY - normální mužský karyotyp

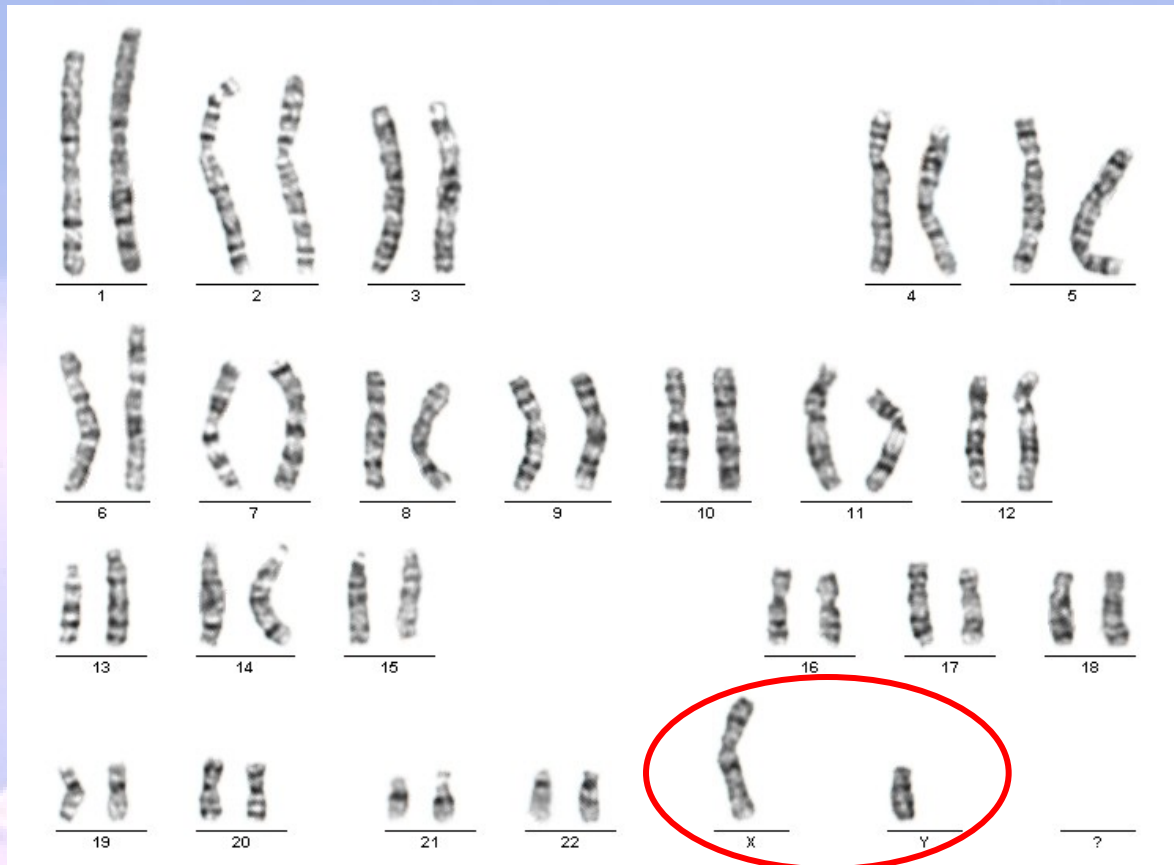
počet chromosomů v jádrech buněk jedince

typ pohlavních chromosomů

# CHROMOSOMY V PRAXI

## normální mužský karyotyp

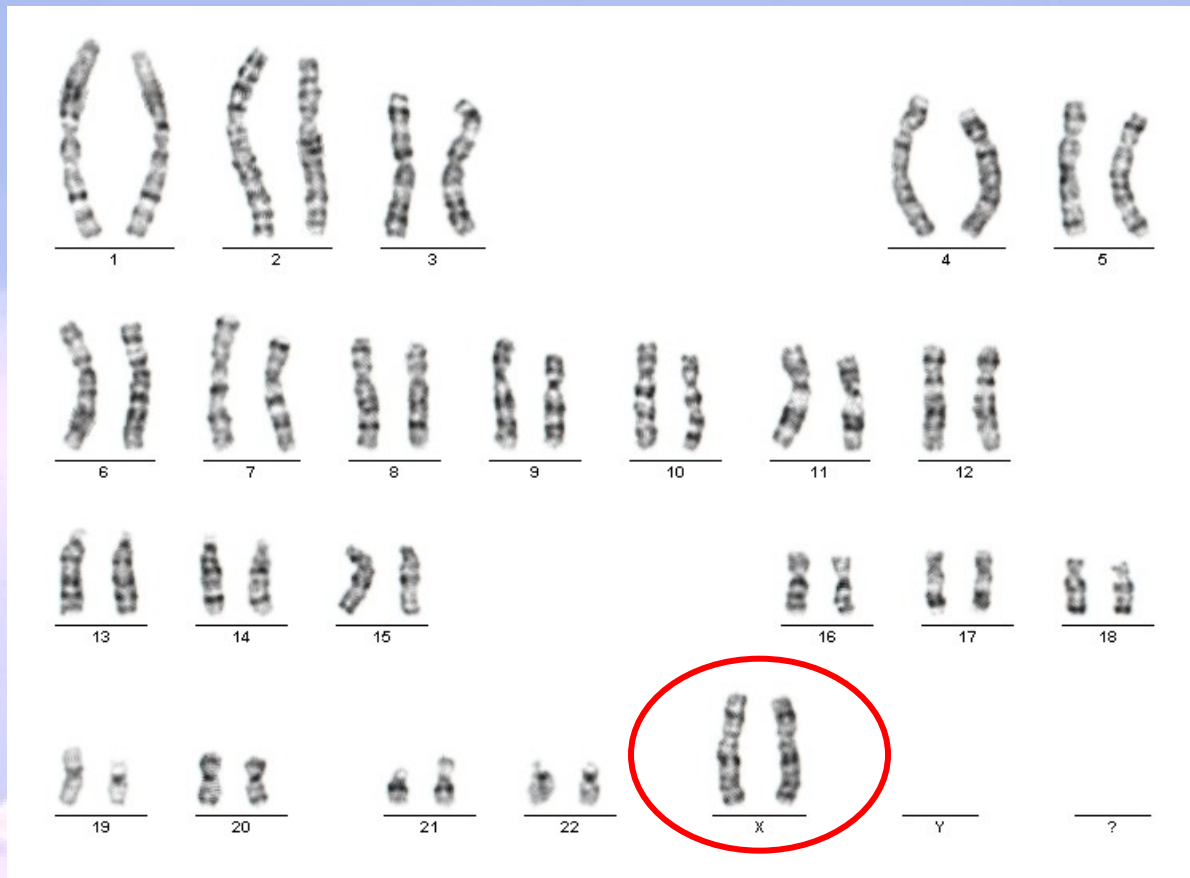
### 46,XY



# CHROMOSOMY V PRAXI

## normální ženský karyotyp

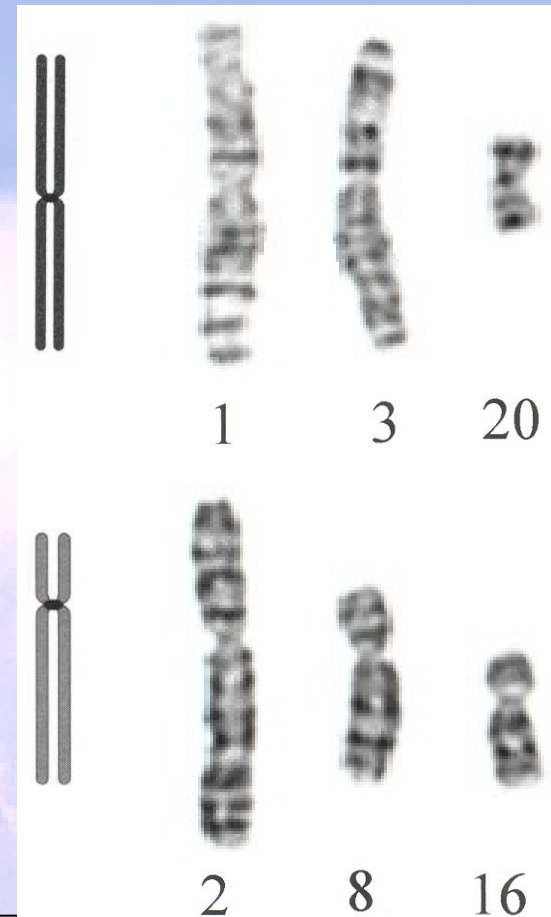
### 46,XX



# CHROMOSOMY V PRAXI

## třídění chromosomů podle umístění centromery

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



# CHROMOSOMY V PRAXI

## třídění chromosomů podle umístění centromery

- **akrocentrické chromosomy**

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 jádérka)



