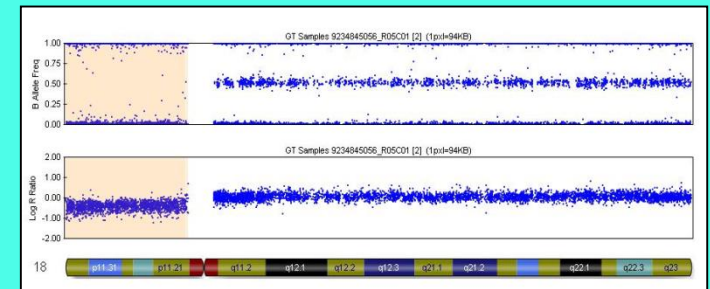
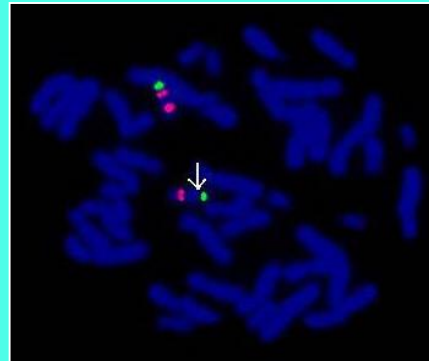


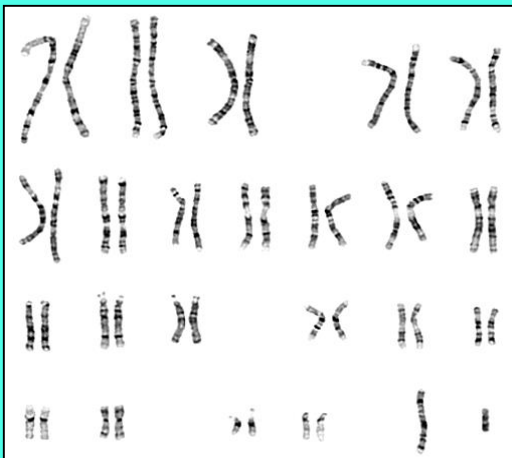
Struktura a funkce chromosomů eukaryot

Karyotyp člověka a metody jeho vyšetření

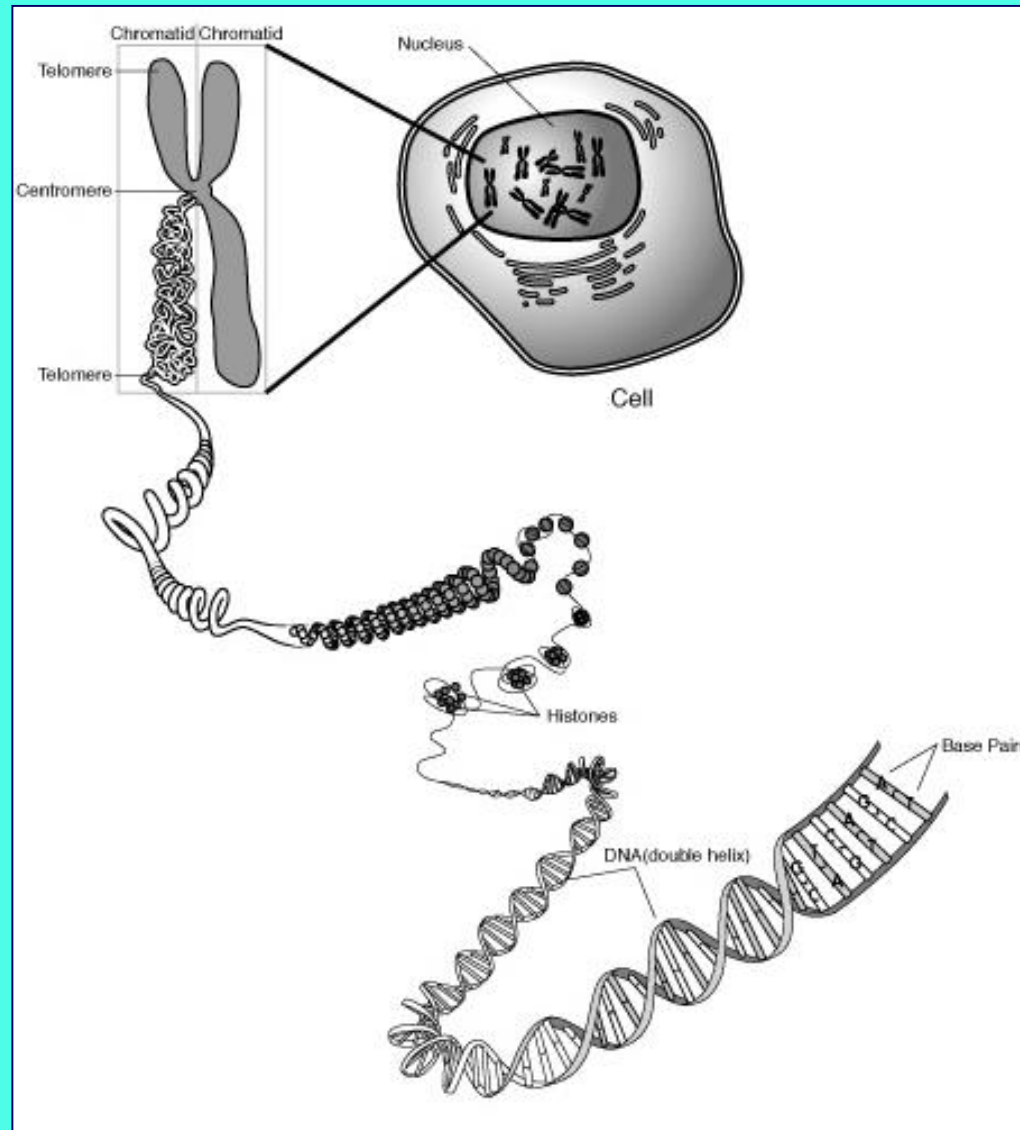


ÚSTAV BIOLOGIE A LÉKAŘSKÉ GENETIKY 1. LF UK

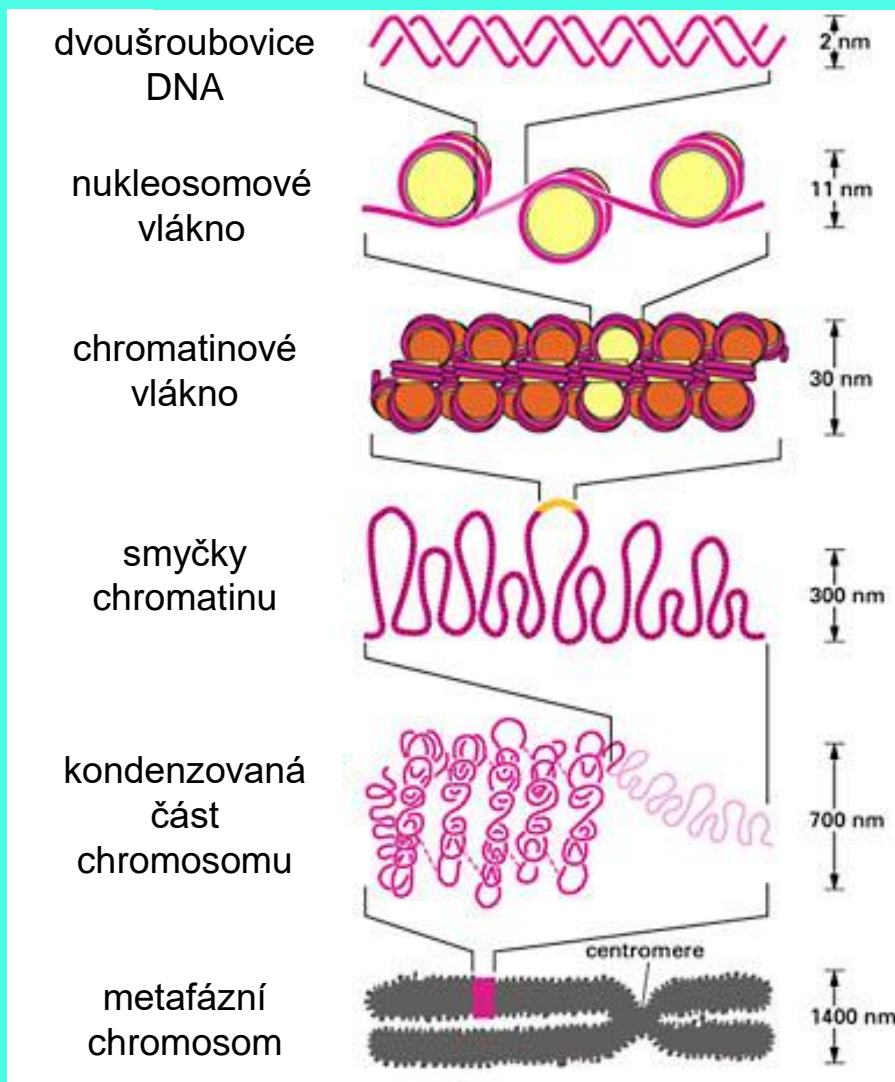
1. ROČNÍK – VŠEOBECNÉ LÉKAŘSTVÍ



struktura chromosomu



struktura chromosomu



Mitotický chromosom
– 50 000x kratší než
despiralizovaná forma

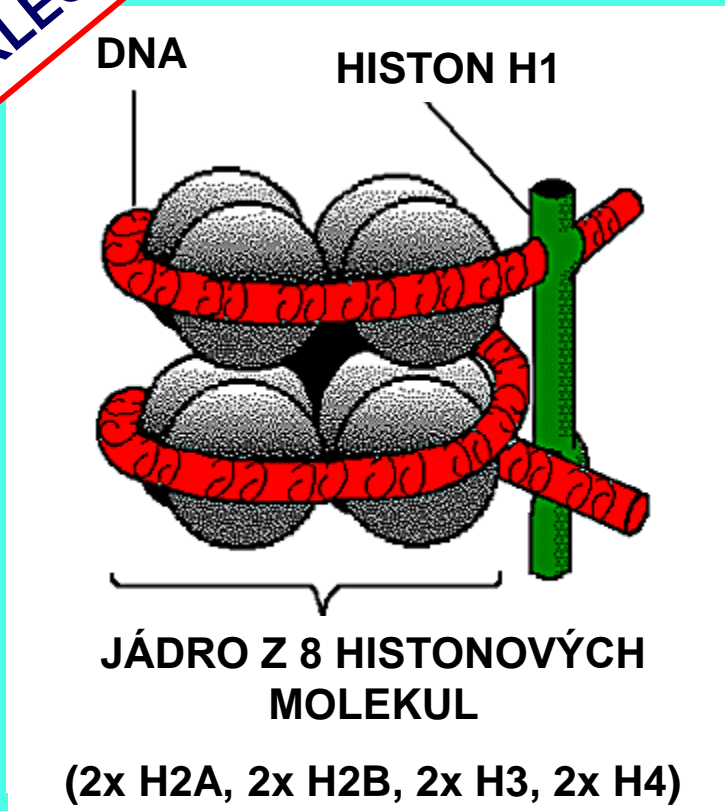
U člověka

– cca 2 metry DNA
v jedné buňce

= 2 x 23 chromosomů

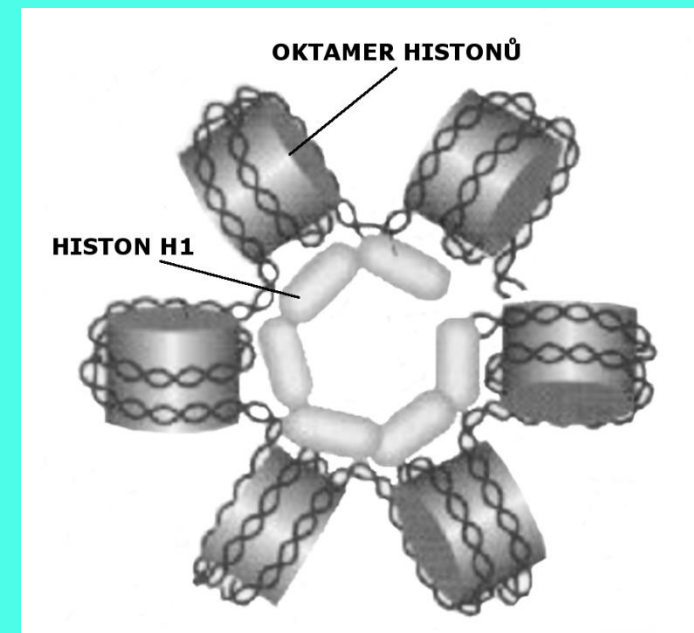
struktura chromosomu

NUKLEOSOM

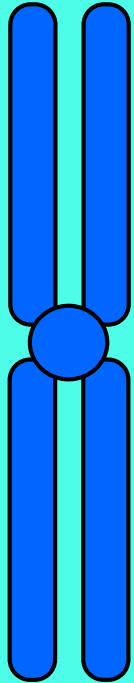


Solenoid – 6 nukleosomů
na 1 otočku

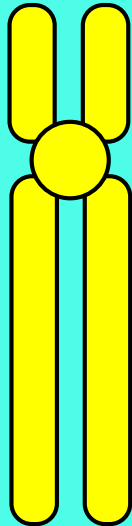
→ Chromatinové vlákno



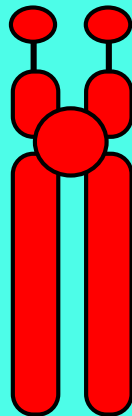
typy chromosomů



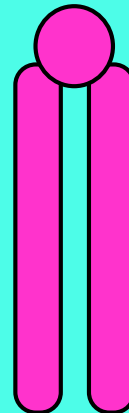
METACENTRICKÝ



SUBMETACENTRICKÝ

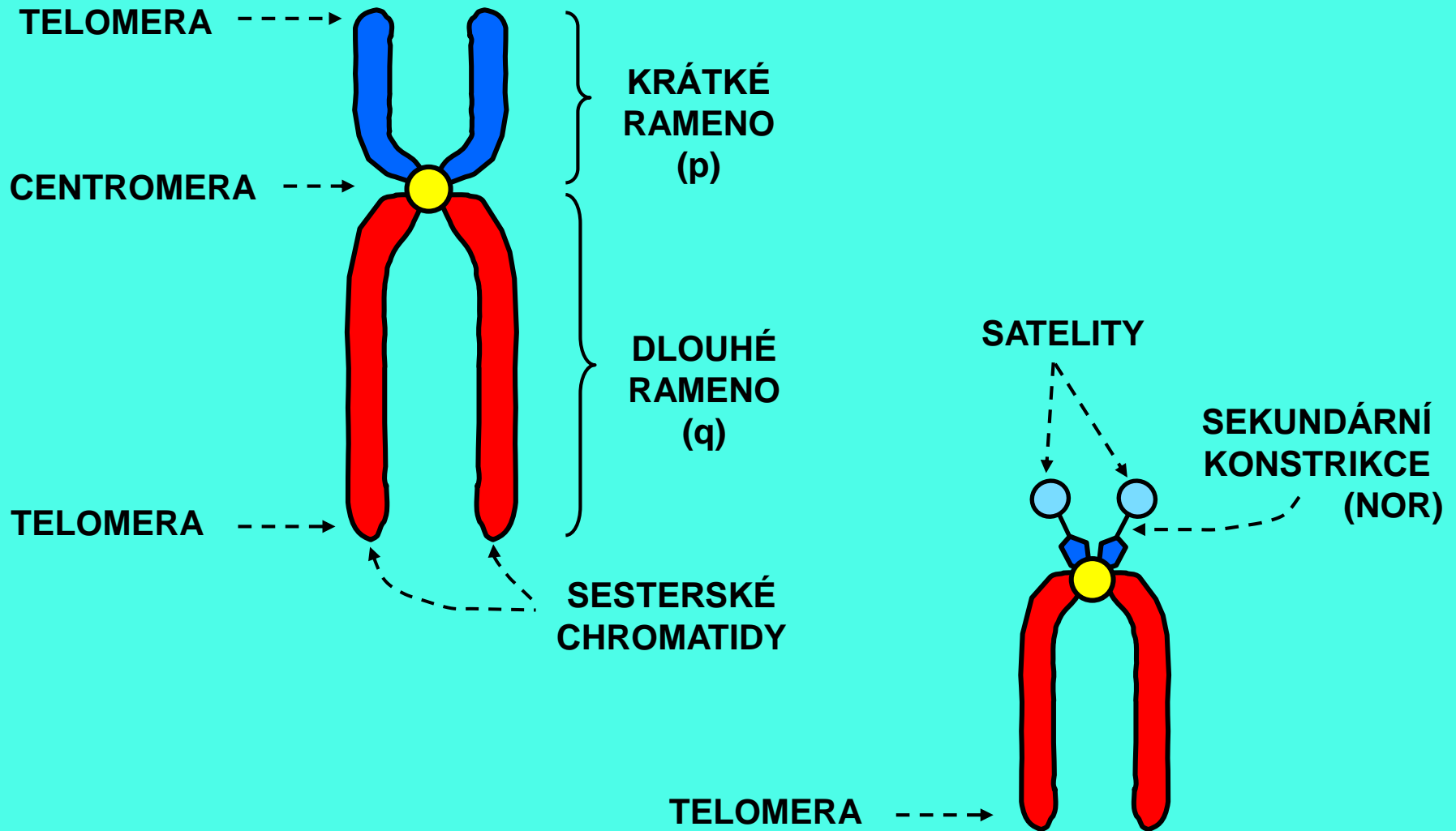


AKROCENTRICKÝ



TELOCENTRICKÝ

stavba chromosomu



počet chromosomů

- druhově specifický, reprodukční bariéra

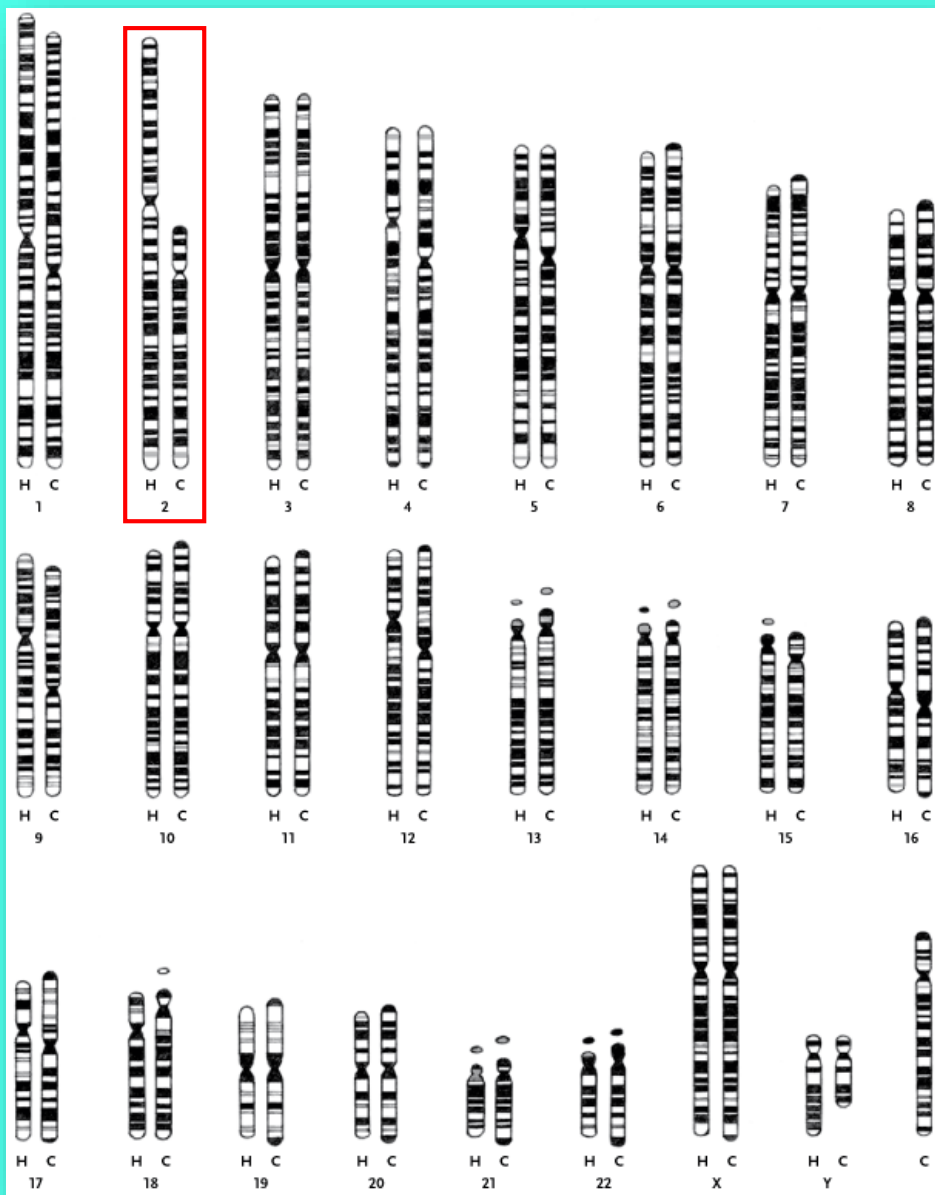
druh	počet
hrách / žito, ječmen	14
