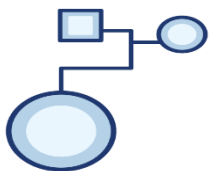


Цитогенетические методы: кариотипирование, FISH

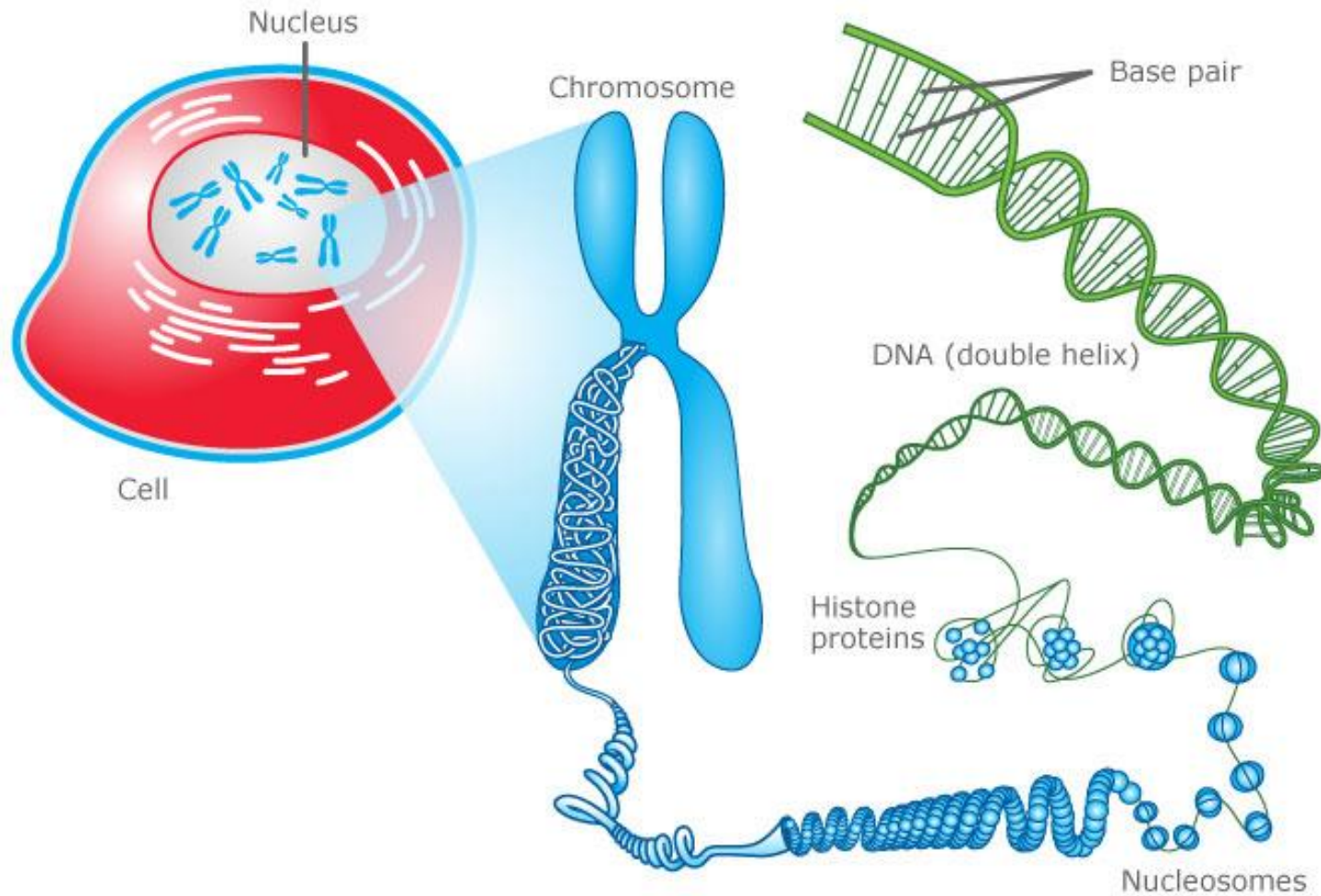
Михаил Кибанов, к.б.н.



Генетические школы
genschool.ru


Лекция прочитана в рамках проекта genschool.ru,
октябрь 2016 г.

Цитогенетика: где мы?



Цитогенетика


Изучение генетической конституции клеток человека с помощью визуализации и анализа хромосом



Совокупность методов анализа

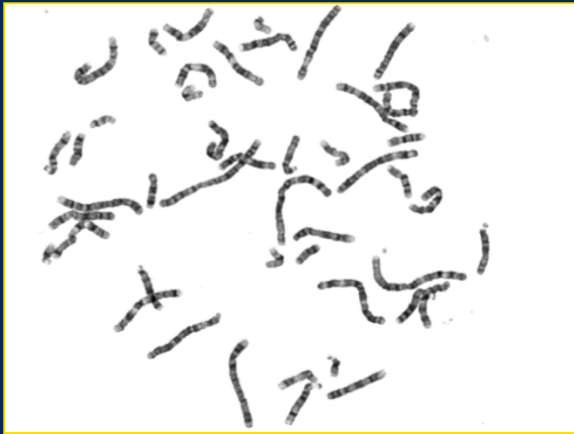


Выявление типа хромосомной аномалии

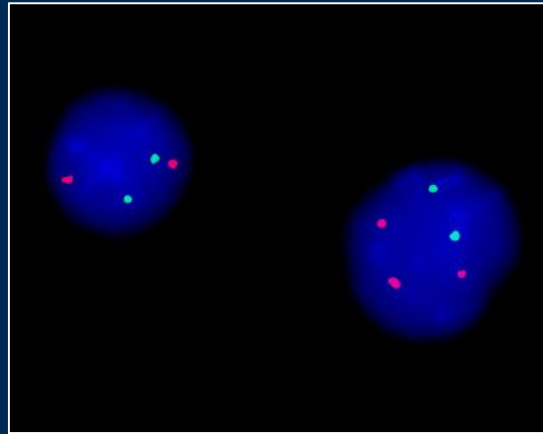


Установление взаимосвязи между аномальным фенотипом пробанда и хромосомной патологией