# CHROMOSOMY V PRAXI

## třídění chromosomů do skupin

### podle velikosti a pozice centromery

### normální mužský karyotyp 46, XY



F

vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

- odběr materiálu
- kultivace
- zpracování suspenze
- pruhování / barvení chromosomů

- metody 1. volby v indikovaných případech
- relativně levné metody (ve srovnání s metodami molekulární cytogenetiky)



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## 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)





# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## odběr materiálu



periferní krev



solidní nádor



kostní dřeň

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## odběr materiálu



kůže (potracený plod,  
placenta)



choriové klky



odběr plodové vody pod kontrolou  
ultrazvuku

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY nasazení do kultivačního média

Sterilní práce v laminárním boxu

**!!!!!!STERILNÍ PROSTŘEDÍ!!!!!!**



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## kultivace materiálu

- **délka kultivace**

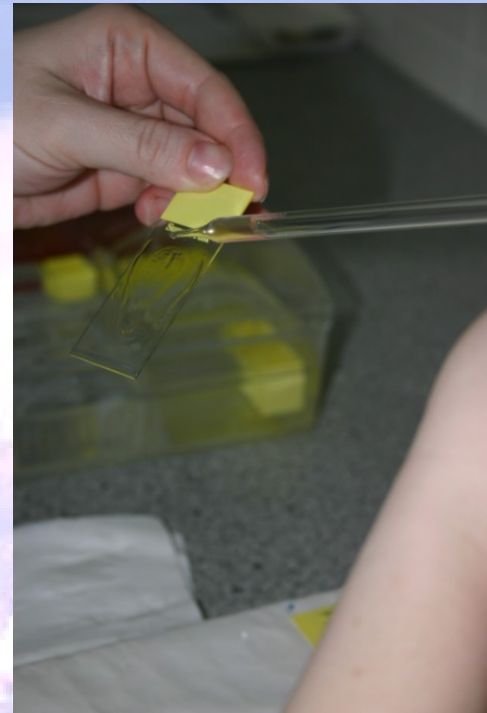
- **periferní krev – 72 hodin (stanovení karyotypu)**
  - **48 hodin (stanovení ZCA)**  
kratší doba kultivace - podmínkou je zachytit 1. buněčné dělení, později dochází k reparaci chromosomů nebo k zániku buněk s aberací
- krev plodu 72 hodin (stanovení karyotypu)
- **plodová voda – průměrně 10 dní (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)



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## zpracování suspenze

- vykapání suspenze na mokrá podložní sklíčka



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

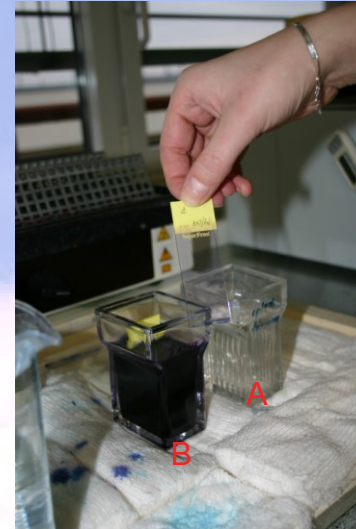
## pruhování chromosomů

### • pruhování chromosomů

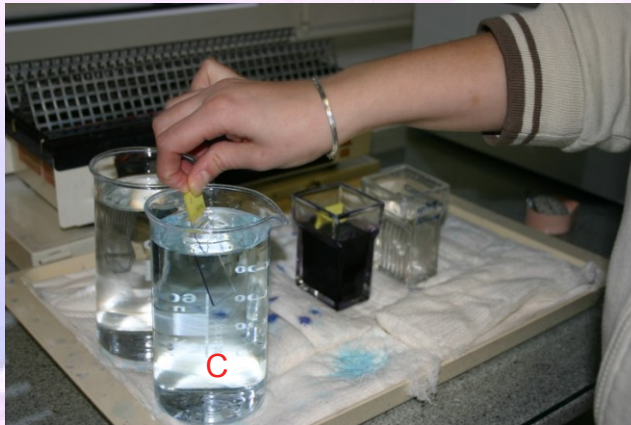
1 – inkubace  
preparátu  
v roztoku  
**trypsinu**  
(dochází  
k **natrávení**  
chromosomových  
proteinů)



2 – oplach  
preparátu  
v Sørensenově  
fosfátovém  
pufru (A),  
barvení  
**barvivem**  
**Giemsa-**  
**Romanowski** (B)



3 – oplach  
ve vodě (C)



4 – sušení  
sklíček  
na sušící  
plotýnce



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## hodnocení

zvětšení přibližně 1000x



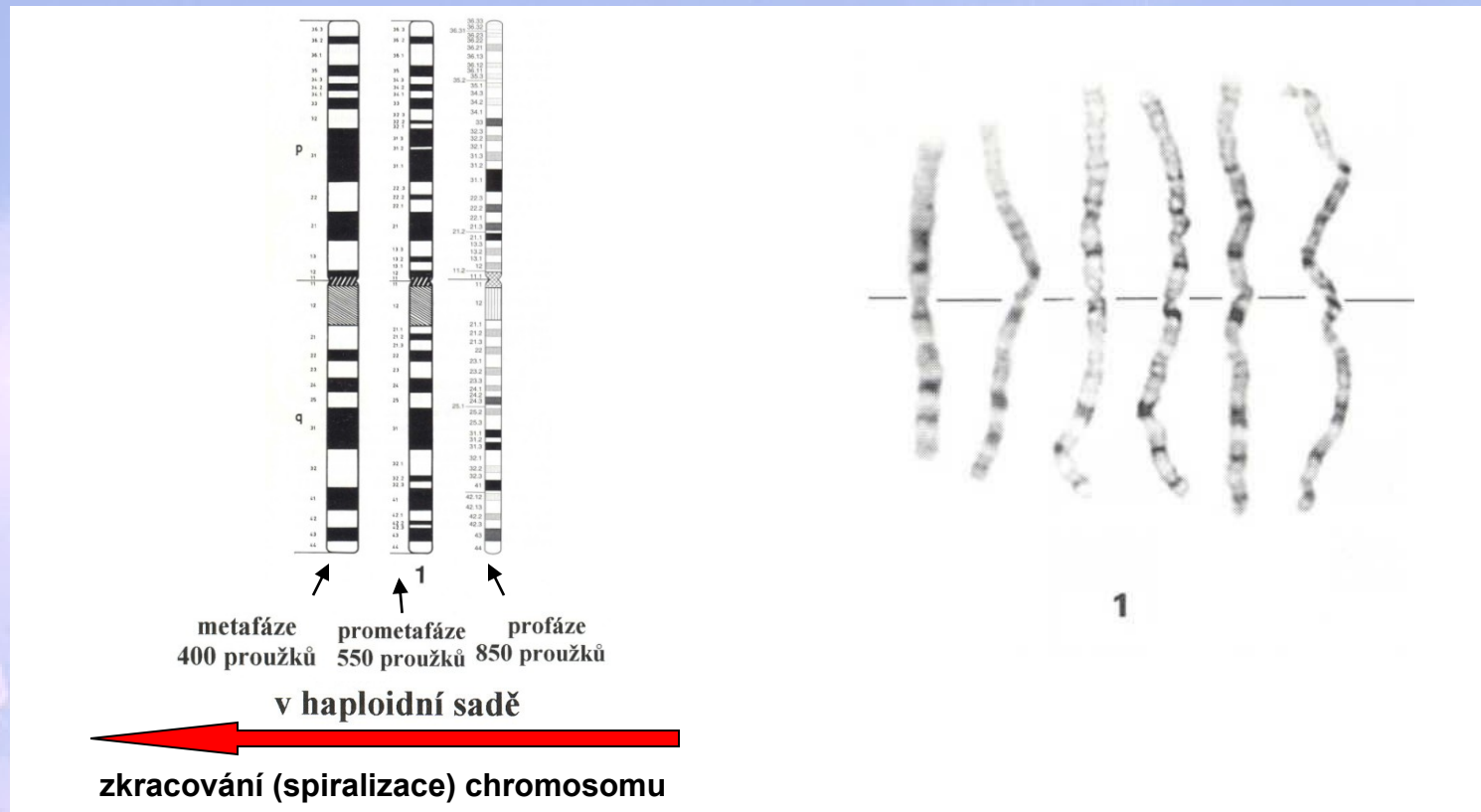
mitóza – proces buněčného dělení

mitóza – soubor chromosomů jednoho  
jádra na podložním sklíčku

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## pruhování chromosomů

G – pruhování chromosomu č. 1 – vzor a reálné chromosomy





# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## pruhování chromosomů

### číslování pruhů na chromosomech

pruhy na každém raménku jsou očíslovány  
vzestupně od centromery k telomeře

s postupnou kondenzací chromosomu  
se zmenšuje počet pruhů

číslo pruhu umožňuje jednoznačnou identifikaci  
každého pruhu



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## význam pruhování chromosomů

- rozeznáme chromosomy podobné morfologie (specifické pruhy každý chromosom)
- lze zkontrolovat genetický materiál chromosomu po celé délce
- zápis strukturních přestaveb – v zápisu strukturní přestavby jsou uvedena čísla pruhů na ramenech chromosomů, které vstoupily do přestavby, ve kterých došlo ke zlomu.



