

KARYOTYP ČLOVĚKA

(Metody lidské cytogenetiky, klasifikace lidských chromozómů, karyotyp člověka.)

ÚVOD

Cytogenetika je vědní obor, který se zabývá studiem buněčných struktur nesoucích genetickou informaci. Pomocí cytologických metod zjišťuje počet, tvar a strukturu chromozómů a snaží se popsat příčiny a následky jejich změn. Přesné příčiny vzniku konkrétních, detekovaných chromozómových změn ale nejsou, na rozdíl od následků, zpravidla známy. Příkladem můžou být leukémie – chromozómové změny byly popsány v 60 – 95 % zjištěných případech výskytu nemoci, ale jen asi 10 % z nich je dědičných; většina změn vzniká až během života idiopaticky.

Cytogenetické vyšetřovací metody

Rozvoj molekulárně-biologických metod na začátku 21. století rozšířil „klasickou“ cytogenetiku i o molekulární část. Oba přístupy se doplňují a dávají spolu ucelenější pohled na studovaný karyotyp. Základní metodou je chromozómová analýza, jejímž výsledkem je stanovení karyotypu. Nejčastějším materiálem pro vyšetřování chromozómů v somatických buňkách během mitotického dělení jsou buňky periferní krve, kostní dřeň, choria anebo plodové vody. Pro svou snadnou dostupnost jsou často používány bílé krvinky (lymfocyty) periferní krve. Na přípravu krátkodobé buněčné kultury se používá vzorek heparinizované periferní krve. Mitotická aktivita lymfocytů se stimuluje fytohemaglutininem (extrakt z fazole, *Phaseolus vulgaris*), který se přidává do kultivačního media. Buněčná kultura se kultivuje v termostatu asi 24 - 72 hod při teplotě 37 °C (v závislosti na výchozím materiálu). Ke konci kultivace se do média přidává asi na 2 hod kolcemid, který naruší tvorbu dělicího vřeténka, a tak vyvolává nahromadění chromozómů a buněk ve stadiu metafáze. Buňky jsou dále vystaveny hypotonizaci a fixaci. Pak je buněčná suspenze nanášena na podložní skla a barvena nejčastěji Giemsovým barvivem. Vhodné mitózy se vyfotografují, chromozómy se roztřídí podle velikosti, umístění centromery a uspořádání proužků dle mezinárodně platné klasifikace (Pařížská dohoda, 1971) a sestaví se karyotyp. Pro jednoho pacienta je nutné takto setřídít a vyhodnotit asi 20 jednotlivých mitóz.

Metody barvení chromozómů

Až do r. 1970 bylo konvenční (homogenní) barvení Giemsovým barvivem jedinou barvicí metodou. Avšak jejím velkým nedostatkem bylo, že neumožňovala přesnou identifikaci jednotlivých chromozómů, samozřejmě i jejich aberací. Další pokrok nastal až s rozvojem nových barvicích metod, tzv. proužkovacích (banding) metod. V současné době dochází k útlumu klasického barvení, které je nahrazováno hybridizačními sondami s navázanými fluorochromy.

Q - banding - první metoda, kdy se k barvení chromozómů použilo fluorescenčních derivátů quinakrinu. Ve fluorescenčním mikroskopu se na chromozómech objeví příčné proužky jasně a méně jasně fluoreskující. Nevýhodou metody je nestabilita barvení.

G - banding - často používaná metoda, kdy se chromozómy vystaví účinku trypsinu, který denaturuje proteiny chromozómů a ty jsou obarveny Giemsovým barvivem. Na chromozómech vzniknou tmavé a světlé proužky, podle kterých lze přesně určit jednotlivé chromozómy, popřípadě i jejich anomálie.

R - banding - (R - reverse = opačný) - pruhy na chromozómech jsou vyvolány působením horkých alkalických roztoků a opět barvením Giemsovým barvivem. Vzniklé tmavé a světlé proužky na chromozómech jsou stabilní a při srovnání s G-proužky jsou umístěny opačně.

HRT - metoda – (high resolution technique) pozorování chromozómů v profázi. Metoda umožňuje registrovat mnohem větší počet proužků na chromozómech a sledovat tak jejich detailnější strukturu. Hodnocení je však velmi obtížné.

C - banding - významná barvicí metoda, kdy se na chromozómech barví konstituční heterochromatin, tj. oblast centromer a dlouhá ramena chromozómu Y. Neumožňuje však identifikaci jednotlivých chromozómů.

Metody proužkování chromozómů, zejména G-banding, umožňují přesnou identifikaci jednotlivých chromozómů a tedy sestavení karyotypu. Tímto způsobem lze sledovat nejen numerické, ale i strukturální aberace chromozómů.

V případě drobných změn nebo při podezření na komplexní změny karyotypu jsou klasické barvicí metody nedostatečné. Z toho důvodu se chromozómy „barví“ pomocí různě značených fluorescenčních hybridizačních sond, výsledný obraz pak skládá speciální software. Mezi takové metody patří např. M-FISH („Multicolour FISH“) umožňující detekovat celkové přestavby karyotypů nebo M-BAND („Multicolour banding“) umožňující jemnější rozlišení změn struktury jednotlivých chromozómů, založené na proužkování. Výsledkem cytogenetického vyšetření je tzv. *karyotyp/karyogram*, který zobrazuje reálné obrázky (fotky) seřazených chromozómů. Schématické znázornění je pak označováno jako *idiogram*.