ředkvička	18
Konopí seté	20
rýže	24
pšenice, oves (šlechtěné)	42 hexapl.
mango	40
ananas	50
jahoda	14-70 di-decaploid.
vrtička (<i>Botrychium</i>)	90
moruše	308 (44-ploid.)
hadilka (hadí jazyk) - <i>Ophioglossum reticulatum</i> - <i>O. vulgatum</i>	vysoce polyploid. 1440 max 540 max



druh	počet
Mravenec	2/1
octomilka	8
ropucha	22
kočka, lev, tygr / prase	38
myš	40
potkan	42
člověk	46
slon	56
kráva	60
pes, vlk / kuře	78
kapr	104
Modrásek (nepolyploidní!)	448-452
mřížovec (zooplankton)	> 2000



Pan troglodytes vs. Homo sapiens



- 48,XX/XY vs. 46,XY/XY
- Lidský chromosom 2 vzniklý fúzí chromosomů 12 a 13
- Pericentrická inverze na chromosomech:

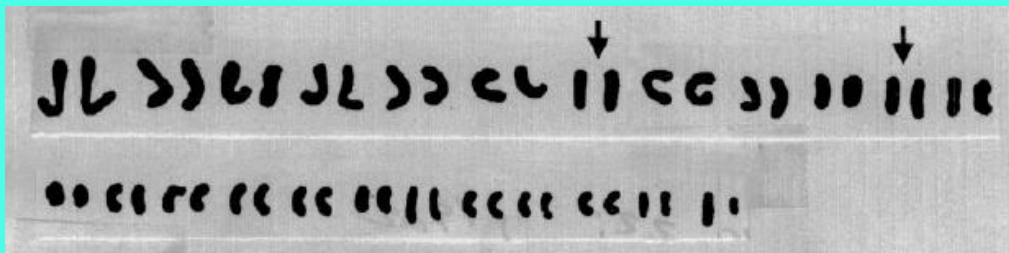
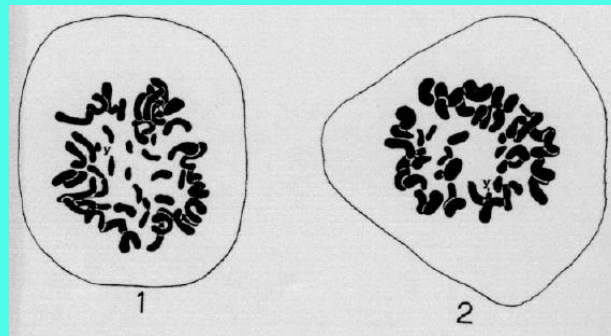
- 1
- 4
- 5
- 9
- 12
- 15
- 16
- 17
- 18



The Origin of Man: A Chromosomal Pictorial Legacy," Science, Vol. 215, 1982; pp. 1525–1530

počet chromosomů u člověka

lidský karyotyp 23 párů chromosomů



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Genetics



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Genetics

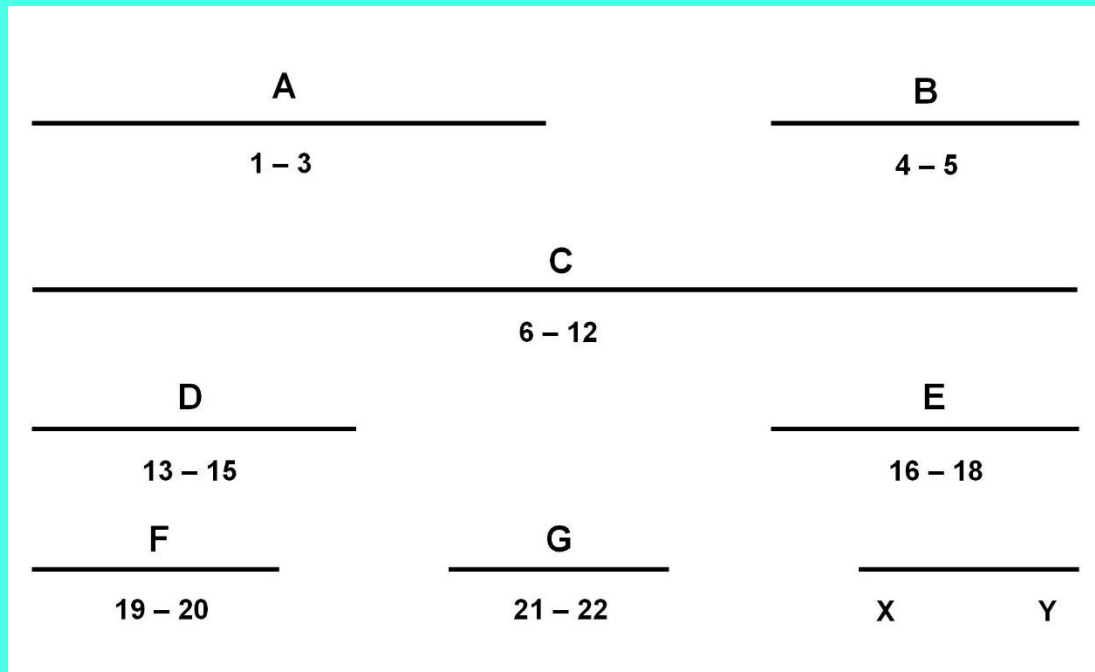
Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Genetics