**definován  
rozsah  
a lokalizace  
abnormality**

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

# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## hodnocení

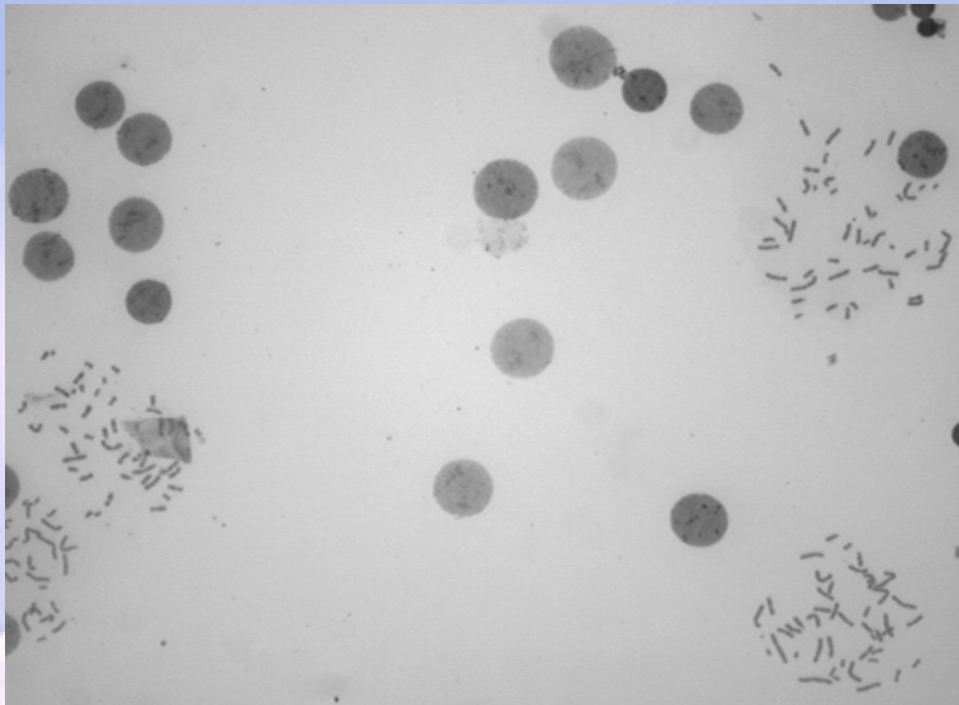
chromosomy hodnotíme ve **světelném mikroskopu** při zvětšení přibližně 1000x za použití imerzních objektivů



# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## hodnocení

zvětšení 100 - 200x  
vyhledávání mitóz



zvětšení přibližně 1000x  
hodnocení

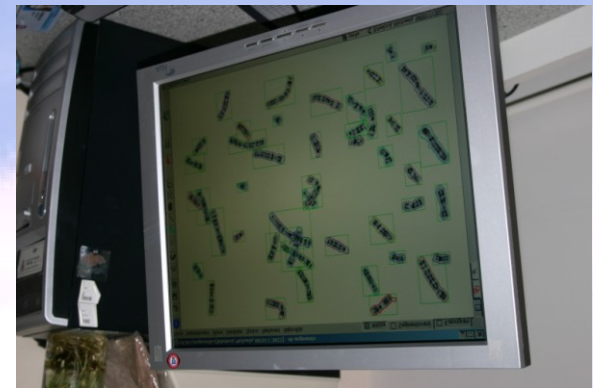


# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## hodnocení

ke třídění chromosomů a sestavení karyotypu lze využít počítačového programu Lucia

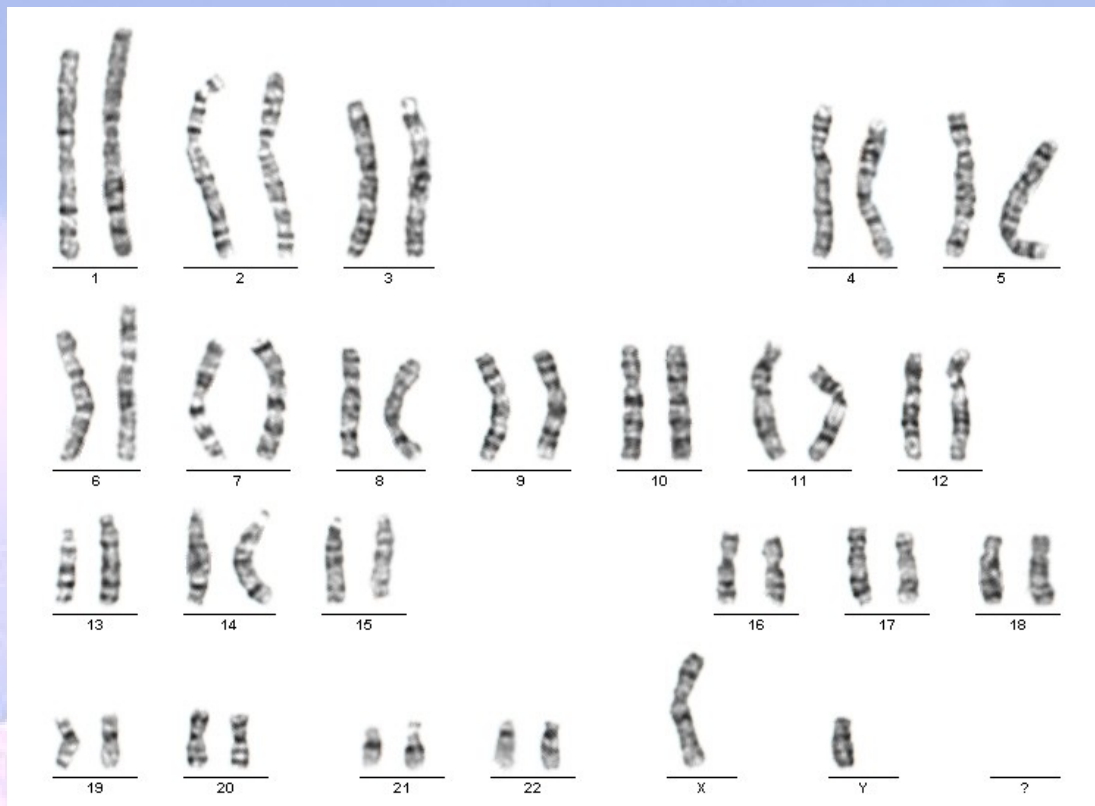
světelný mikroskop  
s CCD kamerou  
napojený na počítač