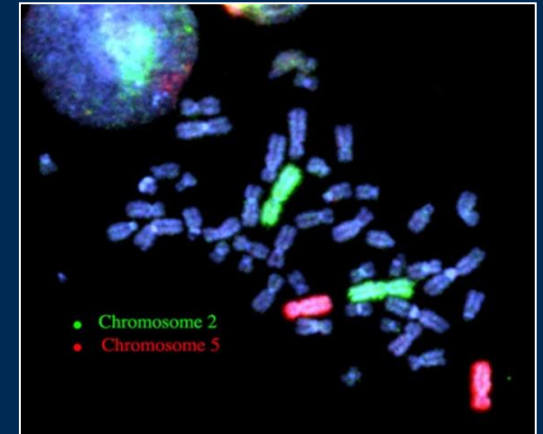
Методы



Кариотипирование



Interphase-FISH



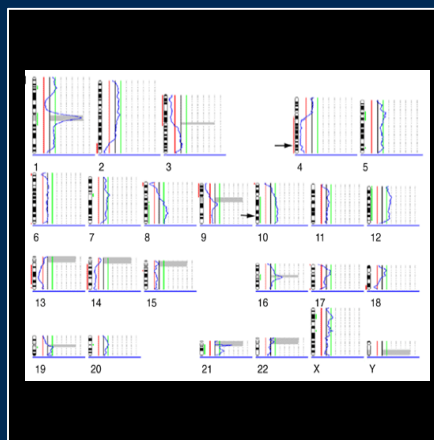
Metaphase FISH



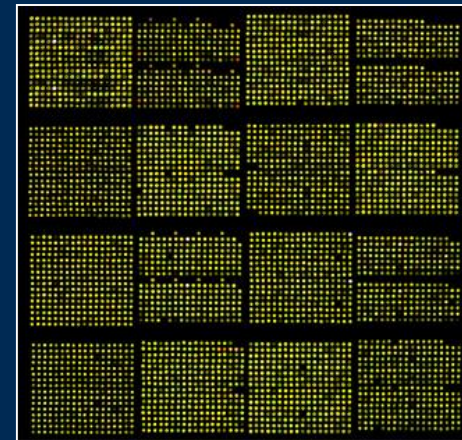
Multi-color FISH



MCB-FISH

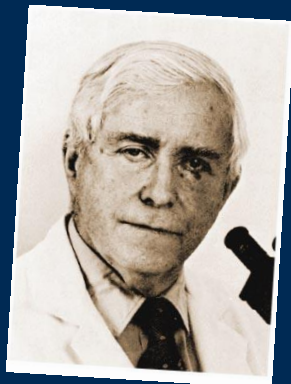


CGH



Array-CGH

«Рождение» медицинской цитогенетики



Joe Hin Tjio Albert Levan

1956 г: нормальный хромосомный набор человека - 46 хромосом

The chromosome number in man.
JOE HIN TJIO and ALBERT LEVAN.
Hereditas, vol. 42, pp. 1-6

1959 г: хромосомный набор пациентов с синдромом Дауна - 47 хромосом

[Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children].

LEJEUNE J, GAUTIER M, TURPIN R.
C R Hebd Seances Acad Sci. 248(11):1721-2.
French



«Золотой век» цитогенетики

• 1959

- Генетическая природа синдрома Клайнфельтера

A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. JACOBS PA, STRONG JA. Nature. 1959 Jan 31; 183(4657):302-3.

- Генетическая природа синдрома Шерешевского-Тернера

A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). FORD CE, JONES KW, POLANI PE, DE ALMEIDA JC, BRIGGS JH. Lancet. 1959 Apr 4;1(7075):711-3.

• 1960

- Генетическая природа синдрома Патау (+13)

Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. PATAU K, SMITH DW, THERMAN E, INHORN SL, WAGNER HP. Lancet. 1960 Apr 9;1(7128):790-3.

- Генетическая природа синдрома Эдвардса (+18)

A new trisomic syndrome. EDWARDS JH, HARNDEN DG, CAMERON AH, CROSSE VM, WOLFF OH. Lancet. 1960 Apr 9;1(7128):787-90.

Хромосомные аномалии

Числовые (геномные мутации)

Полипloidия

- триплоидия ($3n=69$)
- тетраплоидия ($4n=92$)

Анеуплоидия

- трисомия ($2n+1=47$)
- моносомия ($2n-1=45$)
- нуллисомия ($2n-2=44$)
- полисомия ($47, XXXX$)

Структурные (хромосомные мутации)

- Реципрокные транслокации (rscr)
- Робертсоновские транслокации (rob)
- Инсерции (ins)
- Делеции (del)
- Дупликации (dup)
- Инверсии (inv)
- Изохромосомы (i)
- Кольцевые хромосомы (r)
- Маркерные хромосомы (mar)

Кариотипирование

Культивирование клеток

- Лимфоциты
- Клетки ворсин хориона
- Амнициты
- Фибробласты

- Колхицин
- Кольцемид

Блок на стадии метафазы
МИТОЗА

Гипотоническая обработка

- 0.075 M KCl
- «-» Наложение хромосом
- «+» Потеря хромосом

Фиксация

- Фиксатор Карнуа
- $\frac{1}{4}$ Уксусная кислота
- $\frac{3}{4}$ метанол
- 2-3 последовательные фиксации

Приготовление препаратов
хромосом

Влажность!!!