lidský karyotyp

46 chromosomů

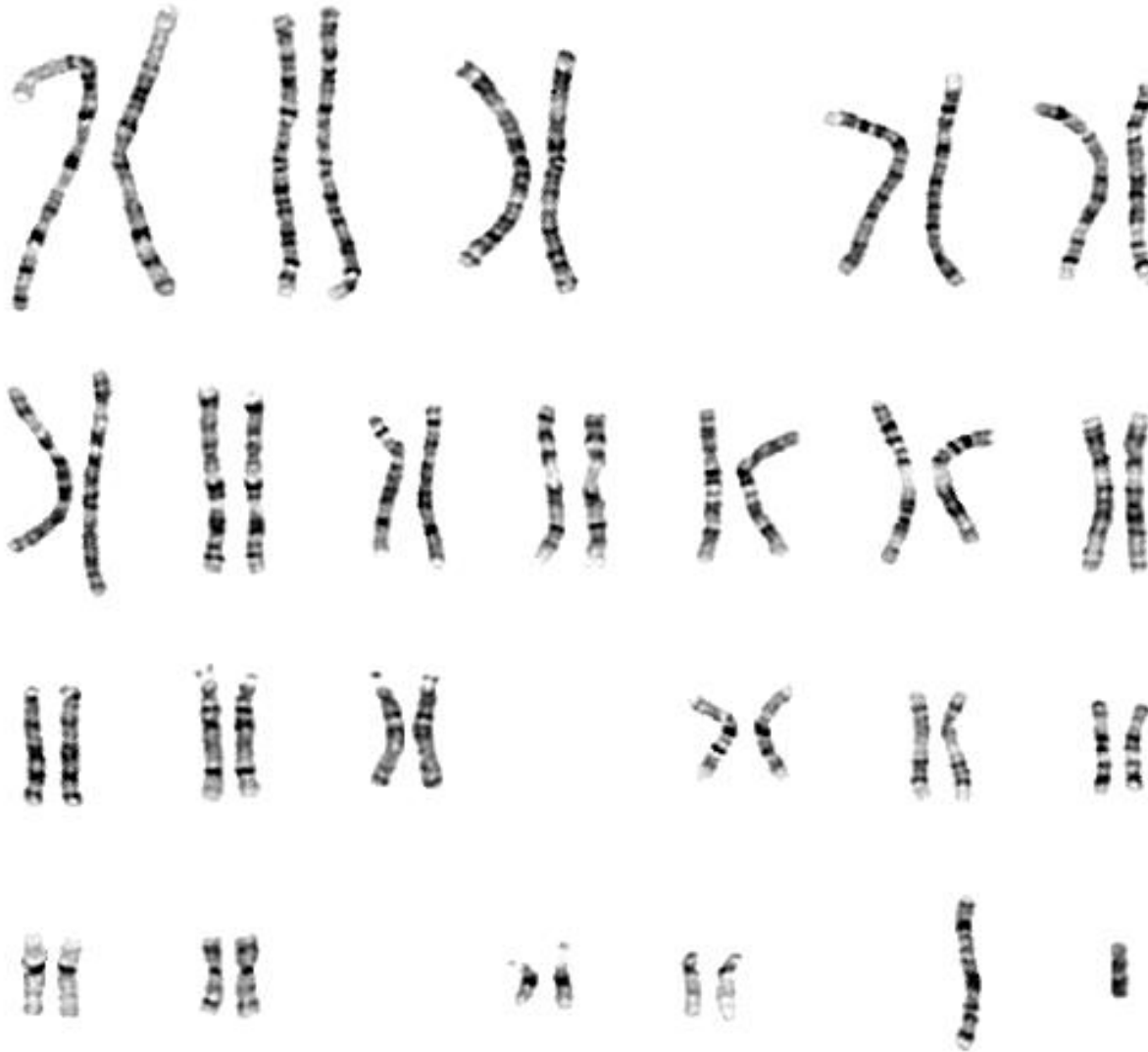
- 22 párů autosomů
- 1 pár pohlavních chromosomů

Pořadí dle velikosti a typu chromosomů
→ řazení do skupin



A	1-3 velké metacentrické
B	4-5 velké submetacentrické
C	6-12, X střední submetacentrické
D	13-15 střední akrocentrické
E	16-18 malé submetacentrické
F	19-20 malé metacentrické
G	21-22, Y malé akrocentrické

lidský karyotyp



46,XY

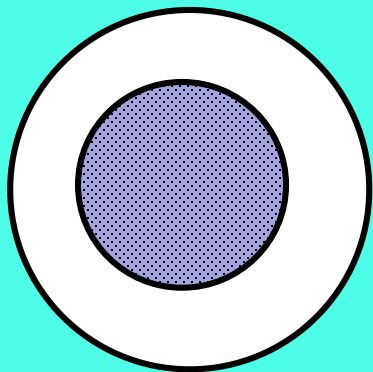
X-inaktivace

X-inaktivace (lyonizace)

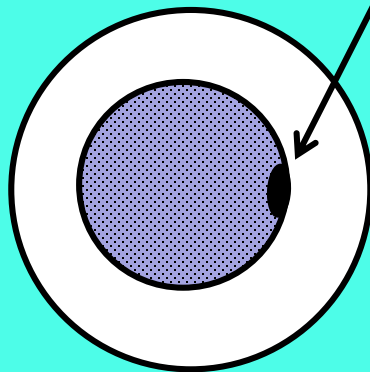
- náhodný proces (většinou), nastává v embryonálním období
- kondenzace každého „nadpočetného“ chr. X kromě tzv. pseudoautosomálních oblastí



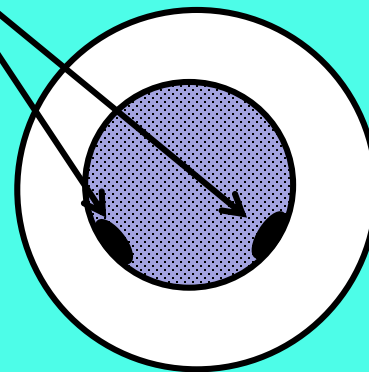
BARROVA TĚLÍSKA



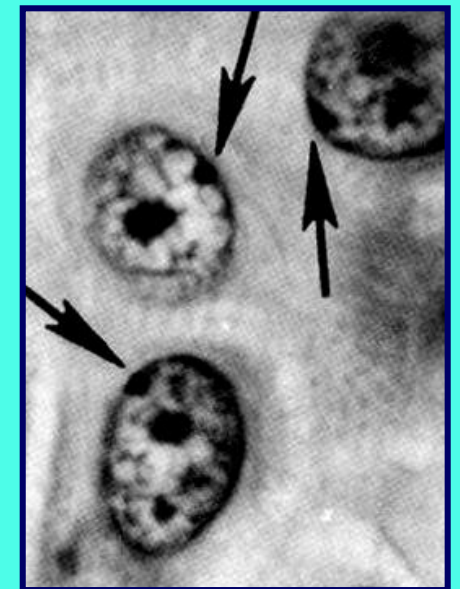
ŽÁDNÉ TĚLÍSKO:
46,XY
45,X



1 TĚLÍSKO:
46,XX
47,XXY



2 TĚLÍSKA:
47,XXX
48,XXX
49,XXX



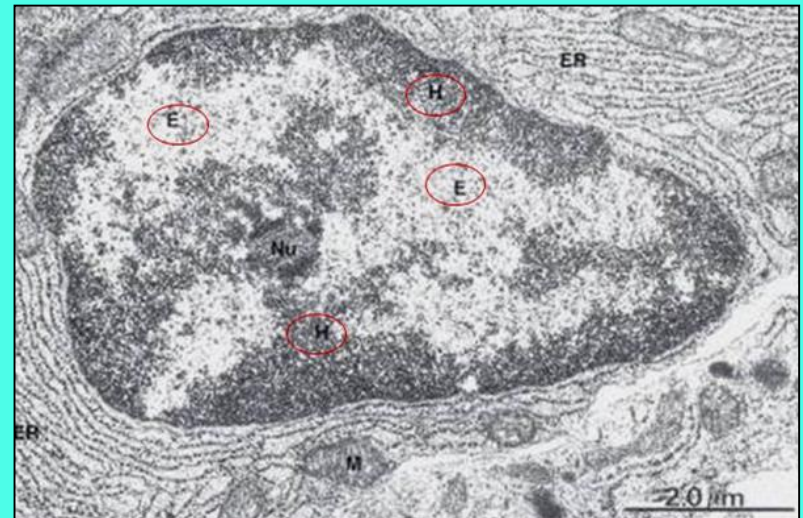
chromatin

EUCHROMATIN

- v interfázi despiralizované úseky chromosomů
- časně se replikující oblasti
- v metafázi méně spiralizované než heterochromatin, světlé G-pruhy
- unikátní DNA sekvence, většina genů, transkripčně aktivní oblasti

HETEROCHROMATIN

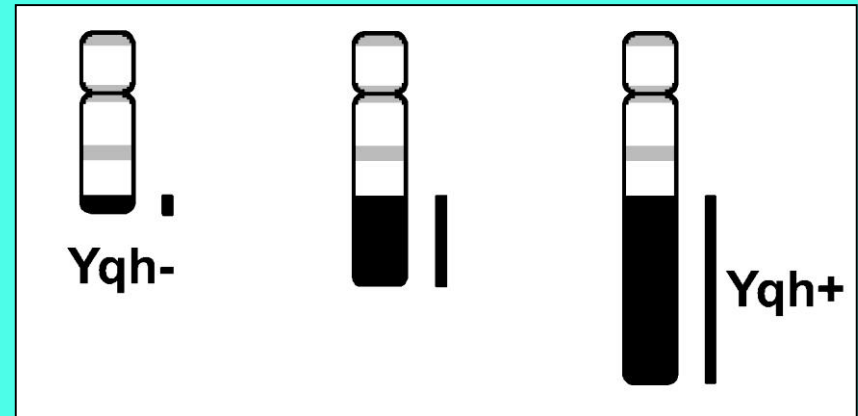
- v interfázi kondenzované úseky chromosomů – tvoří „hrudky“
- pozdně se replikující oblasti
- v metafázi více spiralizované než euchromatin, tmavé G-pruhy
- převážně repetitivní DNA sekvence, minimum genů, transkripčně neaktivní oblasti