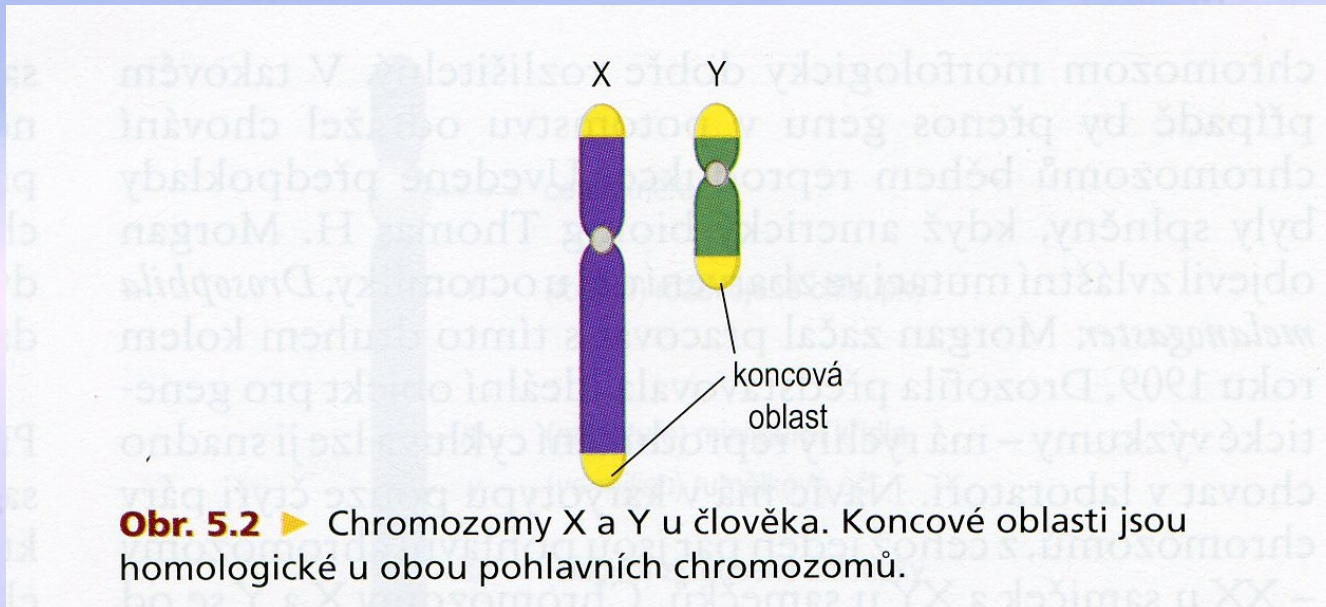
# METODY KLASICKÉ CYTOGENETIKY

## hodnocení

karyotyp setříděný a upravený pomocí počítačového programu Lucia



# GONOSOMY – CHROMOSOMY X, Y



# GONOSOMY – CHROMOSOMY X, Y

## ODLIŠNOSTI MEZI X A Y CHROMOSOMEM:

- odlišná morfologie (Y menší než X, u chromosomu Y centromera blíže ke konci krátkých ramének než u X)
- chromosomy X a Y obsahují jen malé množství homologního genetického materiálu (**PSEUDOAUTOSOMÁLNÍ OBLASTI** + některé geny mimo pseudoautosomální oblasti)

## ODLIŠNOST MEZI CHROMOSOMY X A Y A AUTOSOMY:

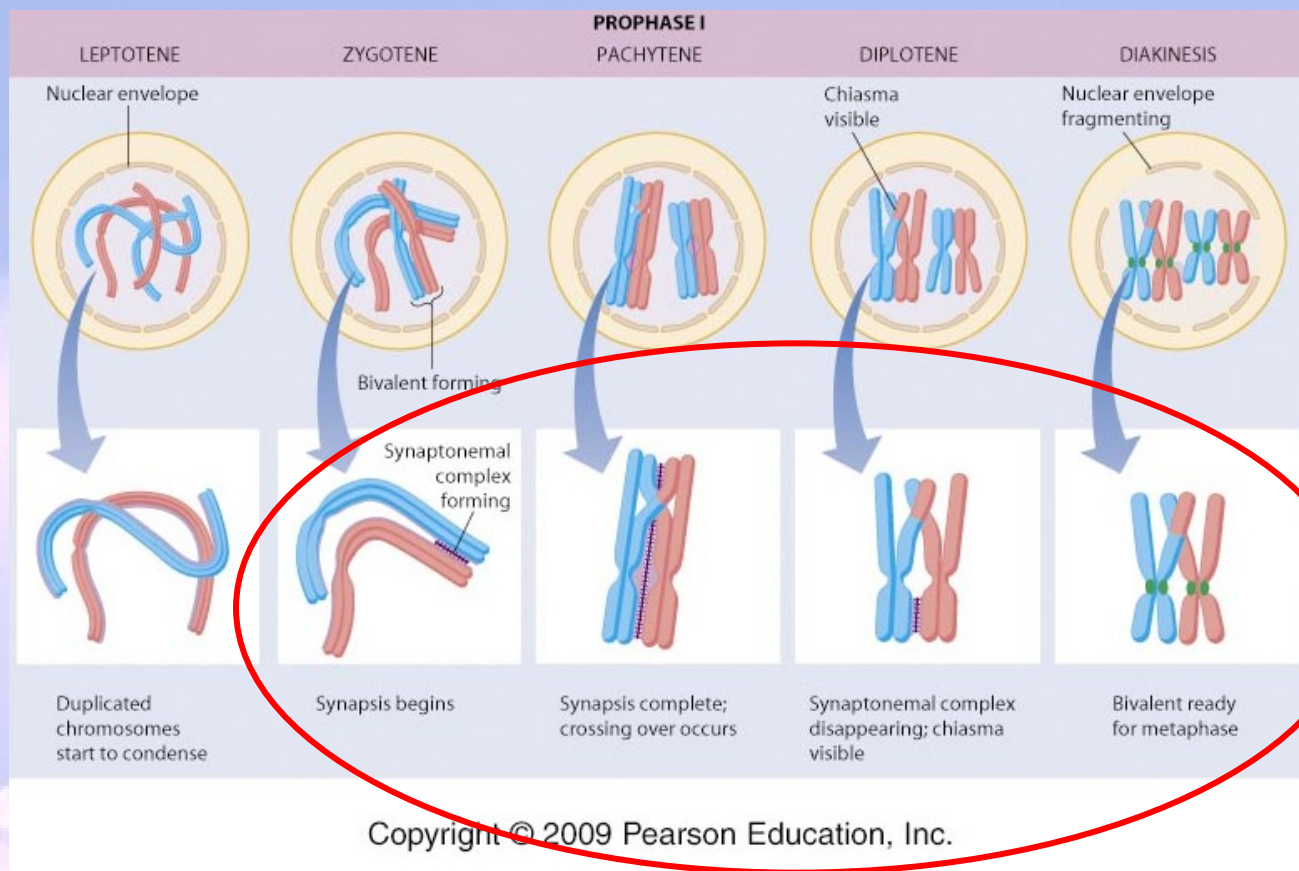
- u autosomů dochází v profázi meiózy I k párování **homologních chromosomů po celé jejich délce** a k výměně genetického materiálu mezi **nesesterskými** chromatidami homologních chromosomů (rekombinace genetického materiálu (crossing over))  
význam – zvýšení genetické variability
- u chromosomů X a Y dochází k párování pouze v **pseudoautosomálních (homologních) oblastech** (na koncích krátkých a dlouhých ramének)





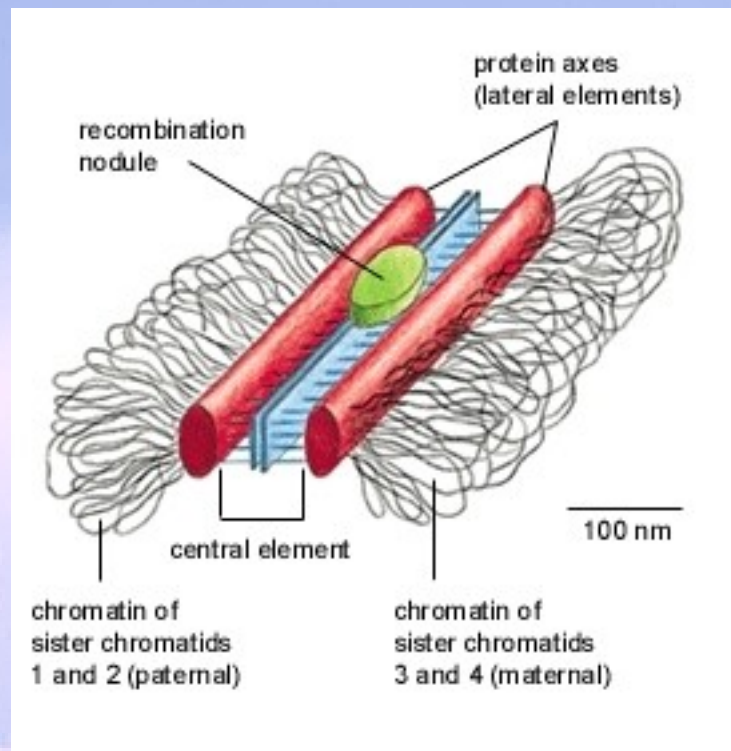
# AUTOSOMY – crossing over

(párování po celé délce chromosom v profázi meiózy I  
- proces vzniku spermií)