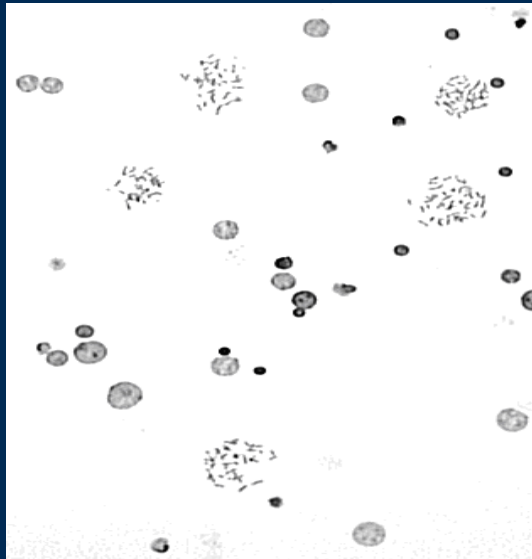
GTG
RNG
CBG
NOR

Дифференциальное
окрашивание
хромосом

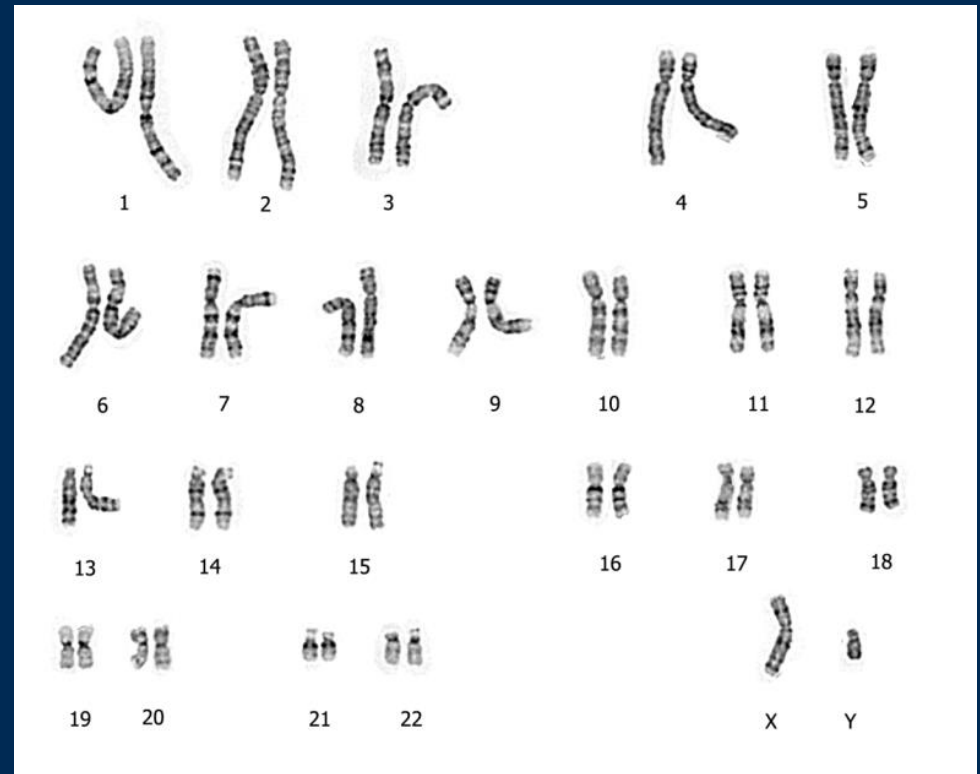
Кариограмма



Препарат метафазных хромосом при x100



Метафазная пластинка при x1000



G-окрашивание

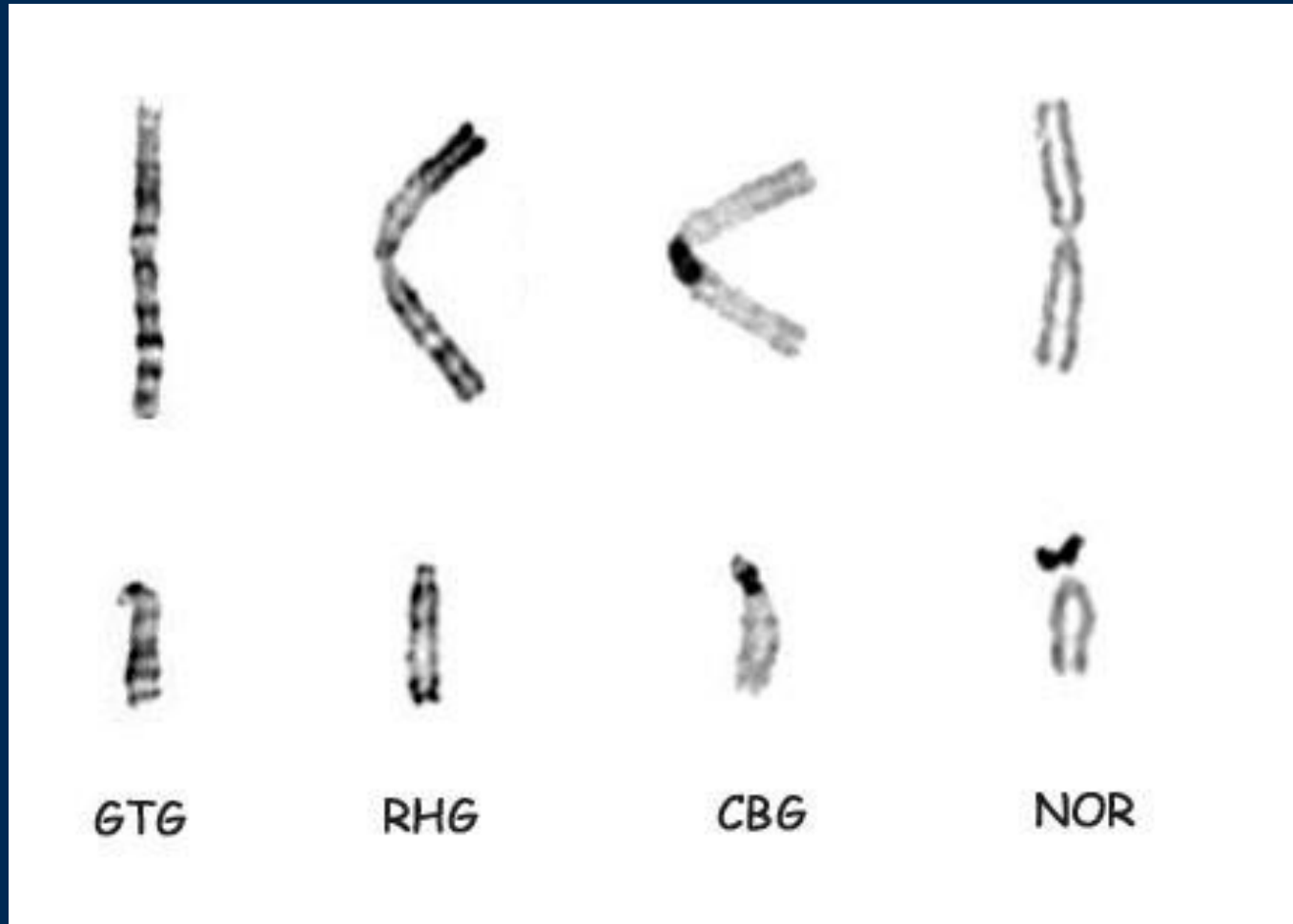
Кариотип:

46,XX

46,XY

Согласно
ISCN!

Варианты дифференциального окрашивания



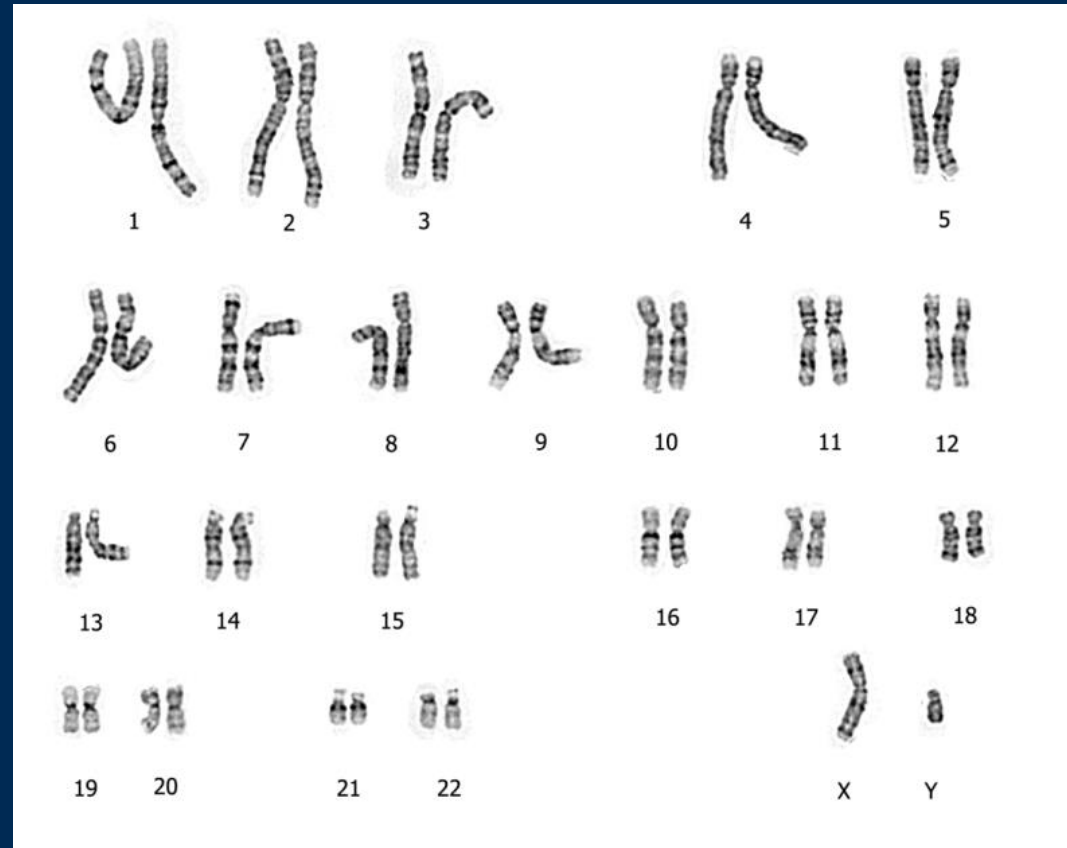
G-окрашивание (GTG: G-banding Trypsin Giemsa)