heteromorfismy, varianty

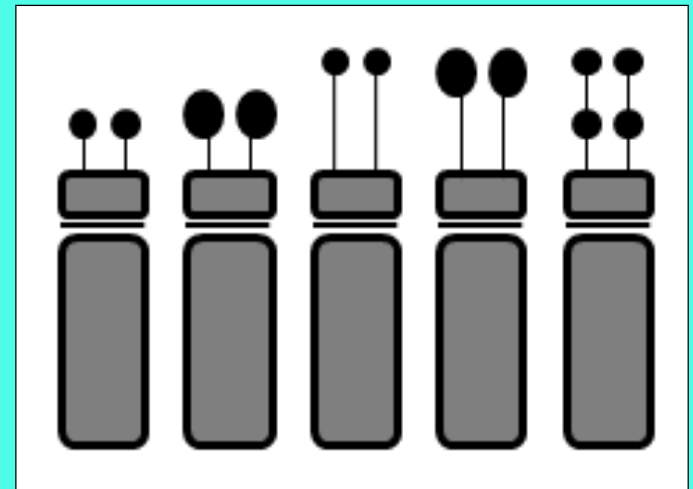
HETEROMORFISMUS HETEROCHROMATINU

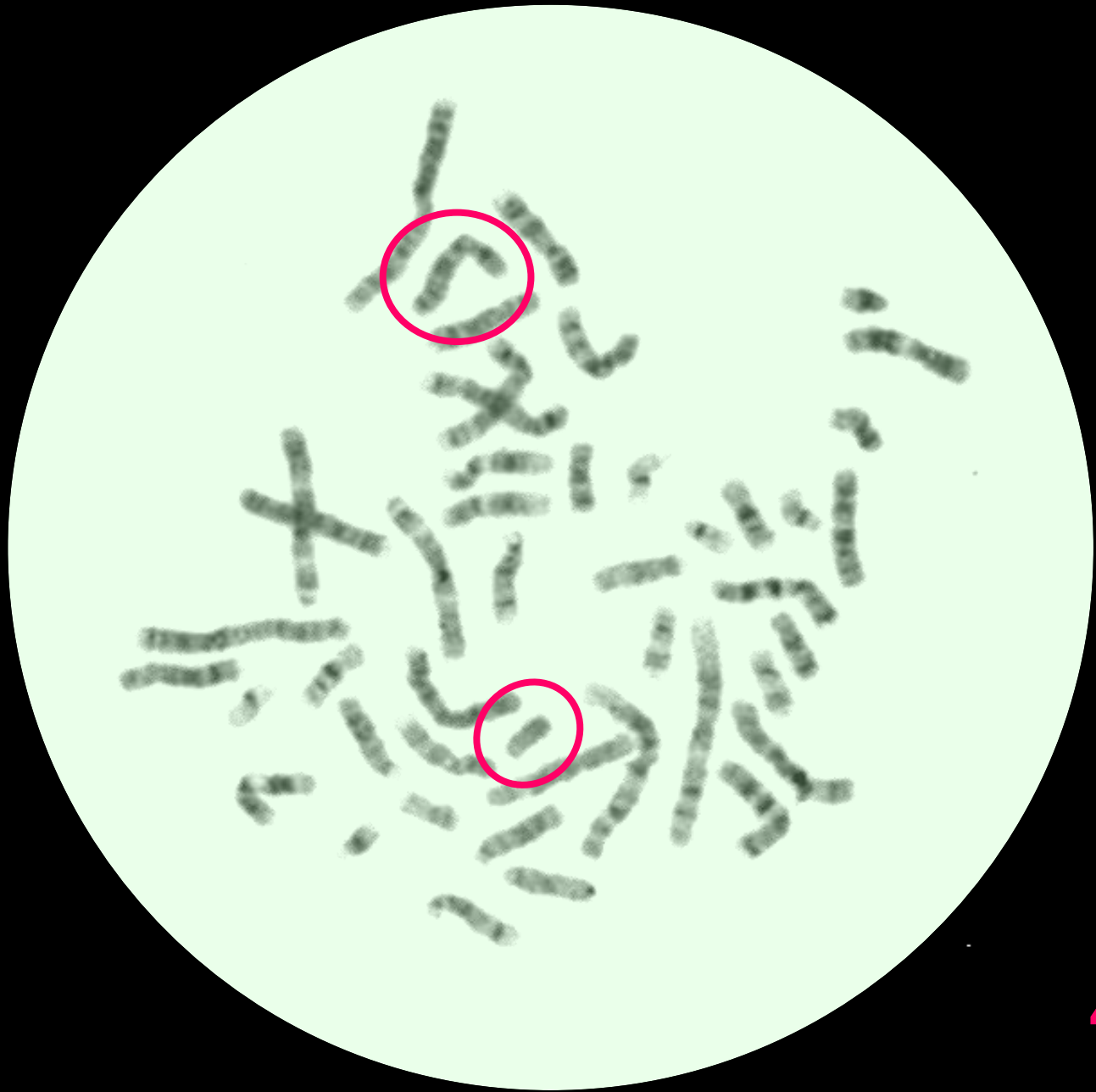
- chromosomy 1, 9, 16 a Y



HETEROMORFISMUS KRÁTKÝCH RAMEN AKROCENTRŮ

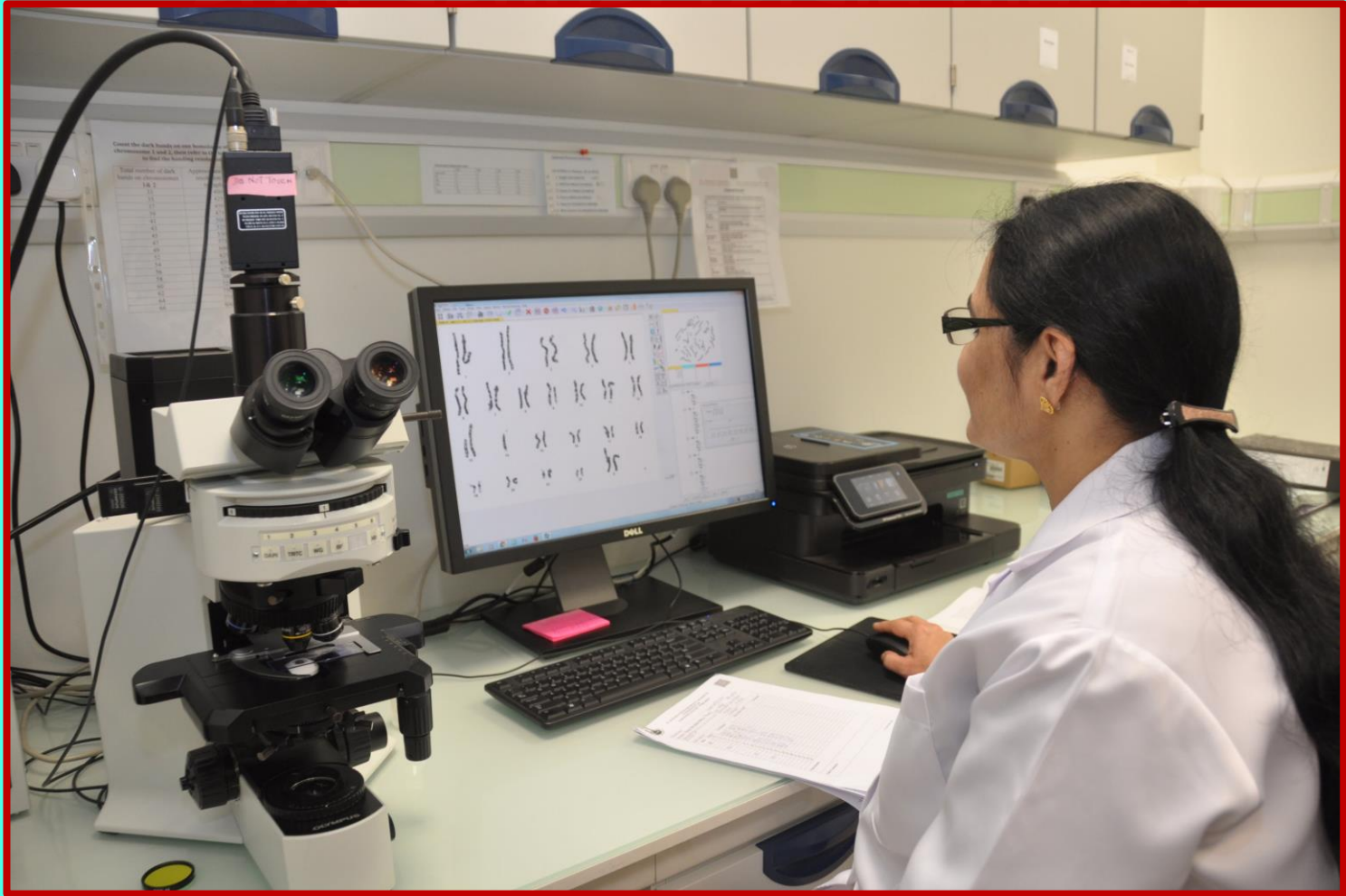
- chromosomy skupiny D (13, 14, 15)
a skupiny G (21, 22)





46,XY

Cytogenetika klasická – současnost (stále méně)



Cytogenetika molekulární – současnost (stále více)



vyšetřovaný materiál

PRENATÁLNĚ:

plodová voda
choriové klky
fetální krev
(pupečnicková)

POSTNATÁLNĚ:

periferní krev
kostní dřeň
kožní fibroblasty
...

invazivní metody prenatální diagnostiky

Chronologicky:

1. Odběr choriových klků – CVS

+/- 12. týden gravidity

2. Amniocentéza (odběr plodové vody) – AMC

+/- 16.–20. týden gravidity

3. Kordocentéza (odběr fetální - pupečnickové krve) – KDC

≥ 20. týden gravidity

Cílem: získat buňky pro kultivaci (karyotyp plodu)

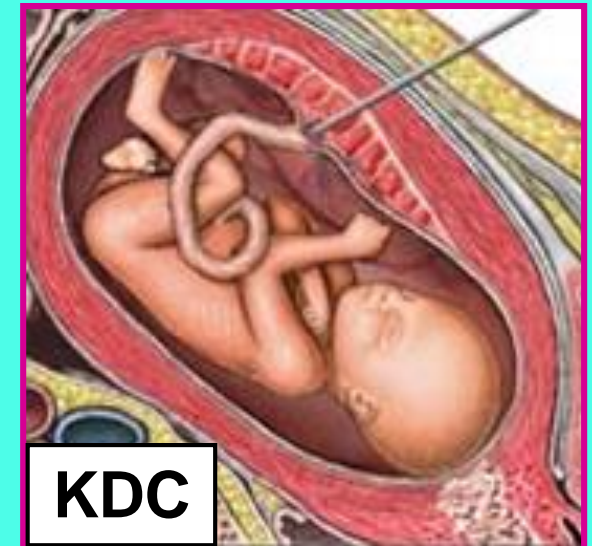
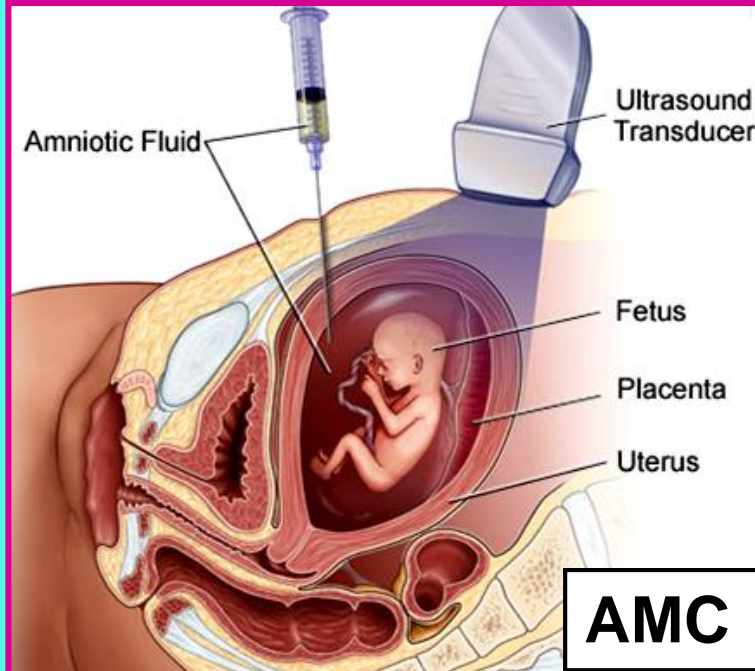
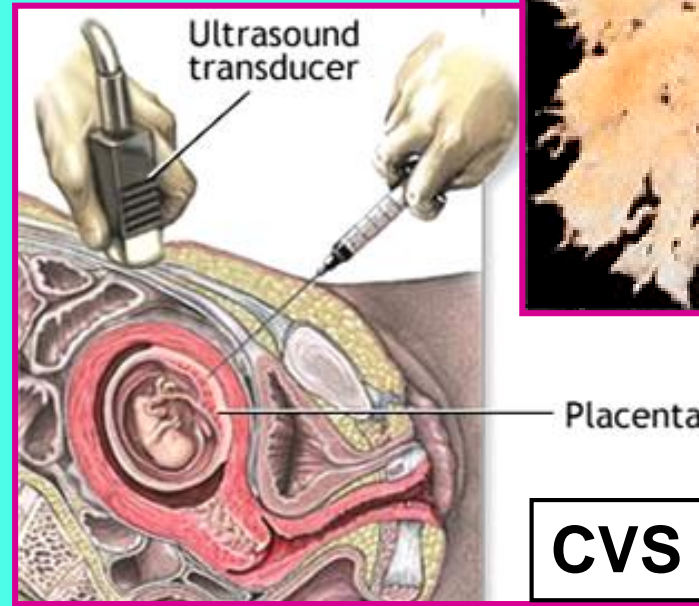
nebo pro přímou izolaci DNA plodu,

příp. pro další vyšetření – biochemické, hematologické, mikrobiologické ...

prenatální diagnostika

Odběr materiálu:

- **CVS**
- **amniocentéza**
- **kordocentéza**



vyšetření karyotypu

PERIFERNÍ, příp. FETÁLNÍ KREV

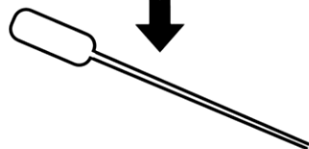
ODBĚR PERIFERNÍ KRVE
S HEPARINEM



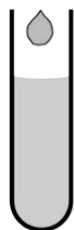
vzorek krve
kultivační médium
fytohemaglutinin

KULTIVACE
72 HODIN, 37°C

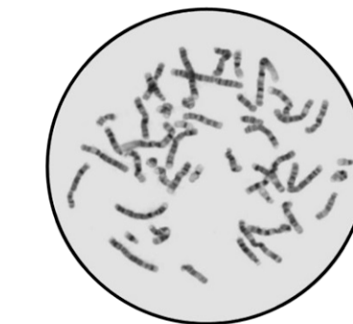
ZASTAVENÍ DĚLENÍ
KOLCHICINEM



HYPOTONIZACE



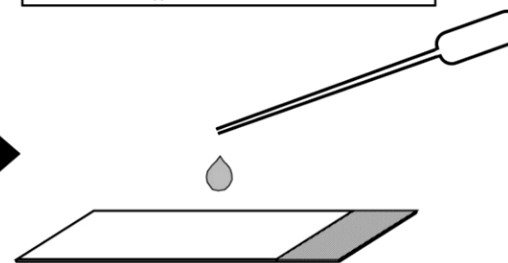
FIXACE



HODNOCENÍ KARYOTYPU
V MIKROSKOPU

BARVENÍ

PŘÍPRAVA PREPARÁTŮ
„KAPÁNÍ“



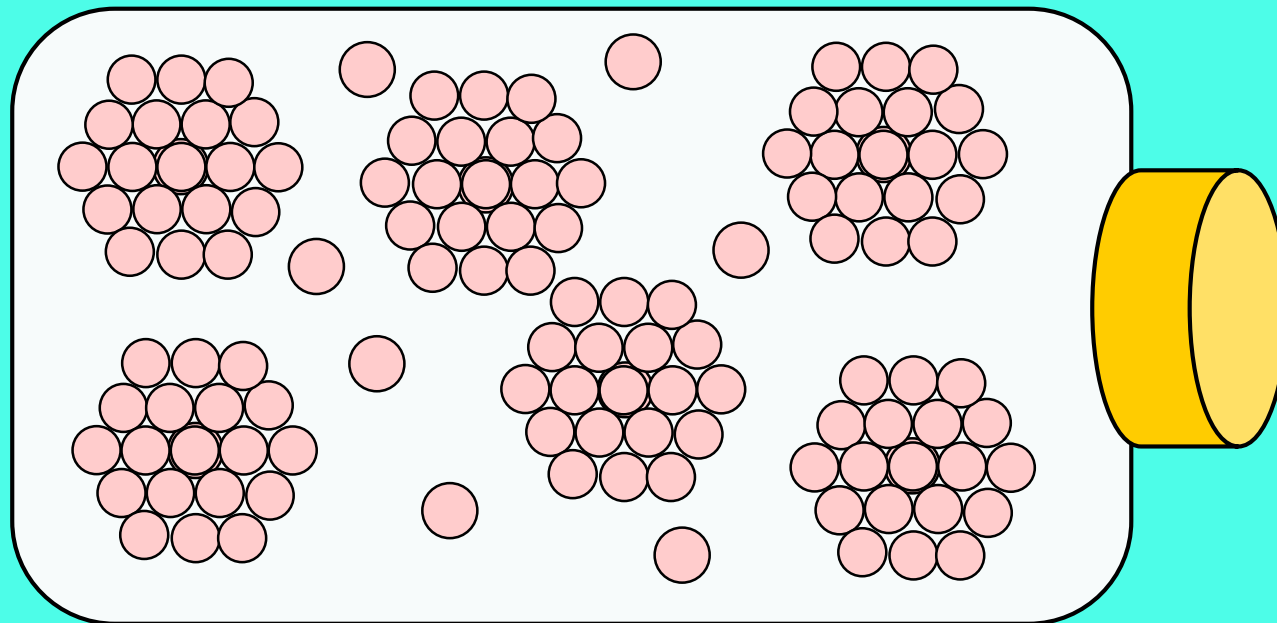
vyšetření karyotypu

Krátkodobé kultury	Dlouhodobé kultury
Periferní krev Fetální krev Kostní dřeň	Plodová voda Choriové klky Vzorky tkání, abortů...
72 hodin (nebo i méně)	Cca 2 týdny (i více)
Mitotická stimulace	Mitotická aktivita přirozená
Růst v „roztoku“	Růst jako monolayer, kontaktní inhibice
Zastavení dělení - kolchicin	
Zpracování: hypotonizace, fixace	
Příprava preparátu – kapání, barvení	
Hodnocení v mikroskopu	

dlouhodobá kultivace

Kultivační lahvička

- růst vyžaduje kontakt s podložkou
- dělení formou kolonií v jedné vrstvě (monolayer)
- kontaktní inhibice



indikace

k chromosomovému prenatalnímu vyšetření:



1. vyšší věk matky
 - vyšší než 35 let v době porodu (zvýšené riziko chromosomových aneuploidií, zejména M. Down)
2. pozitivní screening vrozených vad
 - v I. nebo II. trimestru (s vyšším rizikem chromosomových aberací)
3. pozitivní anamnéza
 - postižené dítě/plod v předchozí graviditě (chromosomová aberace)
 - rodič nositelem balancované chromosomové aberace
4. patologický či atypický ultrazvukový nálezn (diferenciální diagnosa)
5. další (např. fakultativně – matka po chemoterapii, gravidita po IVF, ...)

indikace

k chromosomovému postnatálnímu vyšetření:



novorozenci – kraniofaciální dysmorfie, kongenitální anomálie, hypotonie, ...

děti – psychomotorická retardace, dysmorfie, růstová retardace, kryptorchismus, ...

puberta – předčasná, resp. opožděná puberta, amenorea, gynekomastie, ...