# AUTOSOMY – crossing over

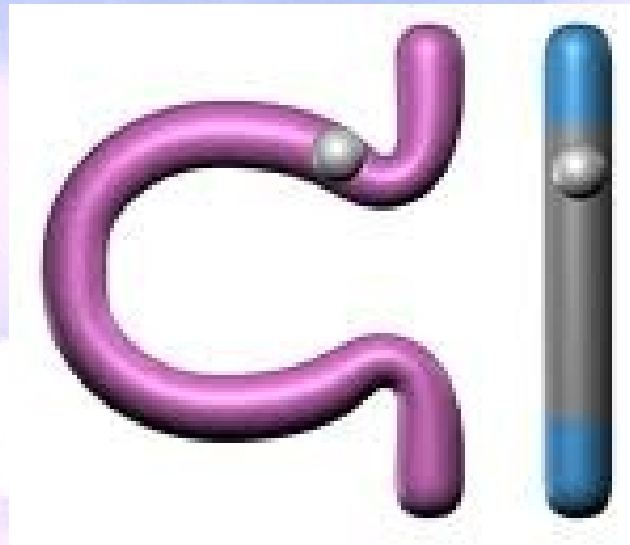
(párování po celé délce chromosomů v profázi meiózy I  
- párování homologních úseků)



# CHROMOSOMY X, Y – crossing over

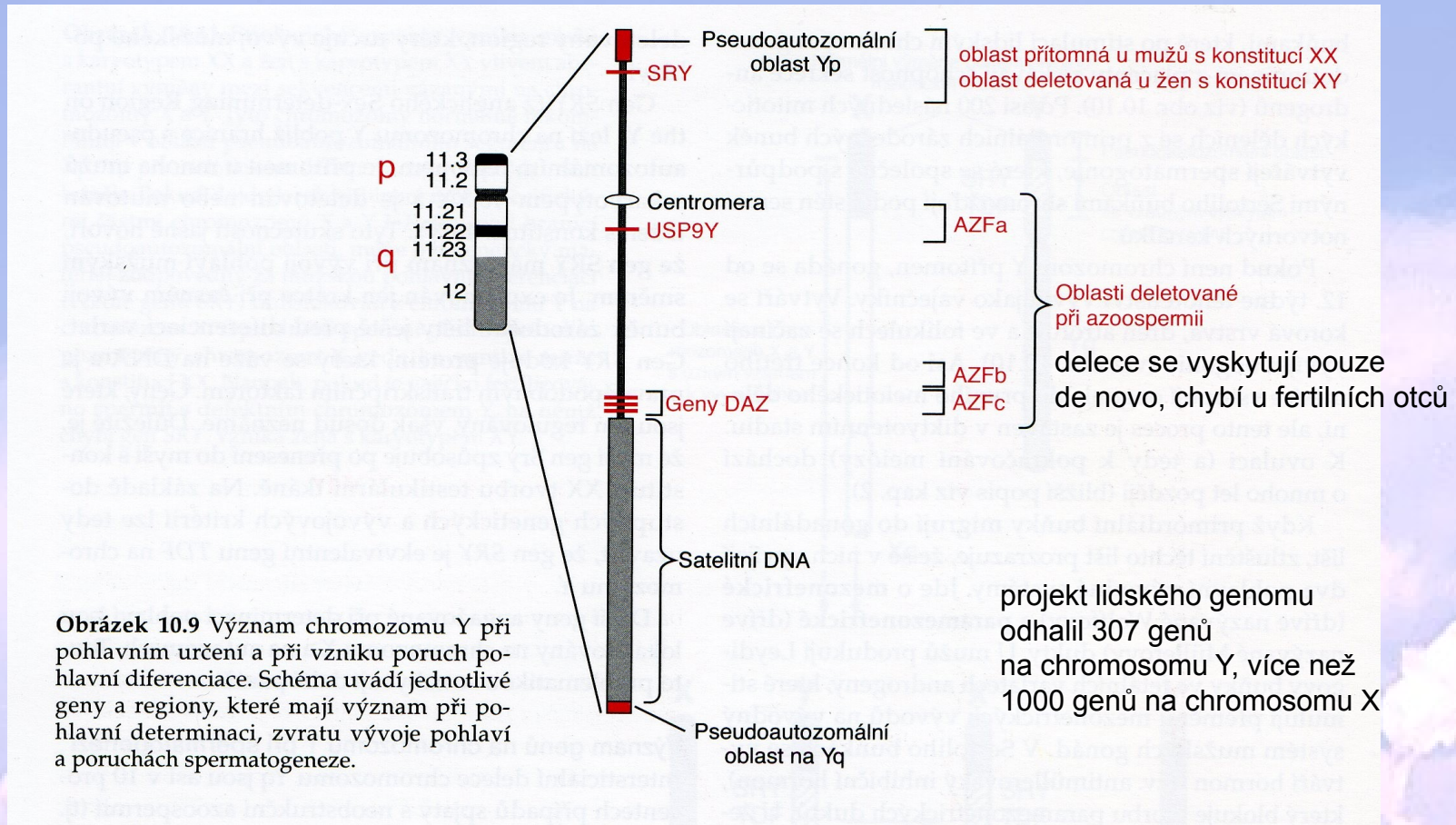
(párování pouze v pseudoautosomálních oblastech v profázi meiózy I u mužů – párování homologních úseků)

k párování v meióze I dochází pouze v pseudoautosomálních oblastech na koncích krátkých a dlouhých ramen chromosomů X a Y



dědičnost genů v pseudoautosomálních oblastech připomíná dědičnost autosomálních genů – pseudoautosomální dědičnost

# CHROMOSOM Y

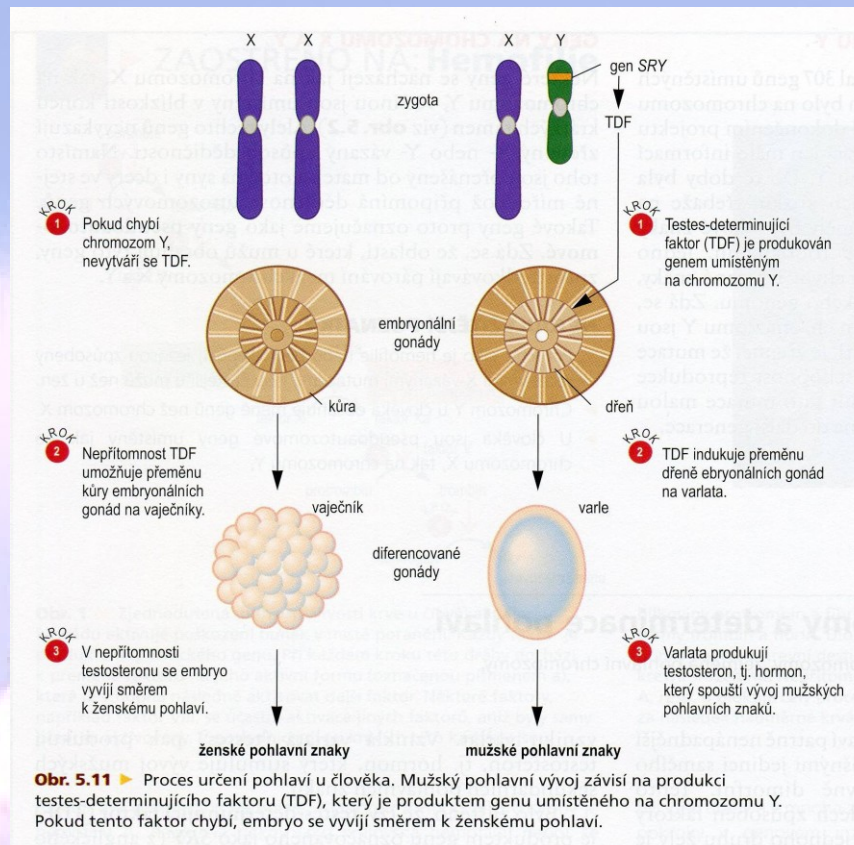


**Obrázek 10.9** Význam chromozomu Y při pohlavním určení a při vzniku poruch pohlavní diference. Schéma uvádí jednotlivé geny a regiony, které mají význam při pohlavní determinaci, zvratu vývoje pohlaví a poruchách spermatogeneze.

gen SRY – „sex determining region Y“ – produktem je testes determinující faktor (TDF)

# CHROMOSOM Y

pohlaví u člověka je určeno přítomností či absencí chromosomu Y, chromosom řídí vývoj primordiálních gonád směrem ke vzniku testes