Наиболее распространенный метод дифференциального окрашивания

- Легко воспроизводимый
- Четкий рисунок
- Не происходит повреждения ДНК → FISH

«-»

- слабое окрашивание концевых участков хромосом
- Нарушение морфологии хромосом



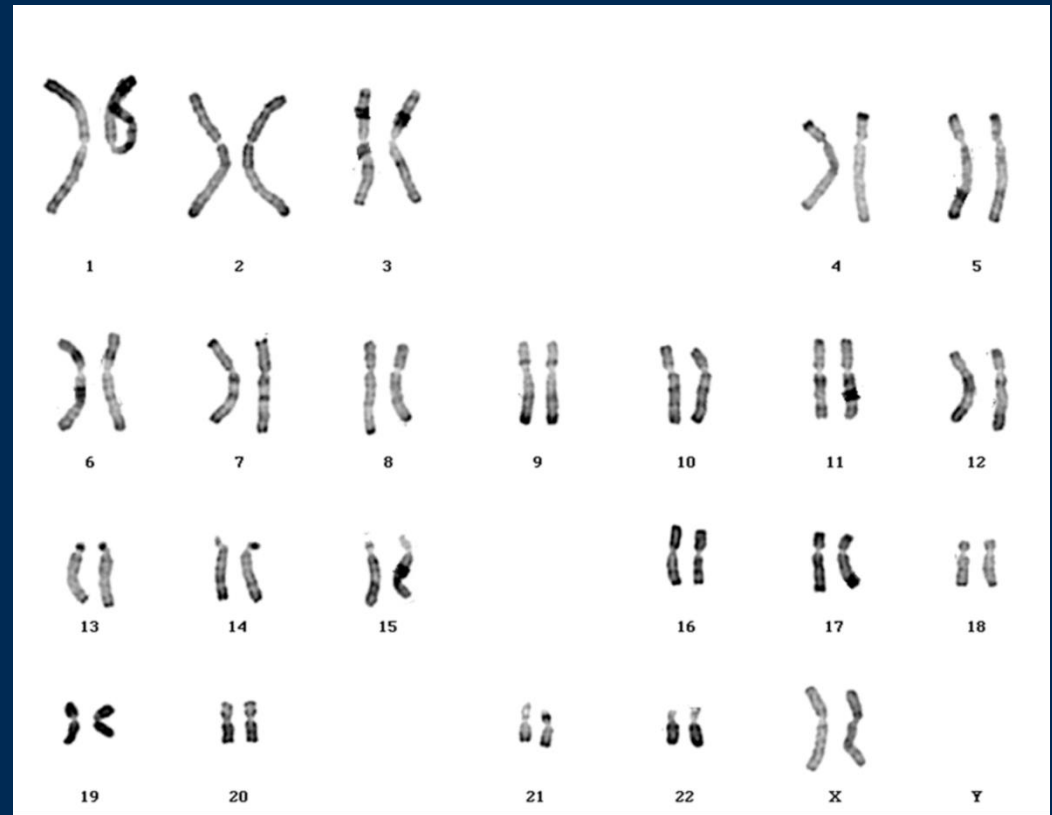
R-окрашивание (RHG: R-bands Heating Giemsa)

Альтернативный GTG-методу способ дифференциальной окраски:

- Рисунок окраски противоположен G-рисунку
- Лучшее окрашивание теломер
- Лучшее сохранение морфологии хромосом

«-»

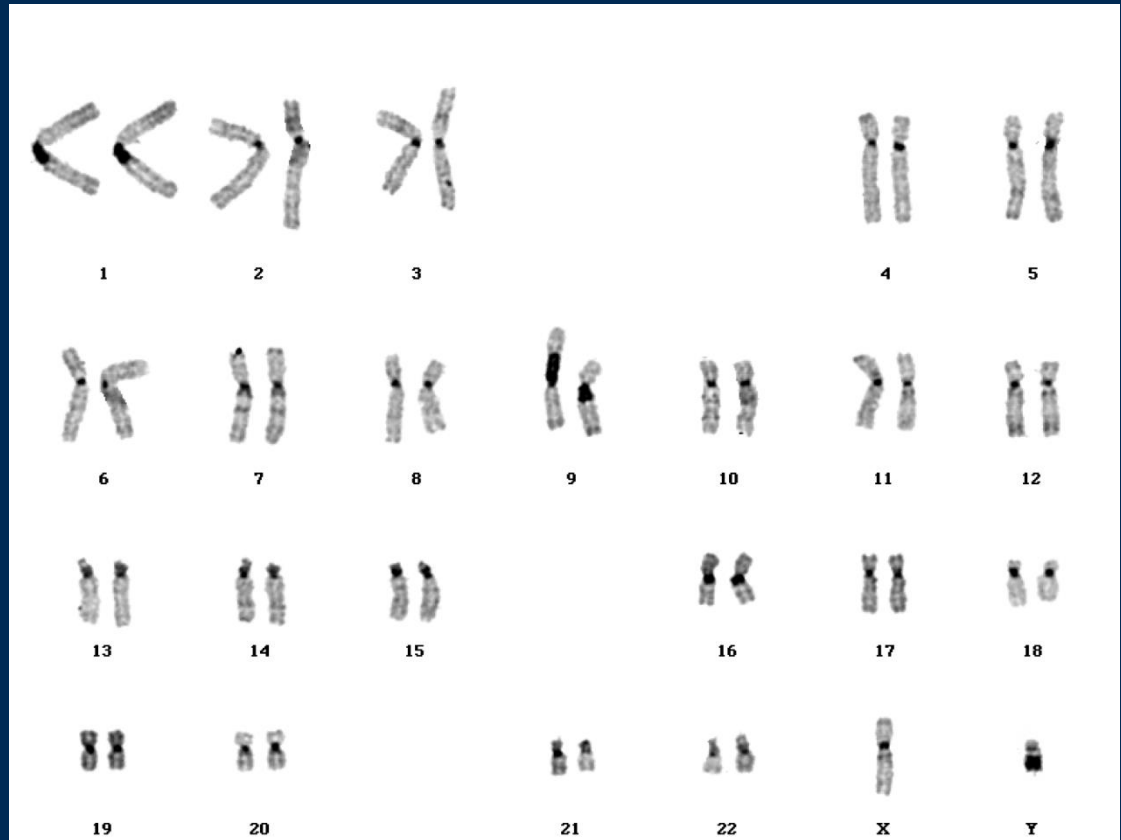
- Более «капризный» метод (t, pH) → менее воспроизводимый
- Повреждение ДНК