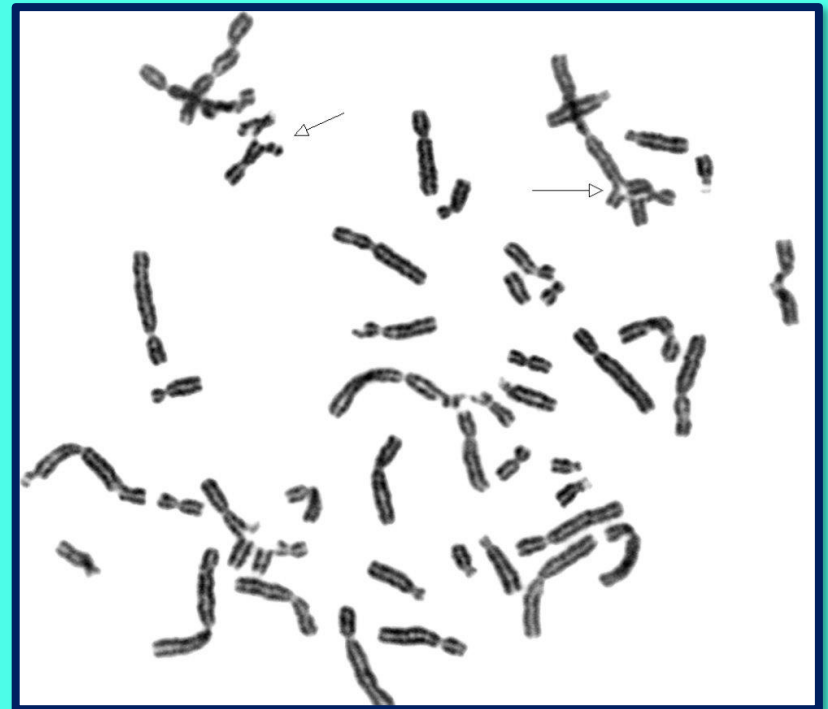
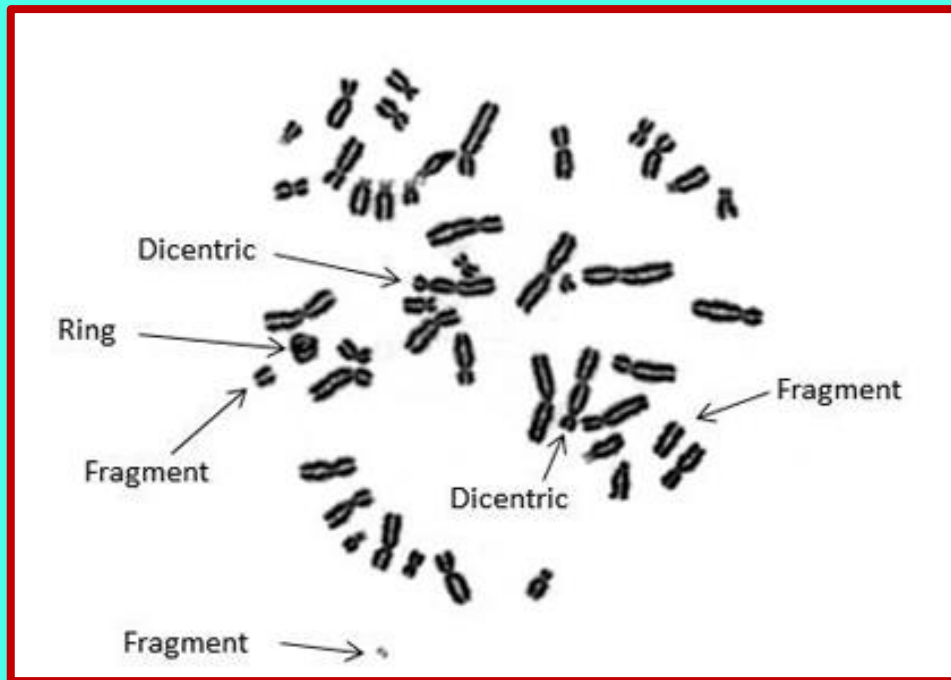
dospělí – sterilita, opakované spontánní aborty, patologický spermioqram, pozitivní RA (reprodukční ztráty, mrtvě rozené děti, postižené děti,...), prekoncepční péče, dárcovství gamet, ...

+ získané chromosomové aberace (ZCHA) (př. profesionální expozice, onkologická léčba)

klasické (konvenční) barvení

Giemsovo barvivo bez dalších látek

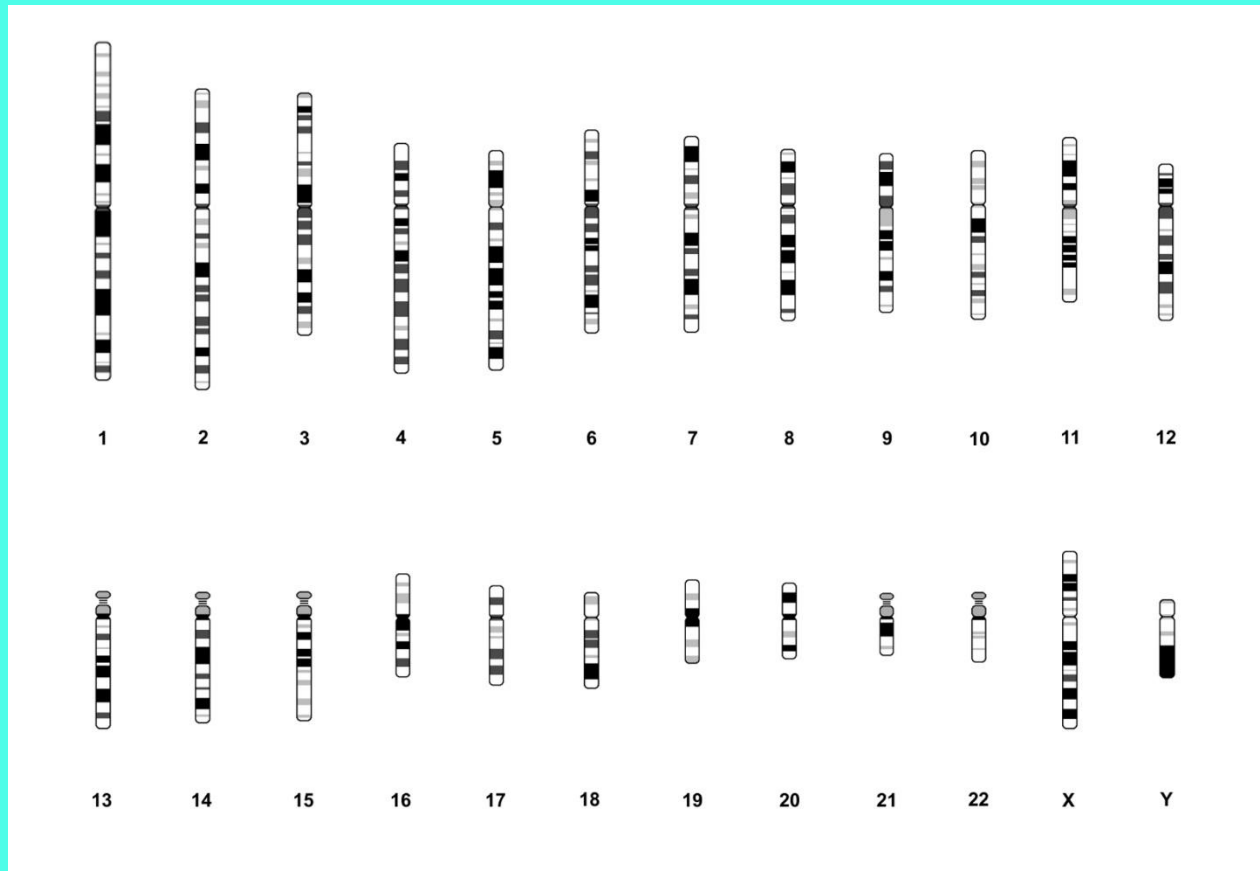
- výsledkem jsou jednobarevné chromosomy



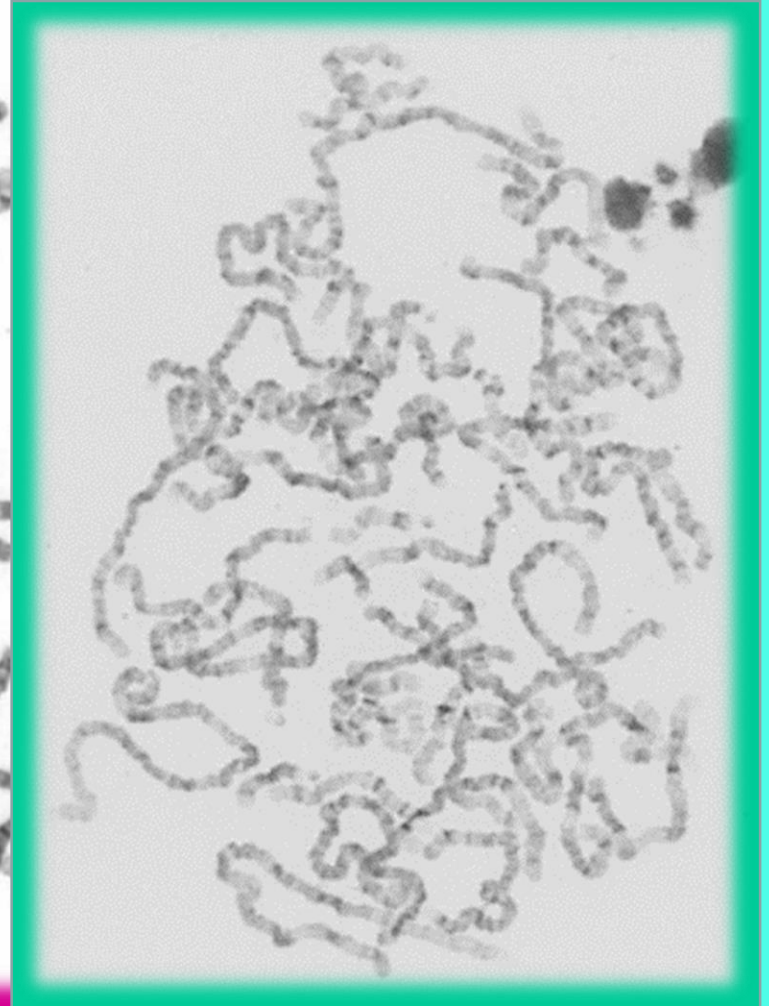
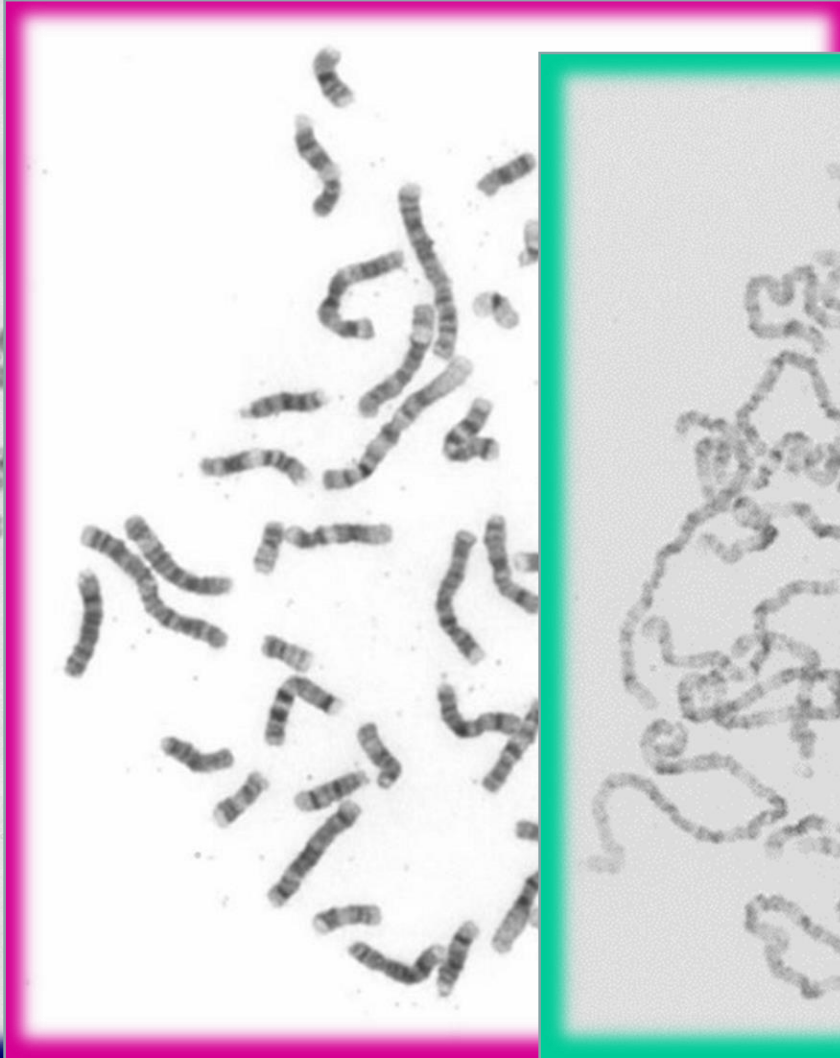
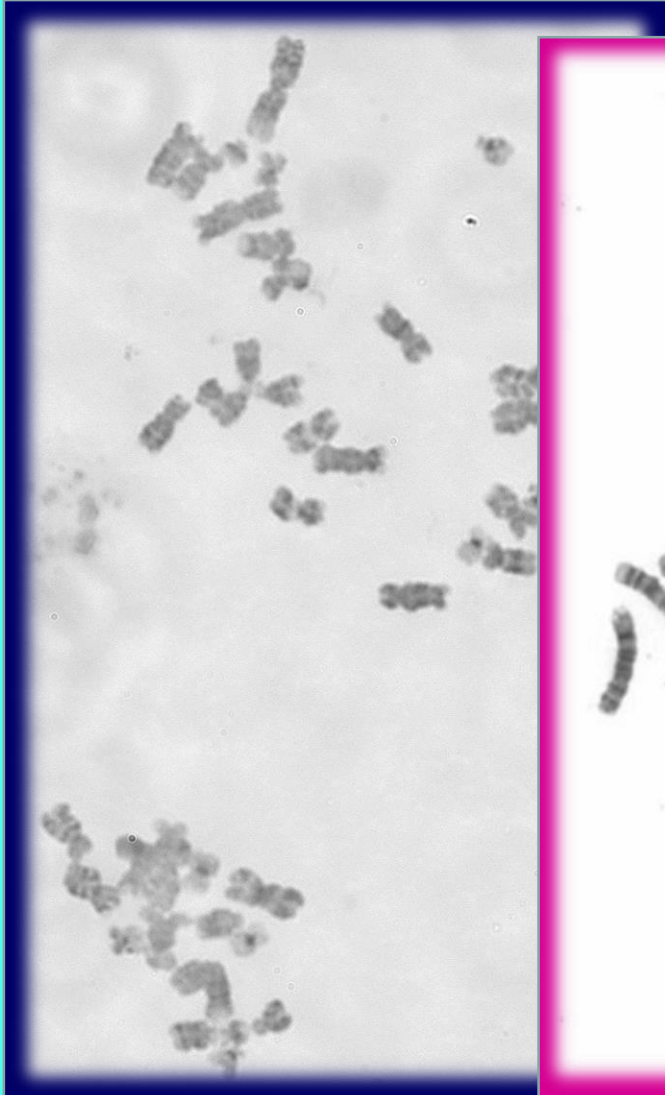
G-pruhování