Vyjádření karyotypu člověka

Fyziologický karyotyp somatické buňky člověka ($2n = 46$) se skládá ze 46 chromozomů, tj. 23 párů homologních chromozomů.

Žena: fyziologický karyotyp 46,XX

Je tvořen z 22 párů autozomů a z 1 páru gonozomů (pohlavních chromozomů) XX.

Muž: fyziologický karyotyp 46,XY

Je tvořen z 22 párů autozomů a z 1 páru gonozomů (pohlavních chromozomů) XY.

Pokud je nalezena nějaká aberace, zapisuje se tato změna do zjištěného karyotypu podle platné nomenklatury ISCN (The International System for Human Cytogenetic Nomenclature, 2016); např.

- 47,XX,+13 žena, jeden chromozóm 13 navíc (trisomie chromozomu 13)
- 46,XY,-5p muž, ztráta krátkého raménka chromozómu 5 (delece 5p)
- 46,XY,del(5)(q13q33) muž, ztráta části 5. chromozómu v oblasti 13 – 33 dlouhého raménka

ÚKOLY

1. Sestavte karyotyp člověka

PROVEDENÍ

Materiál

mikrofotografie metafáze lidských chromozómů - G-banding

Potřeby

nůžky, lepidlo, pinzeta, předloha sestaveného karyotypu

Pracovní postup

1. Vystříhejte jednotlivé chromozómy.
2. Seřadte je podle velikosti od největších po nejmenší, podle umístění centromery a zařadte do skupin A až G.
3. Ve skupinách A až G proveďte podle proužků na chromozómech jejich přesnou identifikaci.
4. Podle sestaveného karyotypu určete pohlaví vyšetřovaného jedince. Rozhodněte, zda jde o fyziologický nebo patologický karyotyp, a pomocí symbolů запиšte.

ZÁVĚR

Uveďte a zhodnoťte výsledek úkolu.

Pozn.**ISCN symboly a zkratky**základní přehled podle *ISCN (2016)*, S. Karger, Basel. (v angličtině)

add	additional material of unknown origin
approximate sign (~)	denotes intervals and boundaries of a chromosome segment or number of chromosomes, fragments, or markers; denotes a range of number of copies of a chromosomal region when the exact number cannot be determined
arr	microarray
arrow (-> or →)	from - to, in detailed system
brackets, square ([])	surround number of cells or genome build
cen	centromere
cgh	comparative genomic hybridization
chr	chromosome
cht	chromatid
colon, single (:)	break, in detailed system
colon, double (::)	break and reunion, in detailed system
comma (,)	separates chromosome numbers, sex chromosomes, and chromosome abnormalities, separates locus designations
cp	composite karyotype
decimal point (.)	denotes sub-bands
del	deletion
der	derivative chromosome
dic	dicentric
dn	designates a chromosome abnormality that has not been inherited (de novo)
dup	duplication
fra	fragile site
h	heterochromatin, constitutive
hmz	homozygous, homozygosity; used when one or two copies of a genome are detected, but previous, known heterozygosity has been reduced to homozygosity through a variety of mechanisms, e.g. loss of heterozygosity (LOH)
hsr	homogeneously staining region
htz	heterozygous, heterozygosity
i	isochromosome
idic	isodicentric chromosome
ins	insertion
inv	inversion
mar	marker chromosome
mat	maternal origin
mos	mosaic
p	short arm of chromosome
parentheses ()	surround structurally altered chromosomes and breakpoints; surround chromosome numbers, X, and Y in normal and abnormal results; surround coordinates (or nucleotide positions) in abnormal result
pat	paternal origin
ps	satellited short arm of chromosome
pter	terminal end of the short arm
q	long arm of chromosome
qter	terminal end of the long arm
question mark (?)	questionable identification of a chromosome or chromosome structure
r	ring chromosome
rec	recombinant chromosome
rob	robertsonian translocation
s	satellite
sce	sister chromatid exchange
sdl	sideline
seq	sequencing
slant line, single (/)	separates clones, or contiguous probes
stk	satellite stalk
subtel	subtelomeric region
t	translocation
tas	telomeric association
ter	terminal (end of chromosome) or telomere
upd	uniparental disomy
var	variant or variable region

***In Situ* Hybridization: Symbols and Abbreviations**

minus sign (-)	loss; decrease in length; locus absent from a specific chromosome
plus sign, single (+)	additional normal or abnormal chromosomes; increase in length locus present on a specific chromosome
plus sign, double (++)	two hybridization signals or hybridization regions on a specific chromosome
multiplication sign (x)	multiple copies of rearranged chromosomes; designates aberrant polyploidy clones in neoplasias; with number to indicate number of signals seen; multiple copies of a chromosome or chromosomal region
period (.)	separates various techniques
semicolon (;)	separates altered chromosomes and breakpoints in structural rearrangements involving more than one chromosome; separates probes on different derivative chromosomes
FISH	fluorescence in situ hybridization
ish	in situ hybridization; when used without a prefix applies to metaphase or prometaphase chromosomes of dividing cells
wcp	whole chromosome paint