C-окрашивание (CBG: C-bands Barium hydroxide Giemsa)

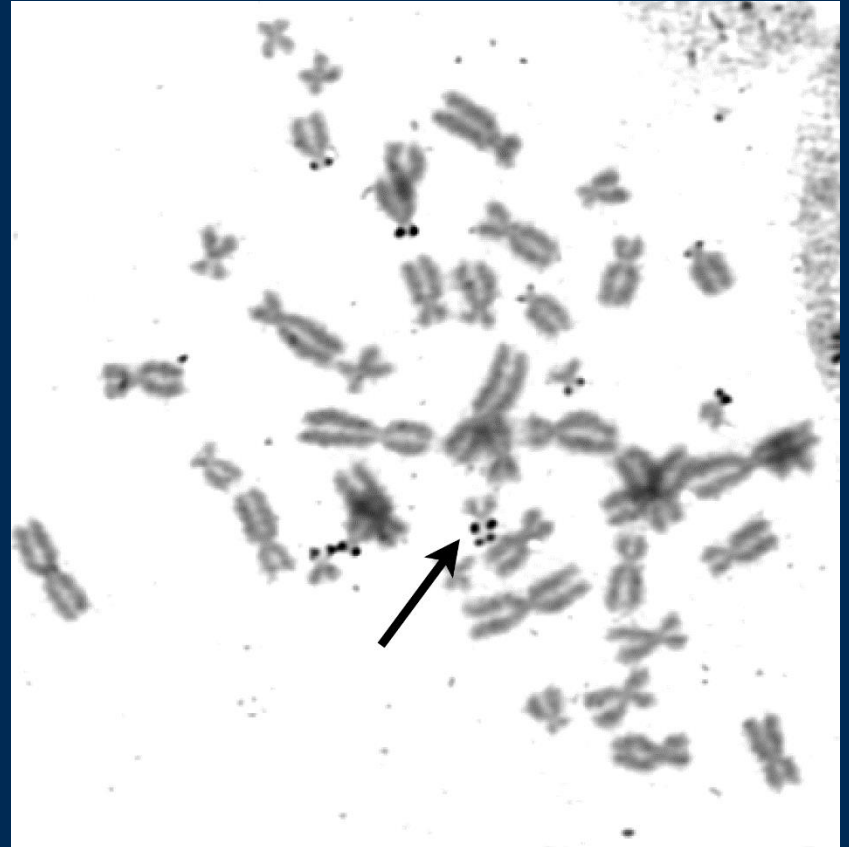
Метод избирательного
окрашивания
прицентромерного
гетерохроматина:

- Центромерные районы
всех хромосом
- Полиморфные
гетерохроматиновые
блоки (1,9,16,Y)

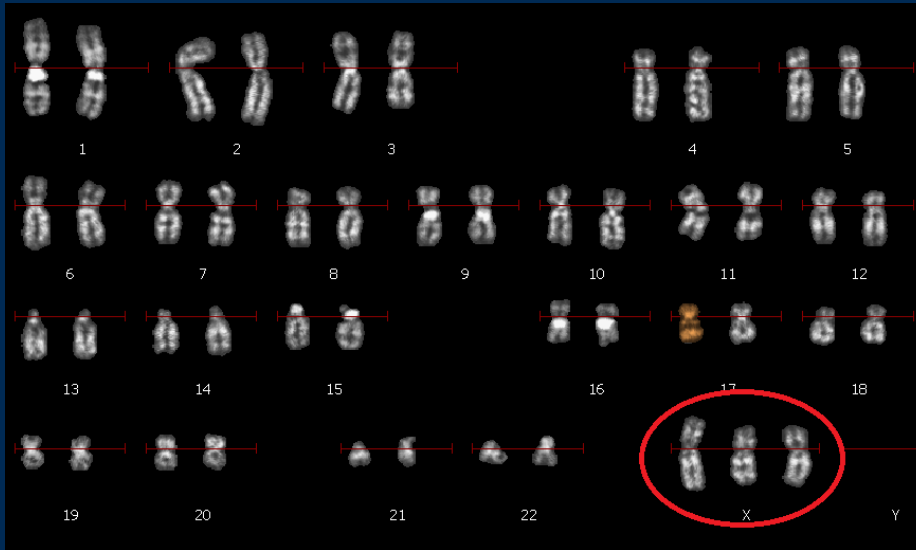


NOR-окрашивание (Nucleolar organizers)

Метод избирательного
окрашивания активных
ядрышкообразующих районов
acrocentric хромосом
(13, 14, 15, 21, 22)



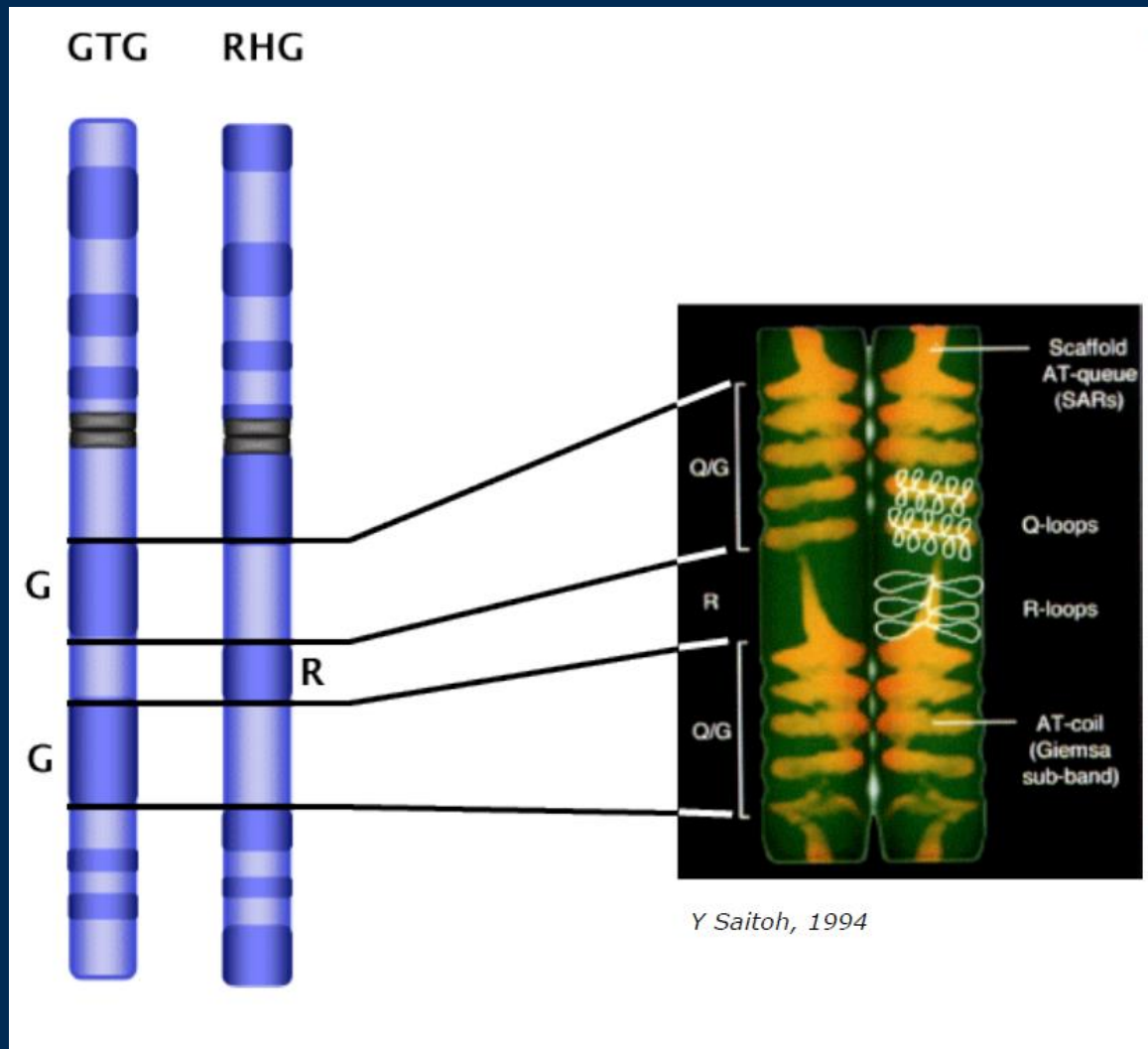
Окрашивание с помощью Hoechst 33258, контрастирование Актиномицином D