G = Giemsa

G-banding = pruhování způsobené natrávením proteinů ve struktuře chromosomů, např. trypsinem



G-pruhování



další pruhovací techniky

Q-pruhování

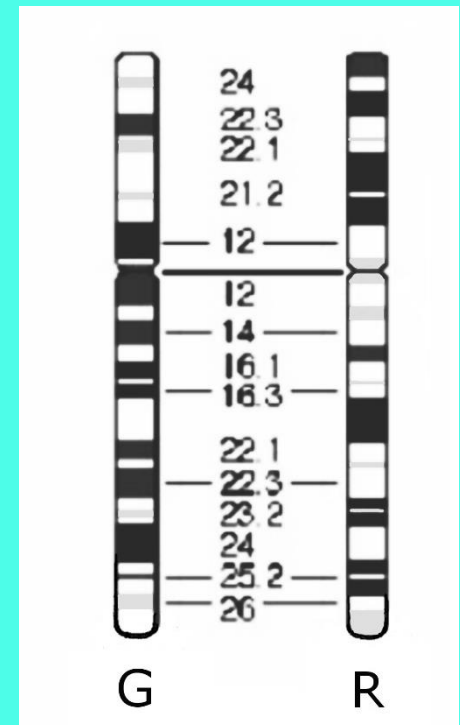
Q = quinacrine

- nejstarší pruhovací metoda (1972), barvení fluorescenčním barvivem chinakrinem
- nestálé, vyžaduje fluorescenční mikroskop, fotografování
- pruhy podobné G-pruhům

R-pruhování

R = reverzní

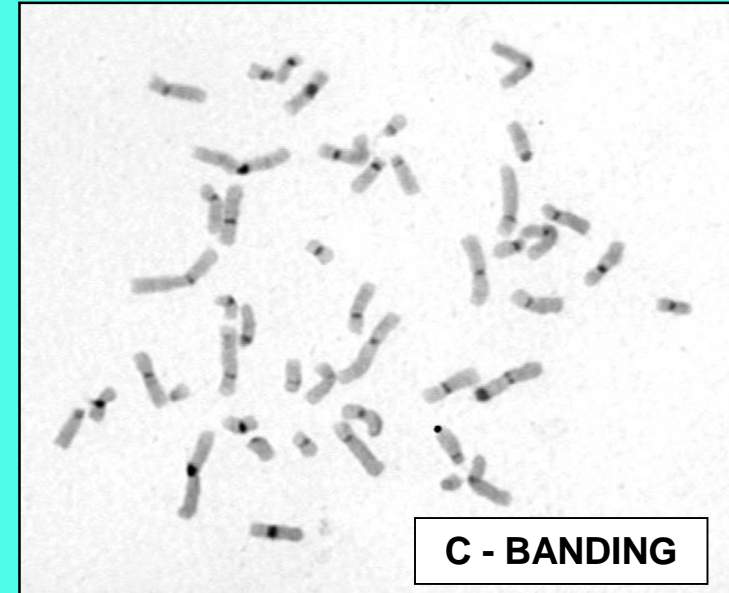
- působení alkalických činidel a vysoké teploty
- výsledkem pruhy rozložené opačně než u G-pruhování



selektivní barvicí techniky

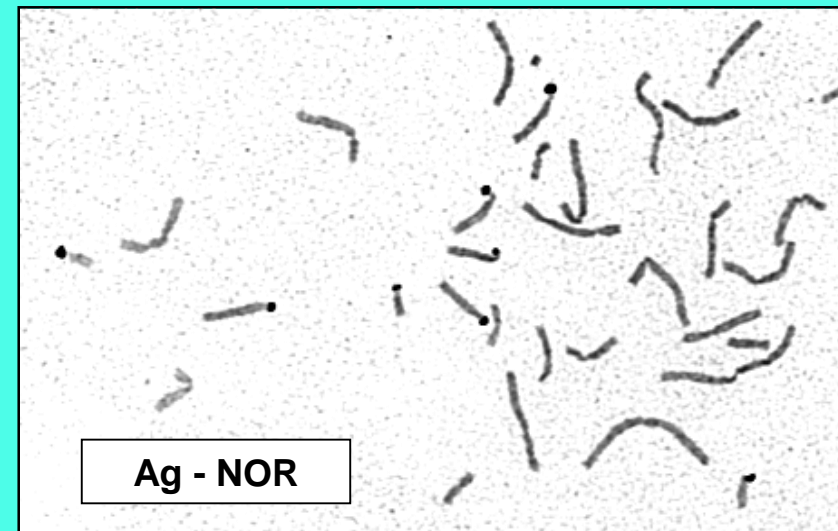
C-pruhování

- barvení po denaturaci v alkalickém prostředí (př. hydroxid barnatý)
- zvýrazňuje centromery a ostatní konstitutivní heterochromatin (zejména na chromosomech 1, 9, 16 a Y)

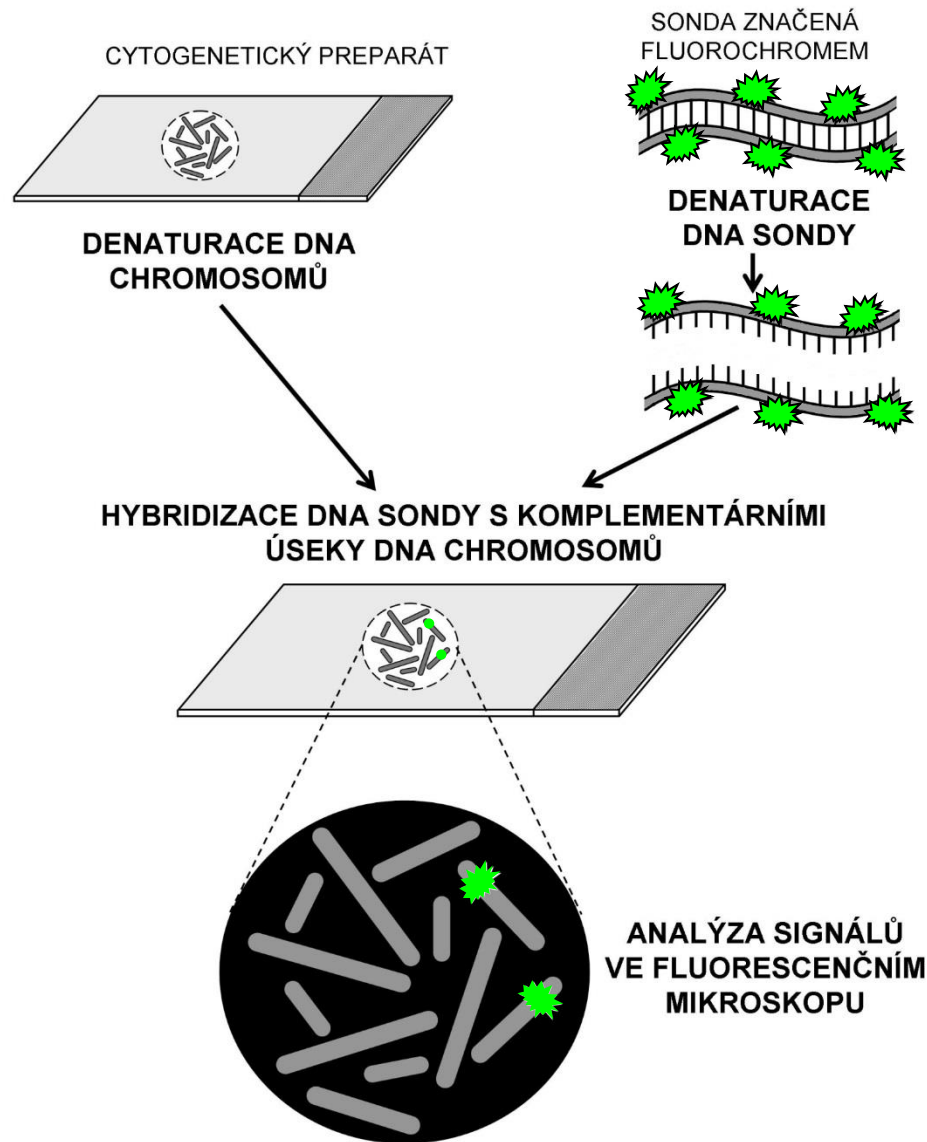


Ag-NOR barvení

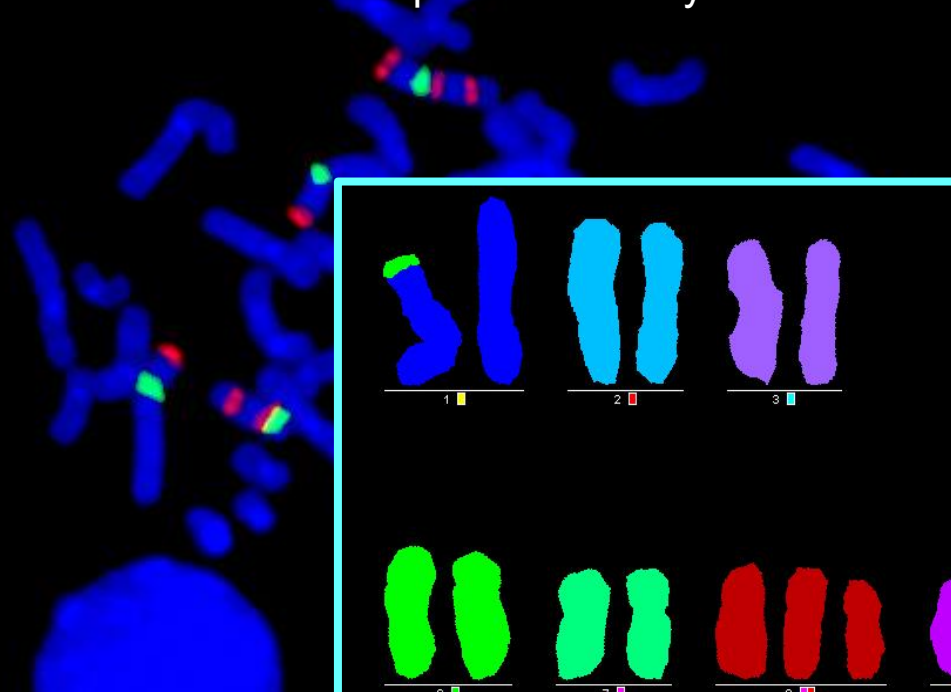
- stříbření dusičnanem stříbrným
- zvýrazňuje oblasti organizátorů jadérka (NOR) na akrocentrických chromosomech