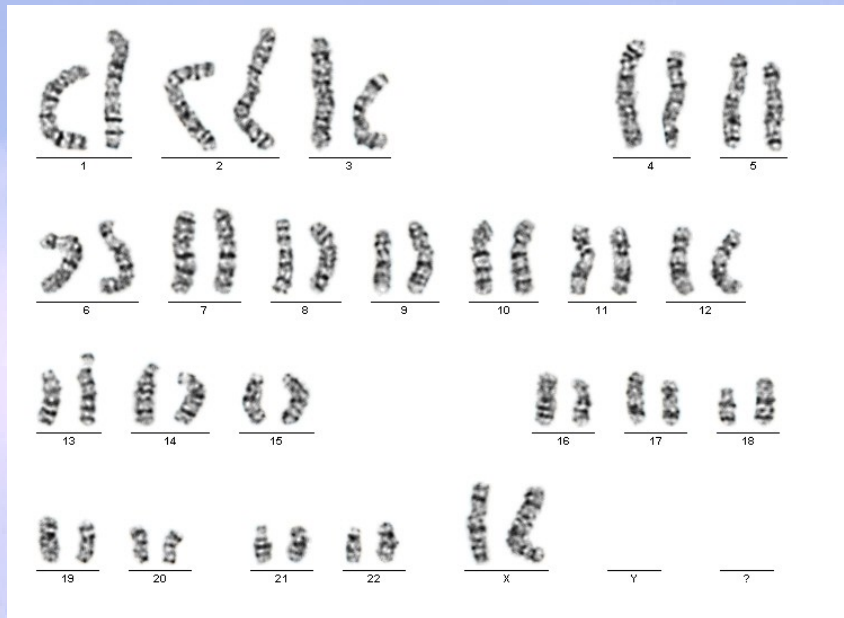


# Nesoulad mezi typem pohlavních chromosomů v karyotypu a pohlavím pacienta

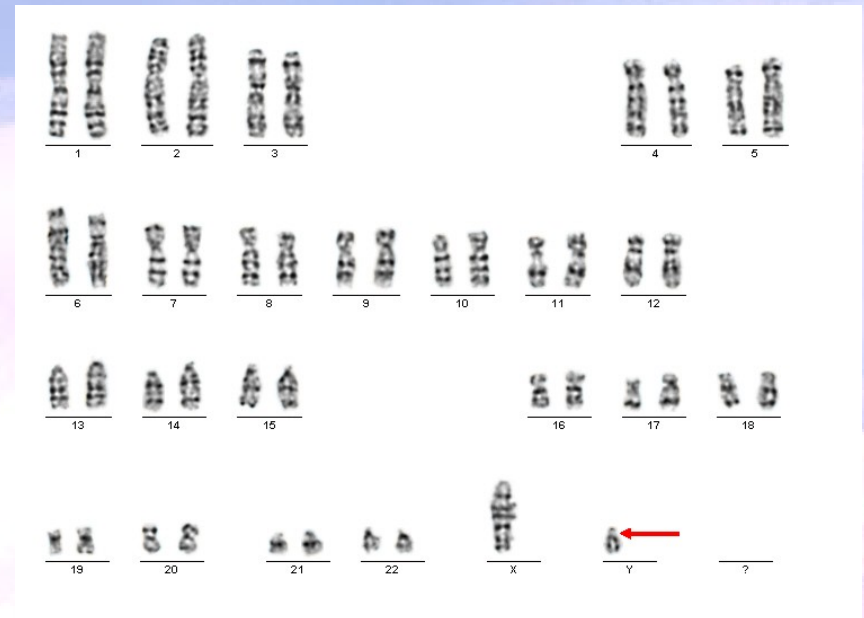
**46,XYfemale**

**46,XXmale**

# Nesoulad mezi typem pohlavních chromosomů v karyotypu a pohlavím pacienta



46,XXmale



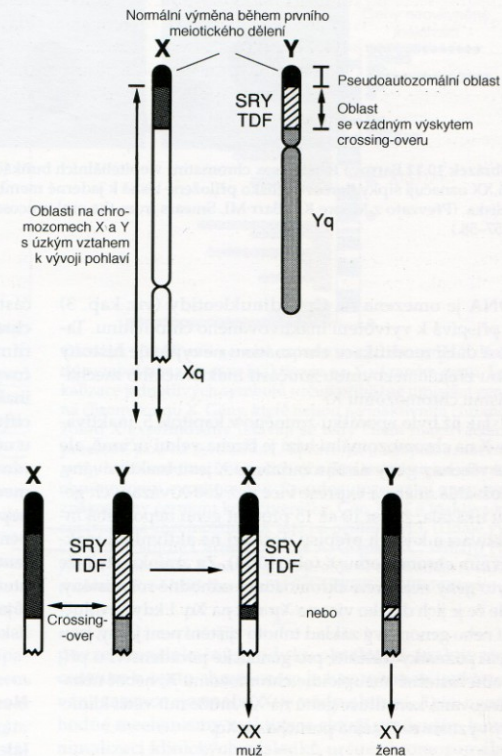
46,XYfemale

# 46,XY female; 46,XX male vznik fenotypů může mít spojitost

vznik v důsledku **abnormální rekombinace** mezi Xp a Yp v zárodečných buňkách otce, dochází k **přenosu genu SRY na chromosom X / ztráta genu SRY na chromosomu Y**

(gen SRY je lokalizován v blízkosti pseudoautosomální oblasti na Yp, obvykle do rekombinace zahrnován nebývá, normální rekombinace se týká pouze pseudoautosomálních oblastí)

**Obrázek 10.11** Etiologické aspekty vzniku mužů s karyotypem XX a žen s karyotypem XY vlivem aberrantní výměny mezi sekvencemi vázanými na chromozomy X a Y. Tyto chromozomy normálně rekombinují v oblasti pseudoautosomálního segmentu na Xp/Yp při meiotickém dělení mužských pohlavních buněk. Pokud dojde k rekombinaci mezi specifickými částmi chromozomů X a Y ležícími pod hranicí pseudoautosomální oblasti, může být genetický materiál zodpovědný za mužskou pohlavní diferenciaci (včetně genu SRY) translokován z chromozomu Y na chromosom X. Oplodnění spermií obsahující takto pozměněný chromosom X vede ke vzniku muže s konstitucí XX. Naopak, pokud je vajíčko fertilizováno spermií s defektním chromozomem Y, na němž chybí gen SRY, vzniká žena s karyotypem XY.



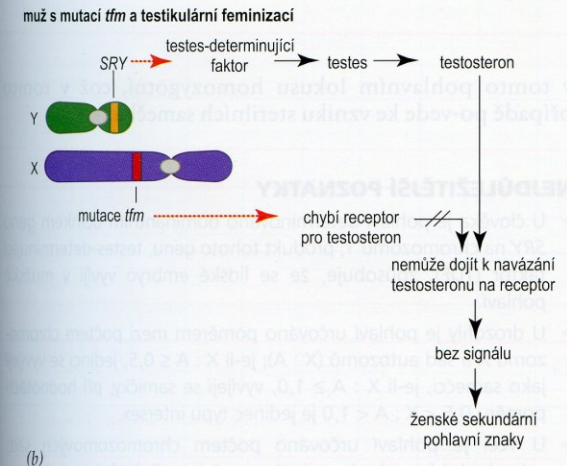
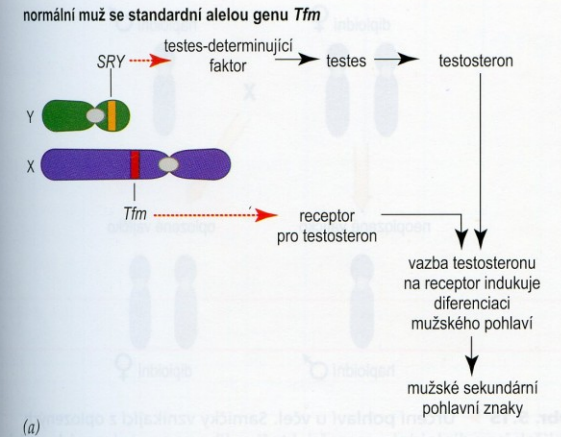


# 46,XYfemale – další možnosti vzniku

- mutovaný SRY gen (ztráta funkce, abnormální funkce)
- mutace jiných genů na jiných chromosomech nebo chromosomové změny
  - delece či mutace v genu Tfm na chromosomu X – syndrom testikulární feminizace (viz obrázek)
  - duplikace části Xp v oblasti Xp21 s lokalizací genu DAX1 – transkripční faktor, hraje roli při určení pohlaví, působení je závislé na genové dávce (nadbytek SRY produktu – tvorba varlat, nadbytek produktu DAX1 – tvorba vaječníků)
  - mutace na autosomech
    - chromosom 17q gen SOX9, gen nezbytný pro tvorbu varlat
    - chromosom 9 pruh p24, gen DMRT1 delece – oblast nezbytná pro normální vývoj mužského pohlaví
    - chromosom 11 pruh p13 gen WT1 – dominantní mutace vede k výrazné poruše vývoje testikulární tkáně (ženský nebo obojetný genitál)
    - a další (pseudhermafroditismus...)