Скрининговый метод
окрашивания
Морфология хромосом
соответствует G-окрашиванию



Молекулярная природа G- и R-сегментов



G-сегменты:

- АТ-богатые
- Гены, определяющие тканеспецифичную дифференцировку
- Репликация в позднюю S-фазу
- LINE+

R-сегменты

- GC-богатые
- Гены «домашнего хозяйства»
- Репликация в ранней S-фазе
- SINE+, Alu+

Разрешение

Условия приготовления
препаратов хромосом



Морфология
хромосом



Разрешение



Количество
сегментов

300

400

500

550

650

1000

Среднее
разрешение,
Мб

>30

20

10

5

3

1-2

Кариотипирование: «+» и «-»

«-» Культура живых клеток с высокой митотической активностью

- Преимущественная пролиферация клеток с нормальным кариотипом (или наоборот)
- Невозможность анализа при отсутствии делящихся клеток

«-» Относительно невысокая разрешающая способность - 10 Мв

- Невозможность определения микрохромосомных перестроек (делеций, дупликаций, инверсий, инсерций)

«-» Качество анализа зависит от опыта исследователя и качества препаратов (морфологии хромосом, окрашивания)

- Невозможность определения хромосомной принадлежности генетического материала при отсутствии четкого рисунка

«+» анализ структуры и количества непосредственно хромосом

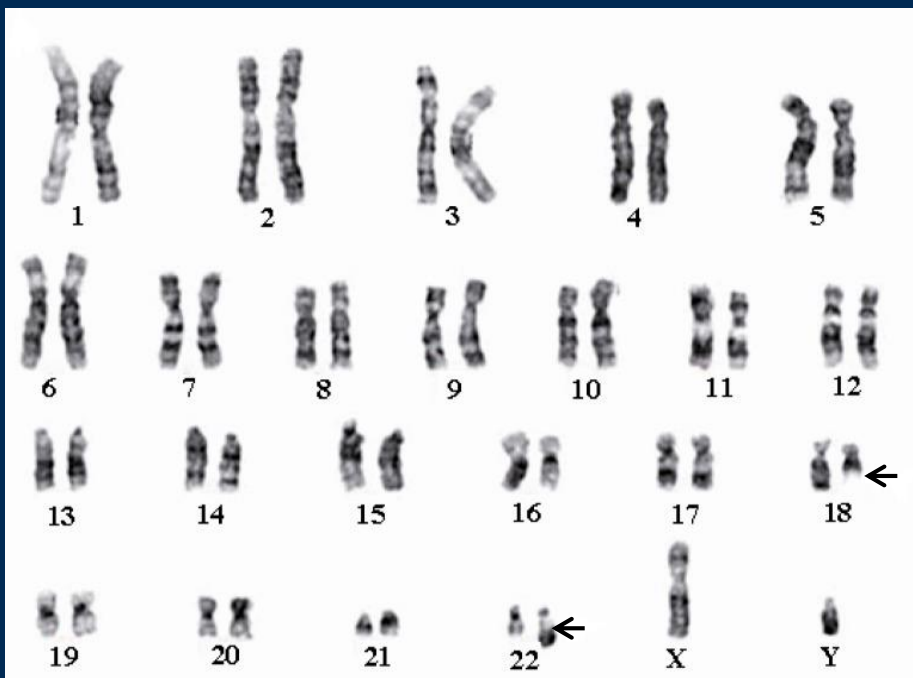
- Выявление сбалансированных транслокаций, маркерных хромосом, мозаицизма

Хромосомные перестройки у супружеских пар с бесплодием

Наличие сбалансированной хромосомной транслокации у одного из партнеров приводит к систематическим невынашиваниям и ранним абортam; является причиной сниженной мужской фертильности

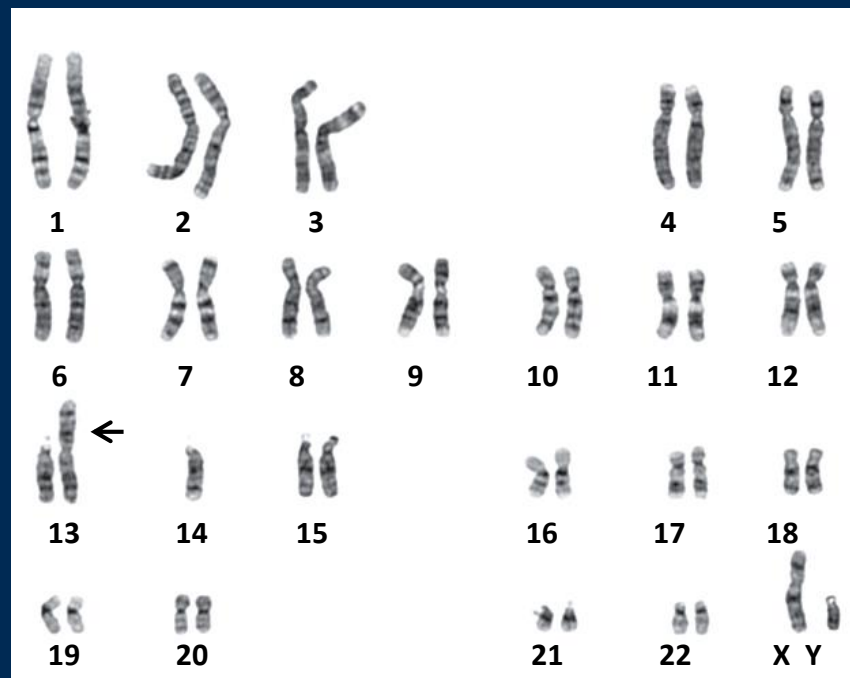
Реципрокные транслокации

46,XY,t(18;22)(q21.1;q12)