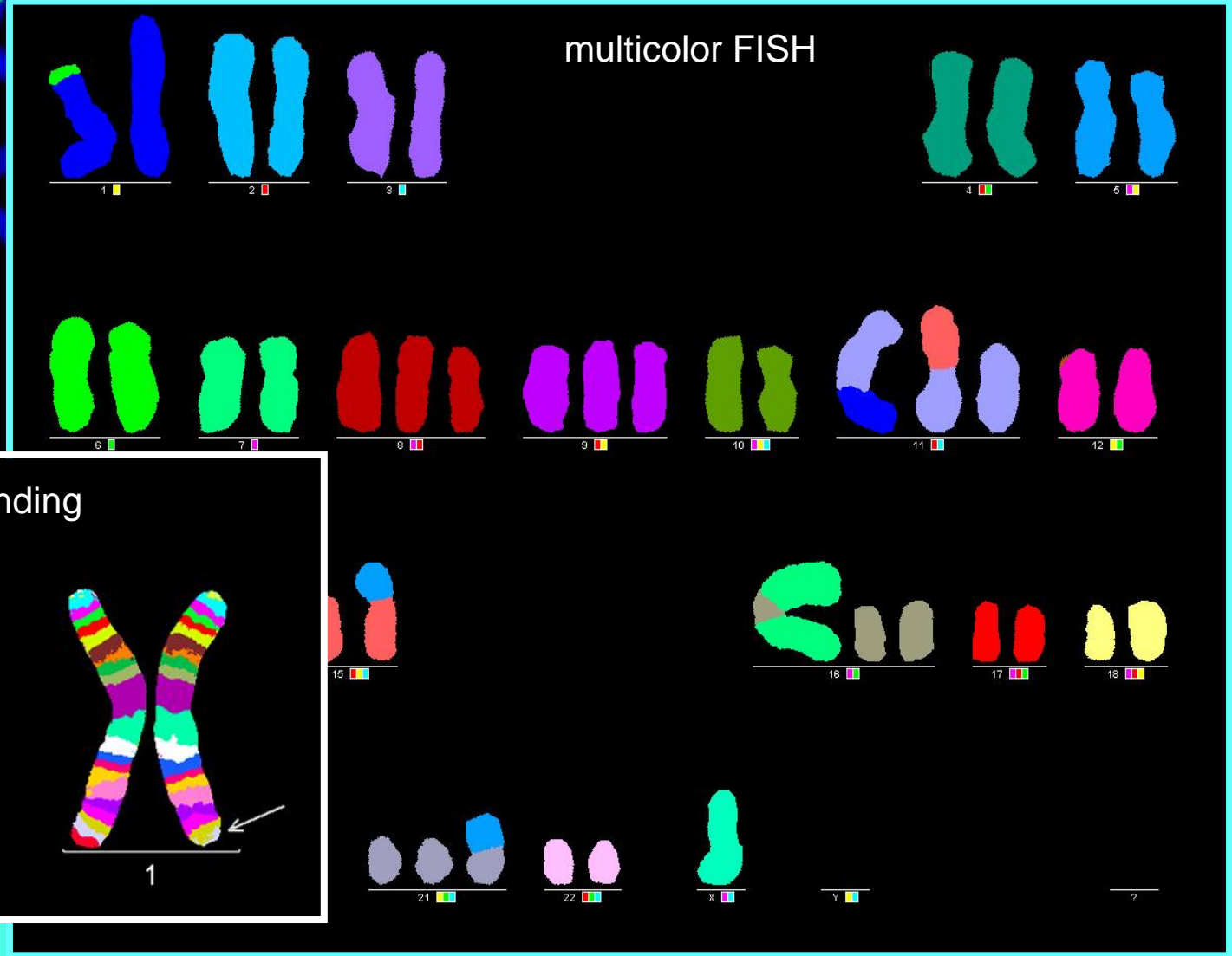
Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)



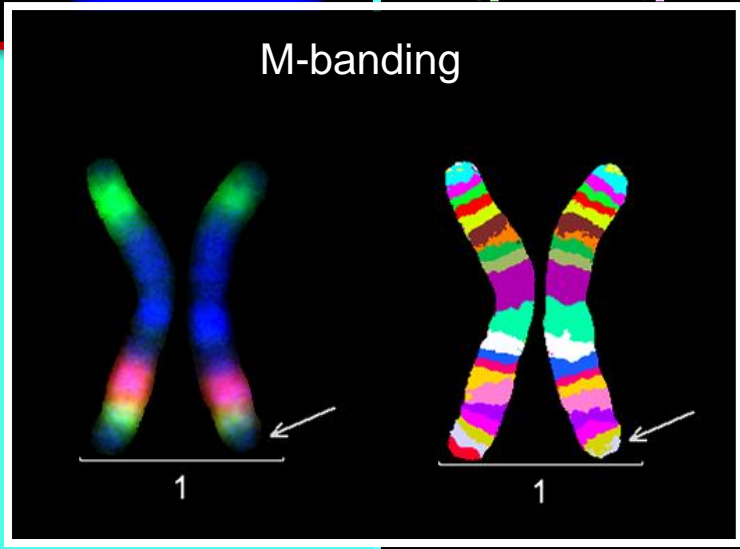
centromerické a lokus specifické sondy



multicolor FISH

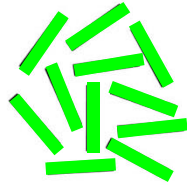


M-banding

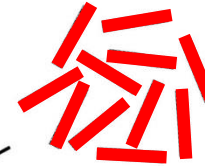


Komparativní genomová hybridizace (CGH)

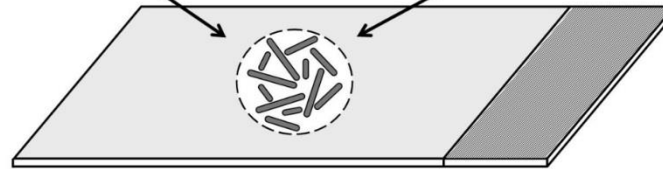
TESTOVANÁ
DNA



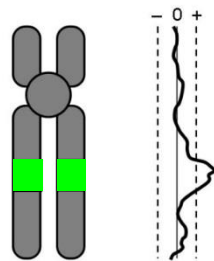
KONTROLNÍ
DNA



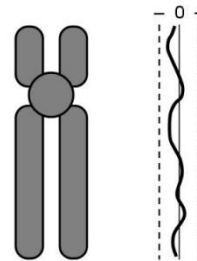
DNA OZNAČENA
ODLIŠNÝMI
FLUOROCHROMY



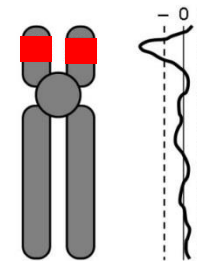
HYBRIDIZACE OBOU VZORKŮ DNA
S NORMÁLNÍMI CHROMOSOMY V POMĚRU 1 : 1



AMPLIFIKACE
TESTOVANÉ DNA

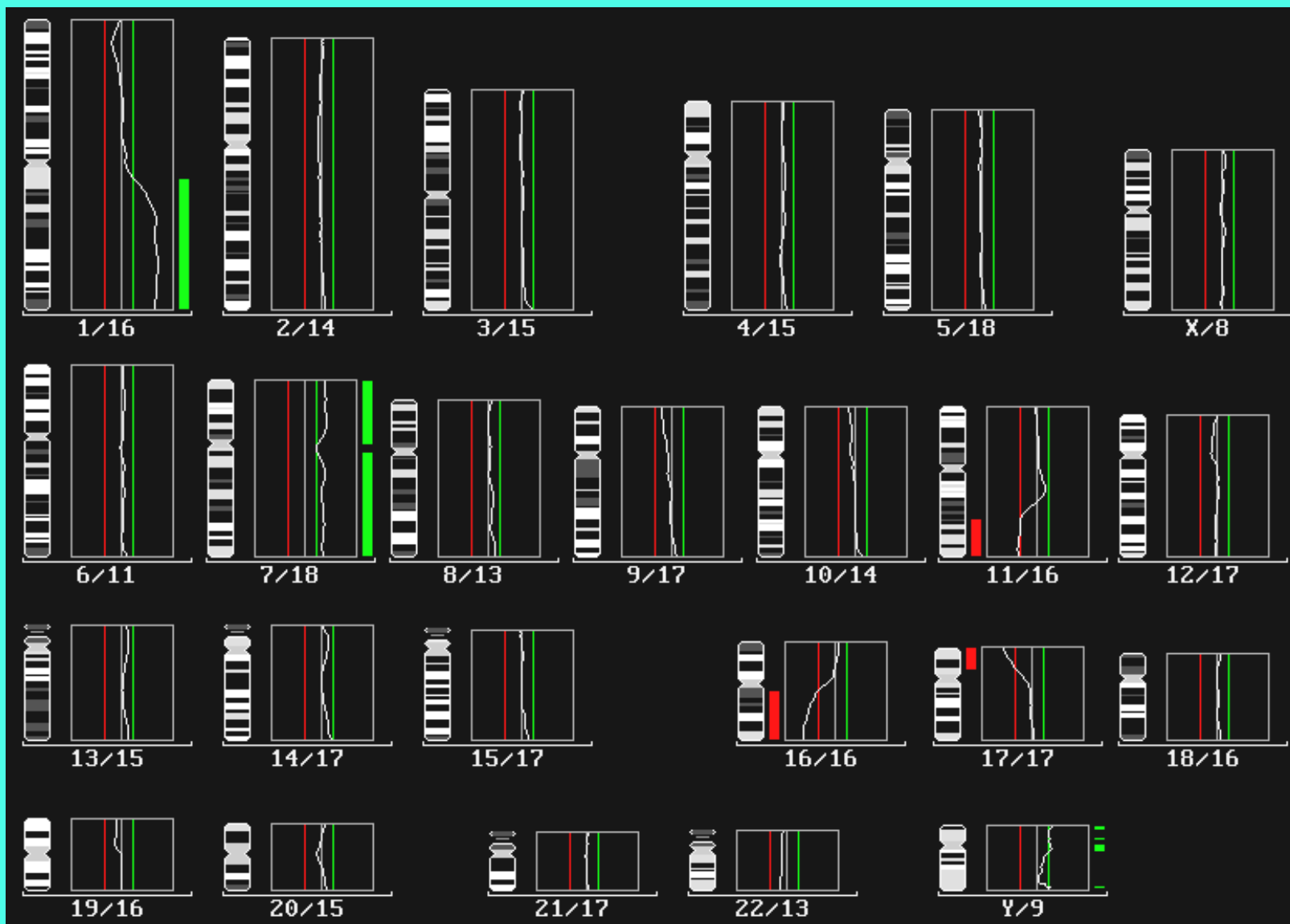


NORMÁLNÍ
NÁLEZ

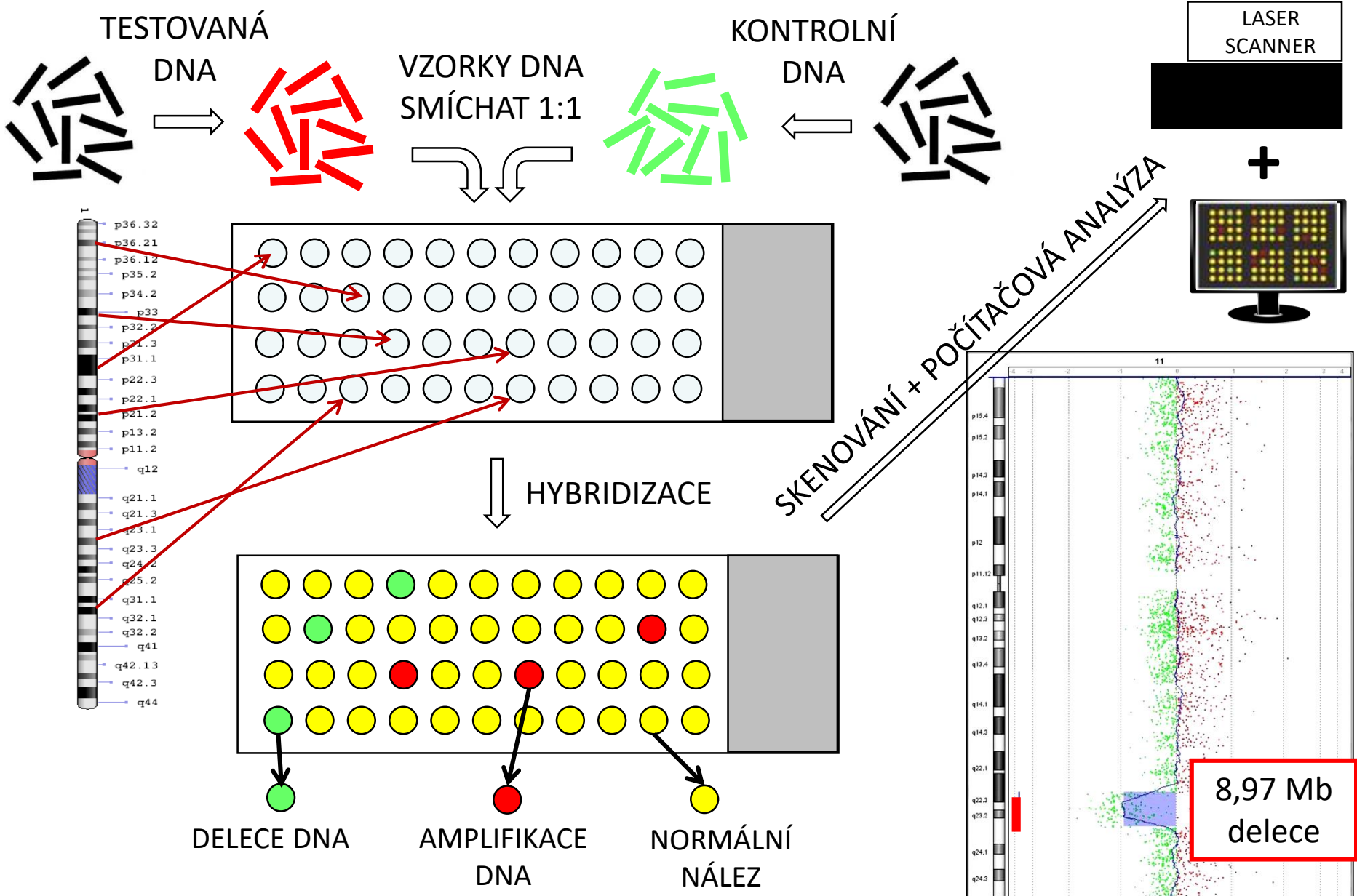


DELECE
TESTOVANÉ DNA

Komparativní genomová hybridizace (CGH)