# 46,XY female – další možnosti vzniku

delece či mutace genu *Tfm* na chromosomu X – kóduje receptory pro testosteron – **rezistence cílových orgánů k androgenům** (SRY gen přítomen a je funkční) – **syndrom testikulární feminizace (androgen insensitivity syndrome)** – ženský fenotyp, přítomny testes v malé pánvi, predispozice k malignímu zvrhnutí



**Obr. 5.13** ▶ Testikulární feminizace, odchylka způsobená X-vázanou mutací *tfm*, která zabraňuje produkci testosteronových receptorů. (a) Normální muž. (b) Feminizovaný muž s mutací *tfm*.

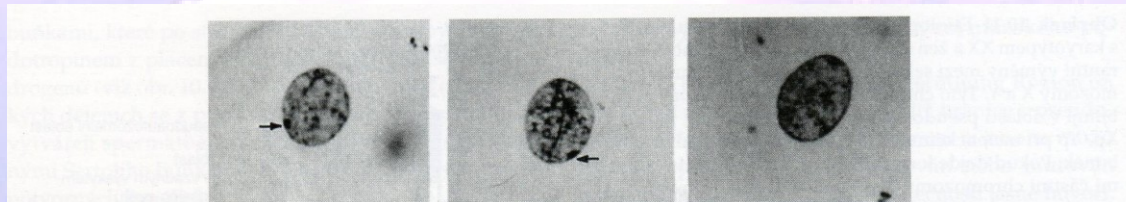
# CHROMOSOM X

- normální ženský karyotyp – 2 chromosomy X
- normální mužský karyotyp – 1 chromosom X

autosomy – každý gen přítomen ve 2 kopiích, odchylky mohou vést k abnormálnímu fenotypu, v některých případech ke smrti jedince

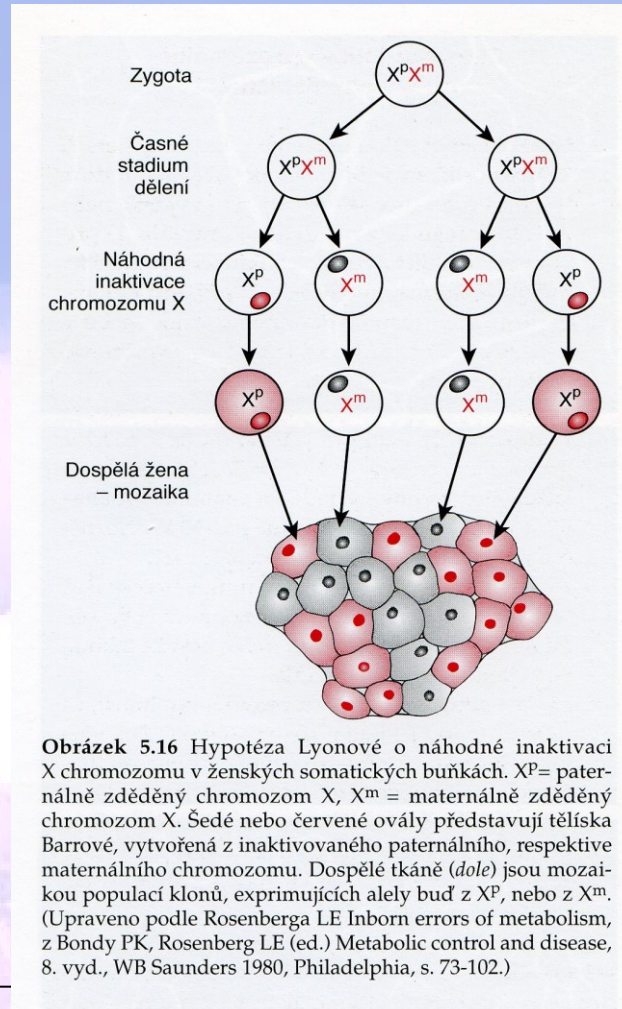
**kompence** rozdílu v počtu kopií X vázaných genů (**dávky genových produktů**)  
u žen – **náhodná inaktivace jednoho X chromosomu (lyonizace)**  
(Mary Lyonová 1961)

- jeden chromosom X se stává transkripčně inaktivním, v interfázních jádrech je viditelný v podobě Barrova tělíska (heterochromatin, sex chromatin) (Murray Barr)



Obrázek 10.12 Barrova tělíska (sex chromatin) v epiteliálních buňkách lidské ústní sliznice. U ženských buněk s karyotypem 46,XX označují šípky Barrovo tělísko přiložené těsně k jaderné membráně. Mužská buňka (vpravo) neobsahuje žádné Barrova tělíska. (Převzato z Moore KL, Barr ML Smears from the oral mucosa in the determination of chromosomal sex. Lancet 1955; 2:57–58.)

# CHROMOSOM X

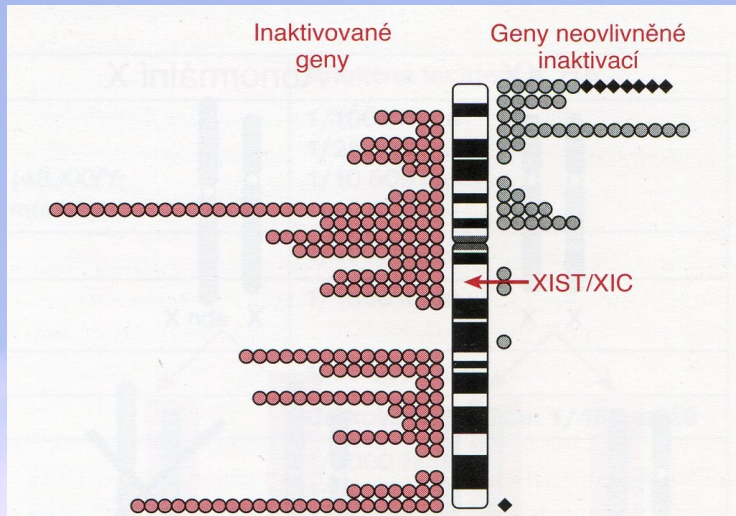


# CHROMOSOM X

- k inaktivaci jednoho X chromosomu dochází v časném stádiu vývoje embrya
- inaktivace chromosomu maternálního či paternálního původu je náhodná (tkáně – mozaika populací klonů, které exprimují alely genů buď z paternálního nebo maternálního chromosomu X)
- jakmile k inaktivaci dojde, jedná se o jev trvalý (v somatických buňkách) a všechny buňky, které vzniknou dělením buňky mateřské, mají inaktivovaný stejný chromosom X
- v zárodečné linii je inaktivovaný X chromosom reaktivován (pravděpodobně důležité pro úspěšné dokončení oogeneze)
- u karyotypů s početními aberacemi – nadbytečnými chromosomy X – jsou vždy všechny X chromosomy, kromě jednoho, inaktivovány, každý X chromosom může tvořit samostatné Baarovo tělísko nebo mohou vytvářet jen 1



# CHROMOSOM X



**Obrázek 10.14** Profil genové exprese na chromozomu X. Každý symbol ukazuje stav inaktivace na X-vázaném genu. Lokalizace jednotlivých symbolů určují přibližné umístění genu na chromozomu X. Geny, které nejsou na inaktivním chromozomu X exprimovány (stávají se tedy cílem inaktivačních procesů), jsou na levé straně. Vpravo jsou naopak označeny geny, které inaktivaci nepodléhají a jsou tedy i na inaktivním chromozomu exprimovány. Pseudoautozomální geny jsou znázorněny černými kosočtverečky. Gen *XIST* a inaktivační centrum na chromozomu X leží na pruhu Xq13. (Údaje vycházejí ze studie Carrel L, Cottle A, Goglin KC, Willard HF A first-generation X inactivation profile of the human X chromosome. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:14440–14444.)