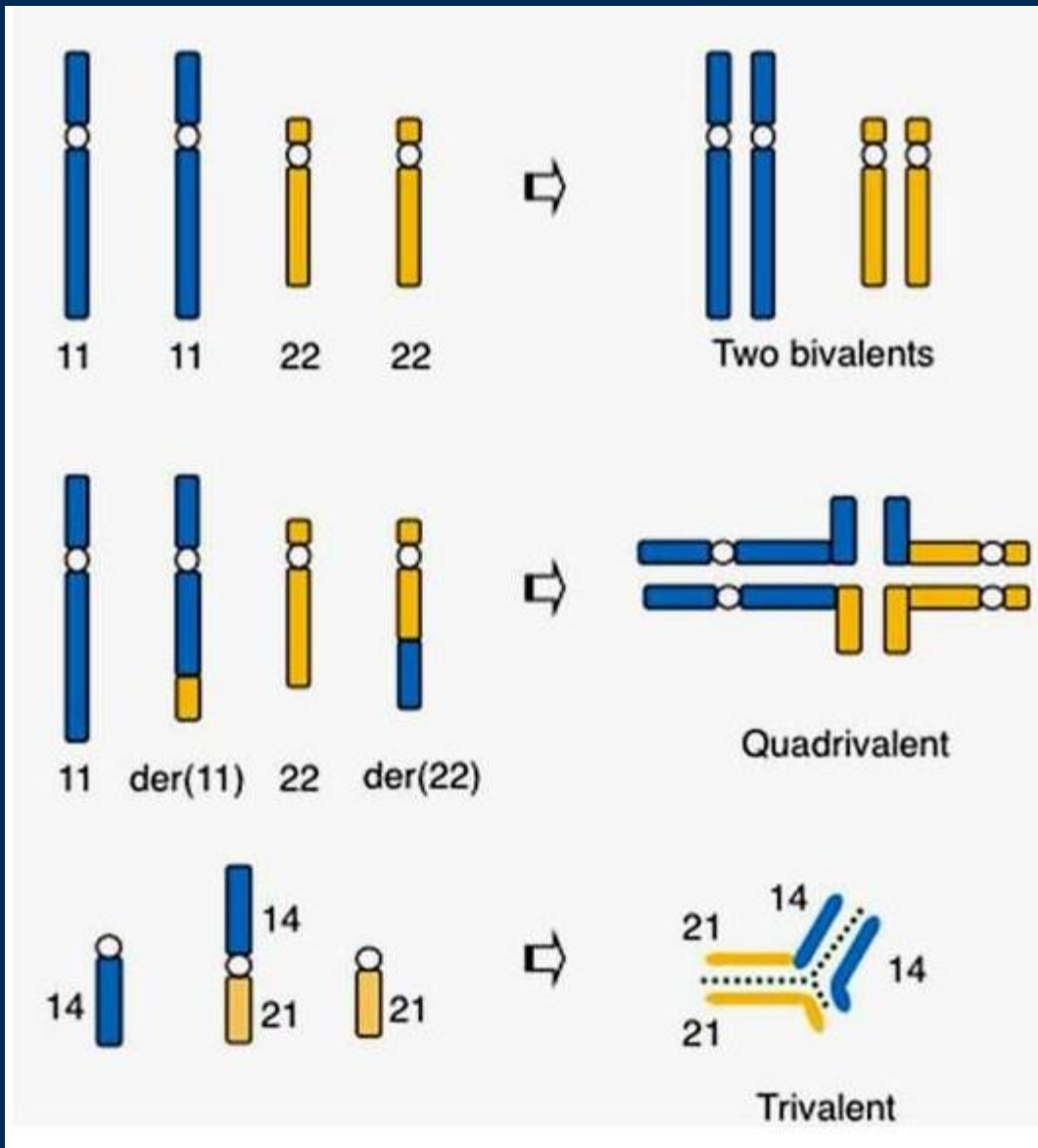


Робертсоновские транслокации

45,XY,rob(13;14)(q10;q10)



Варианты сегригации хромосом у носителей Робертсоновских и реципрокных транслокаций в МІ