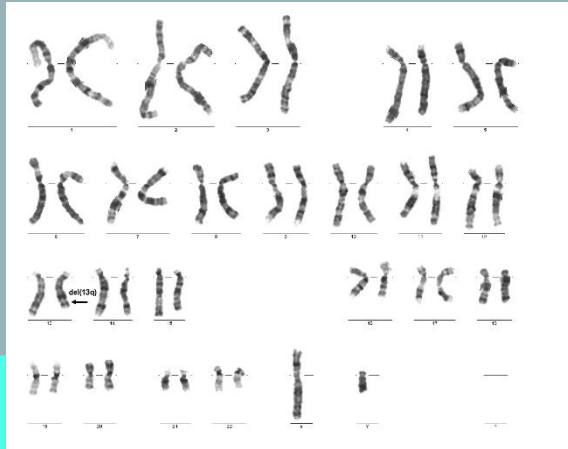
Microarray – princip metody



Microarray technologie

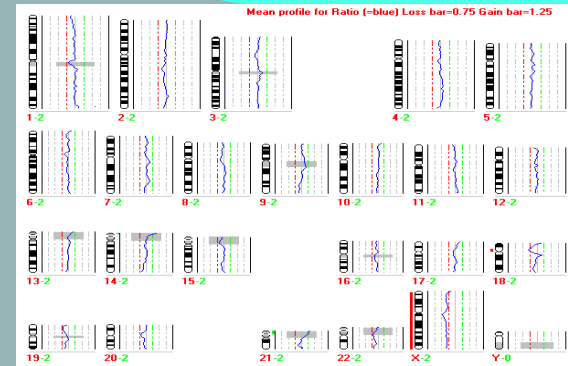
klasická cytogenetika

~5Mb

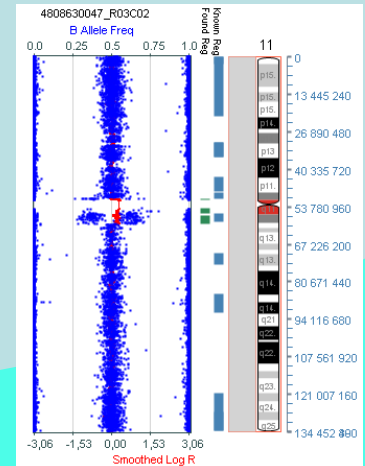
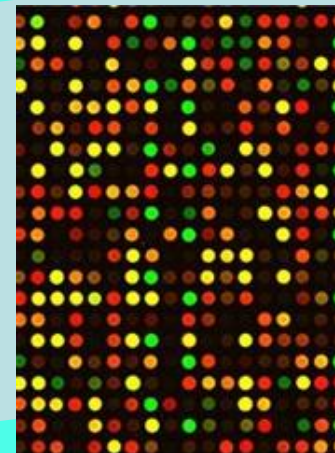


komparativní genomová hybridisace

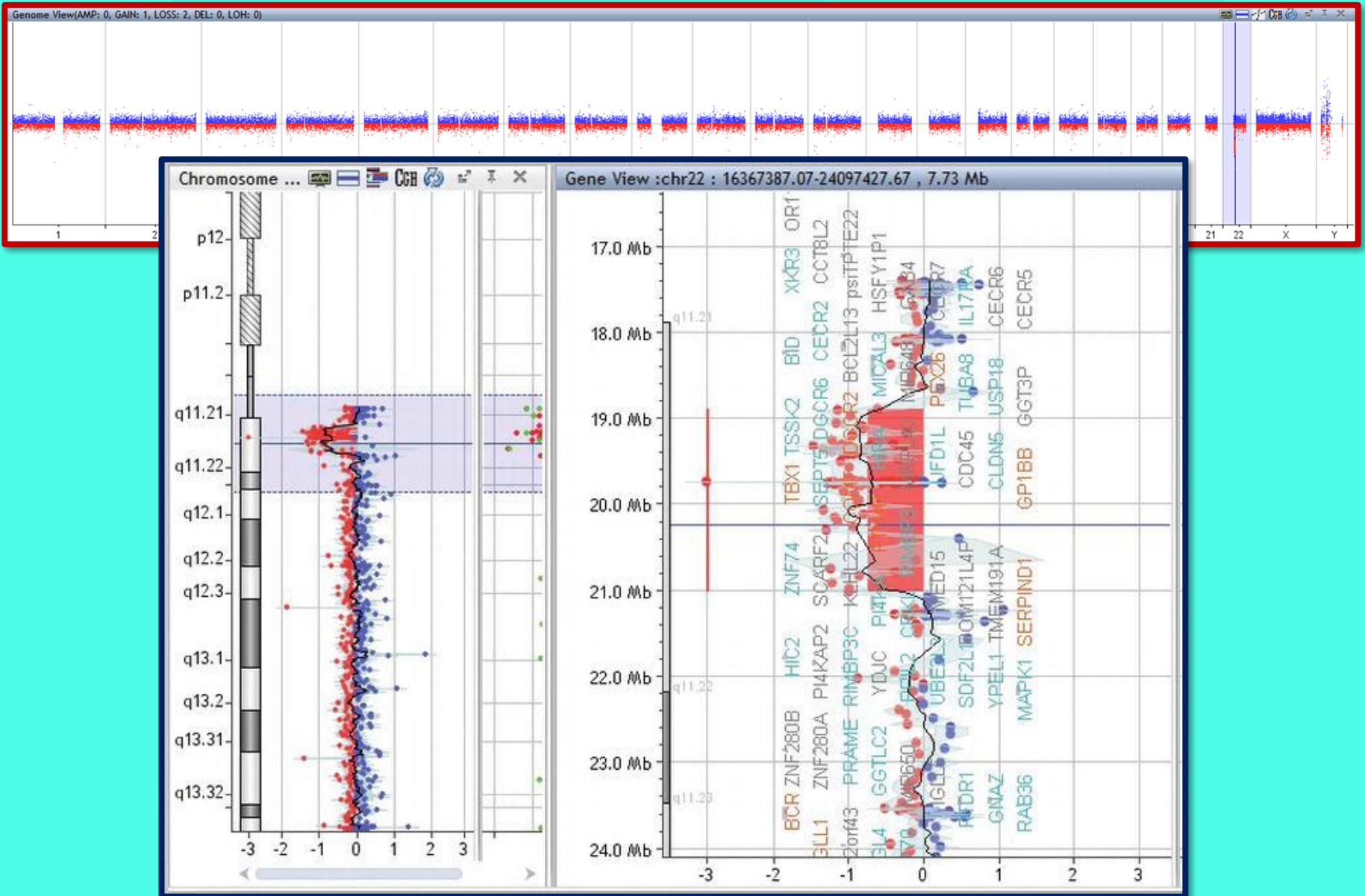
CGH ~ 2-5Mb



**SNP array
array CGH
~10kb (0.01Mb)**



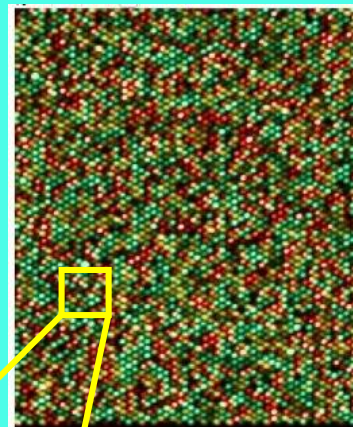
Microarrays



Microarray technologie

Modifikace: Array-CGH x SNP-array

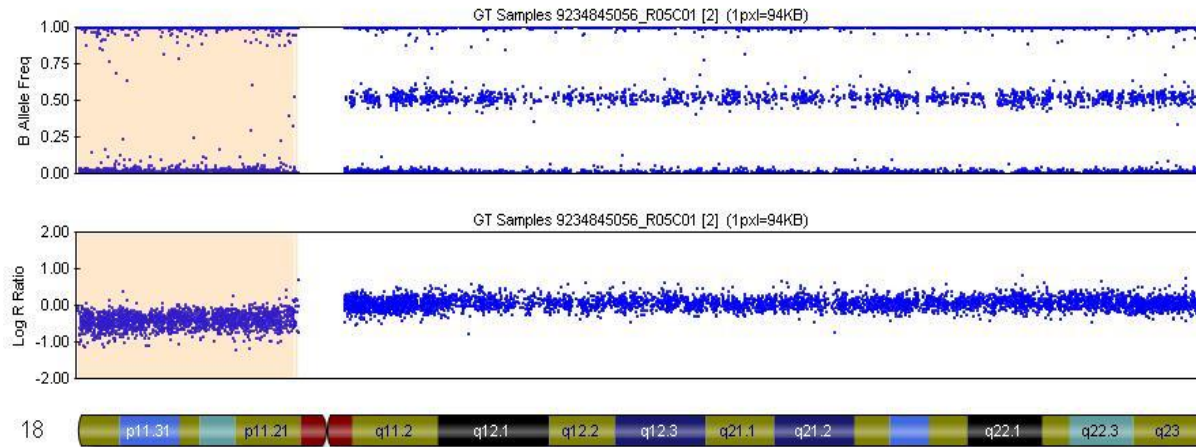
- molekulárně-cytogenetické metody
- principiálně vychází z CGH metody, resp. z detekce jednonukleotidových polymorfismů – SNPs v genomu
 - celogenomové vyšetření
 - velmi dobrá rozlišovací schopnost (stovky až několik kb)



Microarray technologie

del 18p11.32p11.21(12,842-15,245,448)

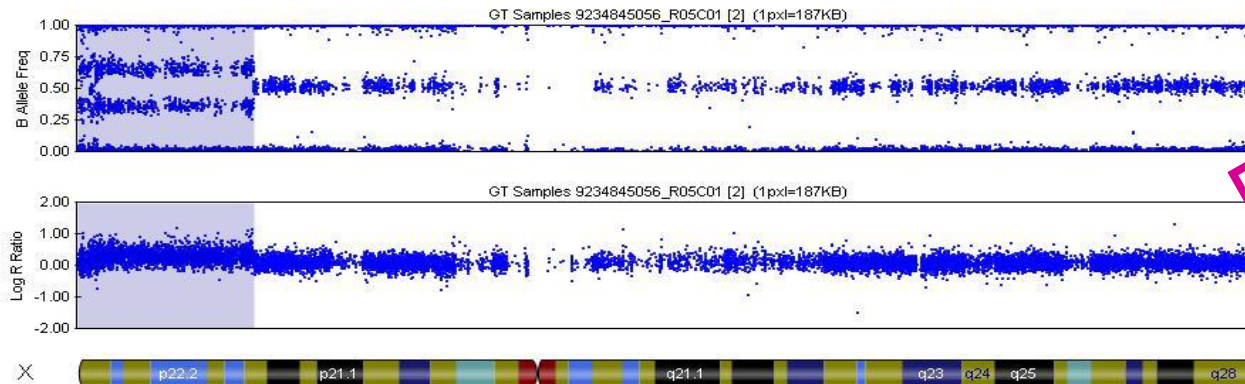
velikost cca 15,4 Mb



45 OMIM genů

dup Xp22.33p22.11(60,814-23,324,545)

velikost cca 23,2 Mb



více než
100 OMIM genů

Vyšetření SNP array

NIPT (neinvazivní prenatální testování)

- analýza volné fetální DNA v krvi matky (cfDNA) – masivní paralelní sekvenování na principu NGS
- detekce nejčastějších aneuploidií (základní varianta), případně i vybraných mikrodelečních syndromů nebo celogenomový scan (rozšířená varianta)
- provádí se z odběru žilní krve od 10. gestačního týdne, vzorek se v současnosti zasílá do zahraničních (většinou) nebo tuzemských laboratoří
- momentálně nabízeno jako komerční diagnostický test (např. PrenatalSafe, Prenascan, Harmony, Panorama,...), avšak dosud není 100% spolehlivý

Časté omyly v přípravě na zkoušku

OMYL č. 1: „Kultivace choriových klků (CVS) je rychlejší než z buněk krve“

Krev – krátkodobá kultivace (72 hodin)

CVS – dlouhodobá kultivace (2 týdny a více)

OMYL č. 2: „Výsledek karyotypu z CVS je nespolehlivý a měl by se ještě ověřit vyšetřením z plodové vody“

CVS – nejčasnější možnost vyšetřit karyotyp plodu, metoda plně dostačující vzhledem k indikacím; neboli - proč odebírat klky a ne rovnou plodovou vodu, pokud by to nestačilo?

OMYL č. 3: „Fetoskopie - metoda prenatální diagnostiky“

= přímé pozorování plodu fetoskopem, dříve používáno při nedostupnosti jiných metod; dnes obsolentní, nepoužívané, vysoké riziko potratu, infekce, předčasného porodu...