na inaktivovaném X chromosomu je inaktivována většina **genů**, ale **některé zůstávají aktivní** (10 – 15% genů), k jejich přepisu dochází na inaktivovaném i neinaktivovaném chromosomu, více je jich lokalizováno na **Xp**

význam – kompenzace genové dávky (geny, které mají kopii na chromosomu Y (v pseudoautosomálních oblastech i mimo ně), které jsou u žen exprimovány ve vyšší míře než u mužů)

- **klinický význam – vysvětlení fenotypu Turnerova syndromu (a dalších abnormalit vedoucích k podobnému fenotypu – delece Xp) – nesprávná dávka genů**

X inaktivační centrum (**XIC**) – oblast, která zahrnuje **gen XIST** (lokalizace Xq13) – klíčový regulační lokus X inaktivace

# CHROMOSOM X

náhodná inaktivace chromosomu X

## nenáhodná inaktivace chromosomu X – speciální případy

- nebalancovaná strukturní aberace chromosomu X (delece, duplikace, izochromosomy) – **preferenční inaktivace strukturně abnormálního chromosomu**
- balancovaná translokace chromosomu X s autosome – **normální X chromosom je preferenčně inaktivován** (při inaktivaci X s translokací by došlo k inaktivaci autosomálního úseku a k projevu abnormálního fenotypu jako u nebalancovaného karyotypu)
- **nebalancovaný karyotyp** (část chromosomu X zahrnující oblast XIC, na němž je translokována část autosomu) – potomci přenašeče balancované translokace X chromosomu s autosome – **postižený chromosom vždy inaktivován**

**klinický význam – minimalizace následků chromosomové poruchy**



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# CHROMOSOM X

Možné negativní klinické důsledky preferenční inaktivace normálního X chromosomu u přenašečů balancované translokace

- v **místě zlomu** u translokace chromosomu X s autosomem dojde k **přerušení genu a jeho inaktivaci** – v důsledku inaktivace normálního X chromosomu se ve fenotypu pacienta projeví **ztráta funkce genu**

exprese X vázaných znaků u žen, které se obvykle projevují jen u mužů

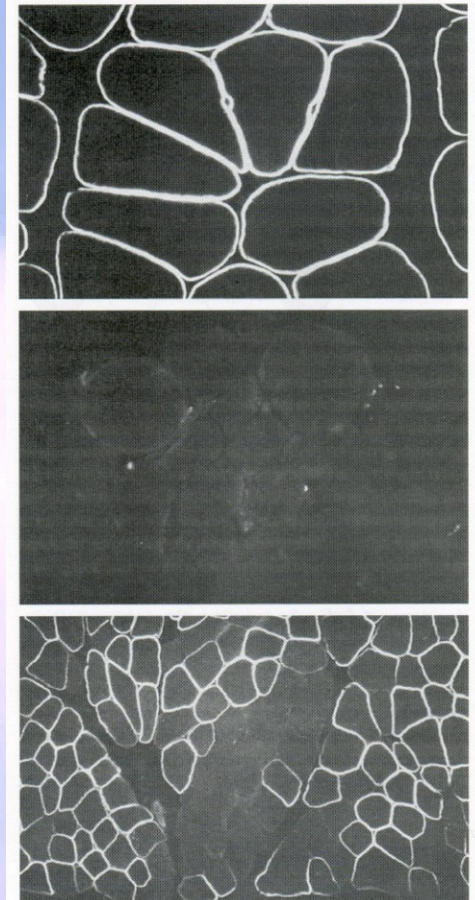


# CHROMOSOM X

## **důsledek inaktivace X chromosomu – variabilita exprese X vázaných genů u žen heterozygotek (přenašeček genu pro X vázané onemocnění)**

Funkční mozaicismus v důsledku inaktivace X chromosomu, který nese mutantní alelu genu nebo který nese zdravou alelu (v různých tkáních různý poměr); je možná i extrémní (asymetrická) inaktivace (od normálního stavu (asymptomatické heterozygotky) po úplnou manifestaci onemocnění (manifestující heterozygotky).

rozdíl mezi autosomální a X – vázanou dědičností – u mužů je alela na chromosomu X vždy exprimována (může být mutantní) (1 chromosom X), u žen může být exprimována jen v určitém %



Obrázek 5.17 Imunologické barvení na dystrofin v svalových vzorcích.

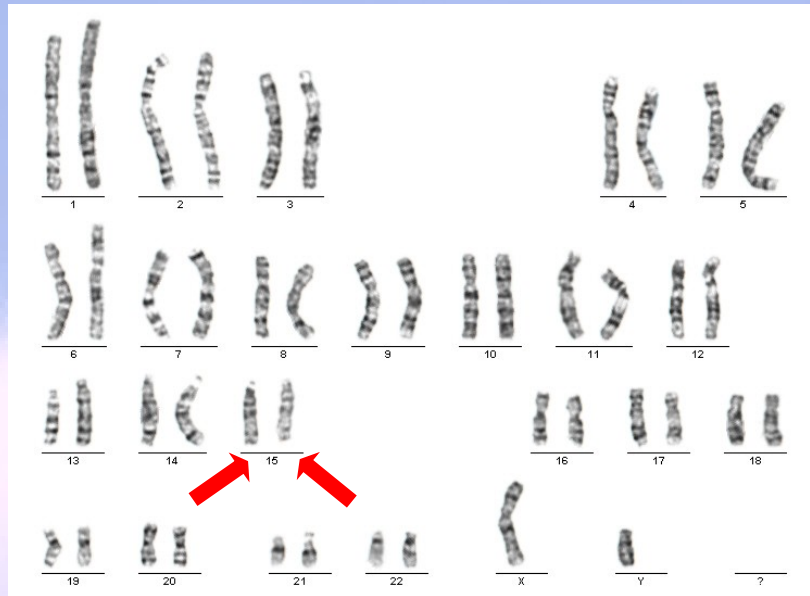
*Nahoře* – normální žena (zvětšení 480x)

*Uprostřed* – muž s DMD (zvětšení 480x)

*Dole* – přenašečka (zvětšení 240x)

Sval pacientů s DMD se nebarví na dystrofin. Sval přenašečky má pozitivní i negativní místa dystrofinového imunobarvení, což odráží X inaktivaci. (Fotografie použita s laskavým svolením K Arahata, National Institute of Neuroscience, Tokyo.)

# CHROMOSOMY V PÁRU (HOMOLOGNÍ CHROMOSOMY)



- jeden chromosom pochází od jednoho, druhý od druhého rodiče
- abnormalita s klinickými důsledky (postižení jedince) – **chromosomy v páru jsou zděděny od 1 rodiče (uniparentální disomie)** – abnormalitu nelze prokázat vyšetřením karyotypu, ale molekulárně genetickými metodami

# UNIPARENTÁLNÍ DISOMIE (UPD) klinický význam

## chromosomy v páru zděděny od stejného rodiče genomový imprinting

- existují **rozdíly v genové expresi** mezi alelami, které se nacházejí na chromosomech, zděděných od otce a od matky – jsou důsledkem genomového imprintingu (**metylace** chromatinu, různý metylační vzor na chromosomu mateřského a otcovského původu, **dochází k ovlivnění exprese genů**, nedochází ke změně sekvence DNA) – genová exprese párových chromosomů se vzájemně doplňuje, společně se podílejí na vzniku normálního fenotypu jedince
- párové chromosomy pocházejí od stejného rodiče – mají **stejný metylační vzor** – **abnormální fenotyp** (např. syndrom Prader Willi / Angelman, chromosom 15 – uniparentální disomie simuluje mikrodeleční syndrom, geny se neexprimují buď v důsledku chybění oblasti (delece) nebo zametylování (inaktivace) stejné oblasti na obou párových chromosomech – **chybí funkční (nezametylovaná) alela od druhého rodiče**)
- imprinting je reverzibilní – **v germinální linii** v procesu vzniku gamet dochází ke změně imprintingu – **podle pohlaví rodiče**

mechanismy vzniku – „**trisomy rescue**“ (ztráta nadbytečného chromosomu v buňkách embrya), „**monosomy rescue**“ (duplikace přítomného chromosomu)

## nemendelovská dědičnost



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# UNIPARENTÁLNÍ DISOMIE (UPD) klinický význam

## Klinické důsledky UDP:

- homozygotita autosomálně recesivních genů s mutací
- přenos X – vázaných genů s mutací z otce na syna
- homozygotita X vázaných genů s mutací u žen
- klinické projevy související s abnormálním imprintingem



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# Doporučená literatura

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



Vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno



**Děkuji za pozornost**