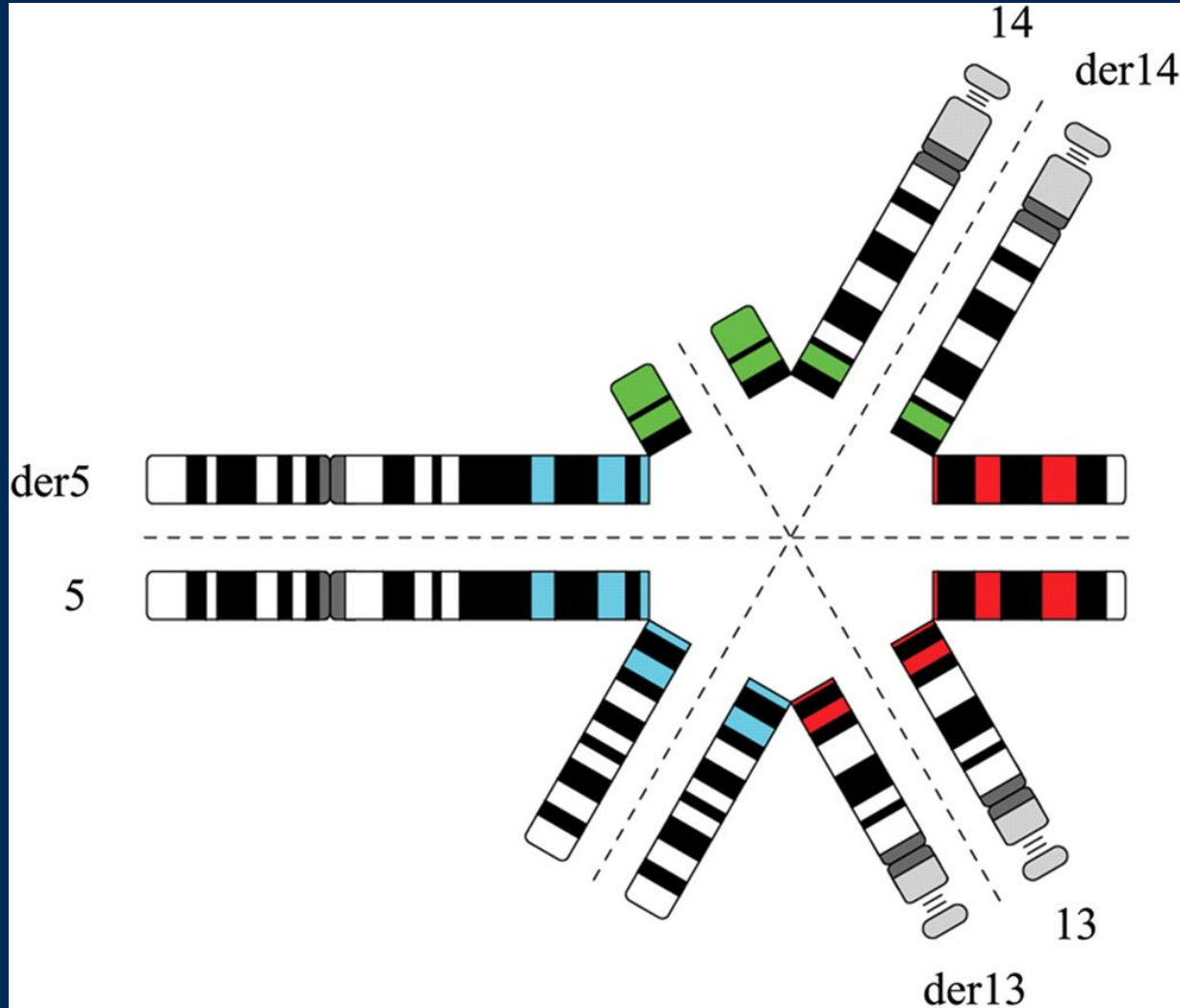


- 2 варианта
- Оба - норма

- 16 возможных вариантов
- Один - норма
- Один - сбалансированный

- 6 возможных вариантов
- Один - норма
- Один - сбалансированный

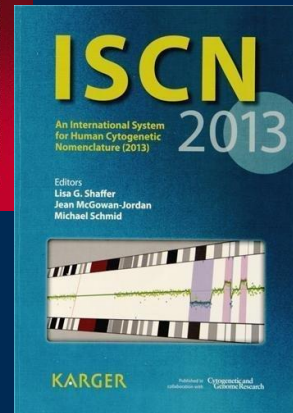
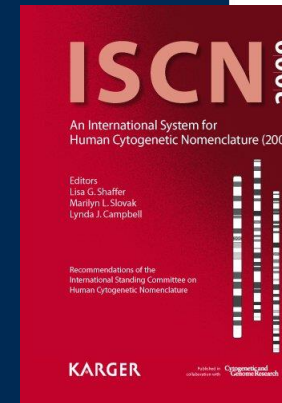
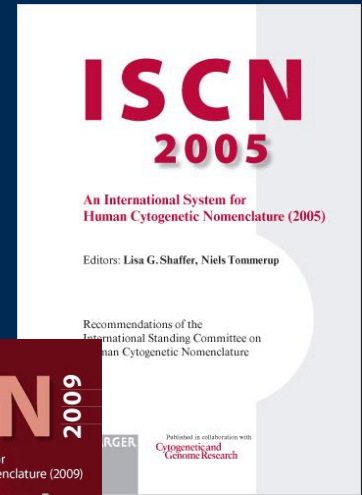
Комплексные хромосомные аномалии (complex chromosomal rearrangements - CCRs)



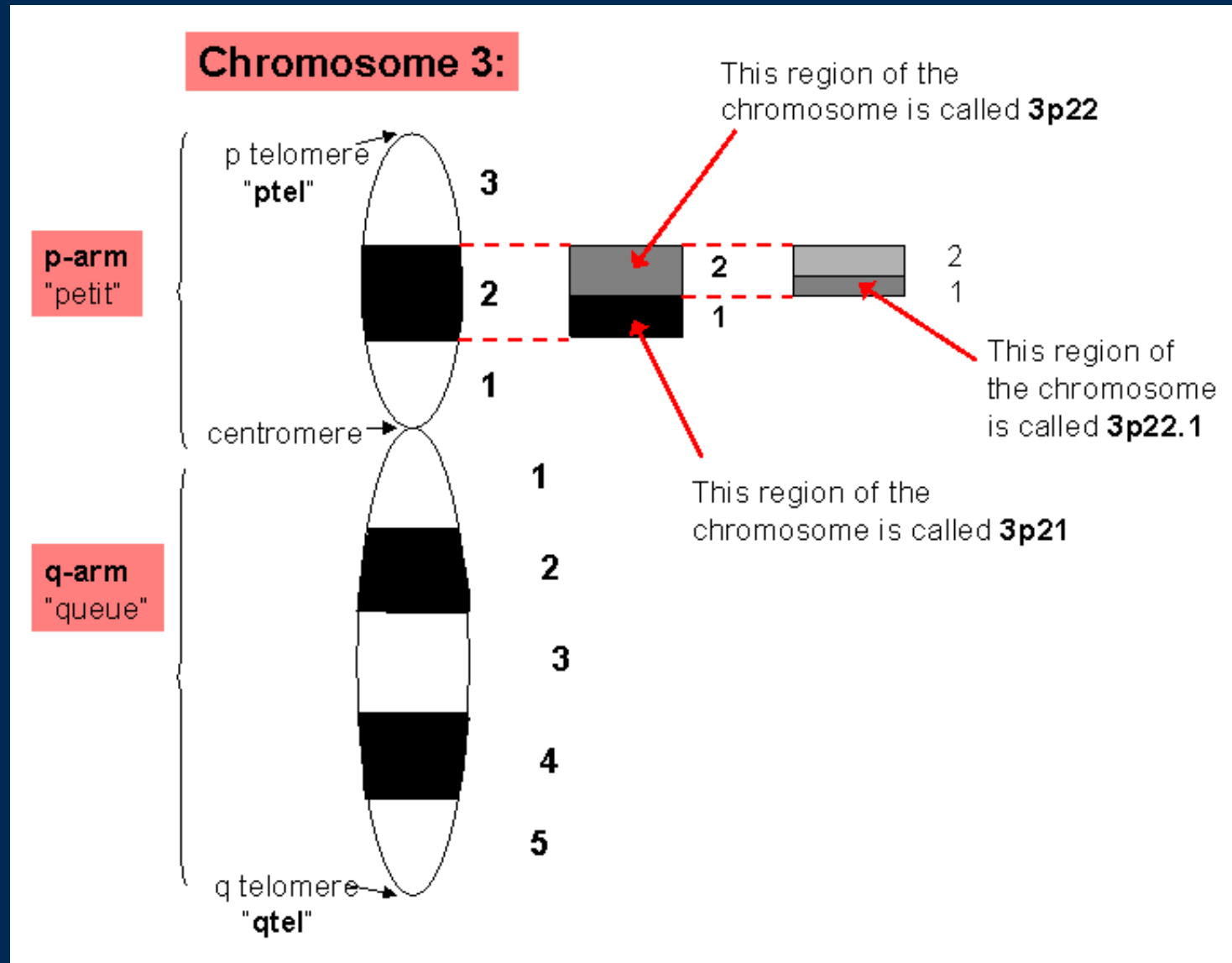
ISCN

An International System for Human Cytogenetic Nomenclature

- 1960, Денвер:
первые шаги по классификации хромосом человека
(по размеру, центромерному индексу)
- 1963, Лондон:
хромосомы разбиты на группы от A до G
- 1966, Чикаго:
короткое плечо – «p» (petit)
длинное плечо – «q» (m, n, o, p, q, r, s)
- 1971, Париж:
заложены основные принципы ISCN
- 1977, Стокгольм:
обобщение и сведение результатов всех предыдущих встреч
- 1978, первая ISCN
- 1980, Париж. 1994, Мемфис. 2004, 2008, Ванкувер.
2012 Сиэтл



Номенклатура морфологии хромосом после дифференциального окрашивания

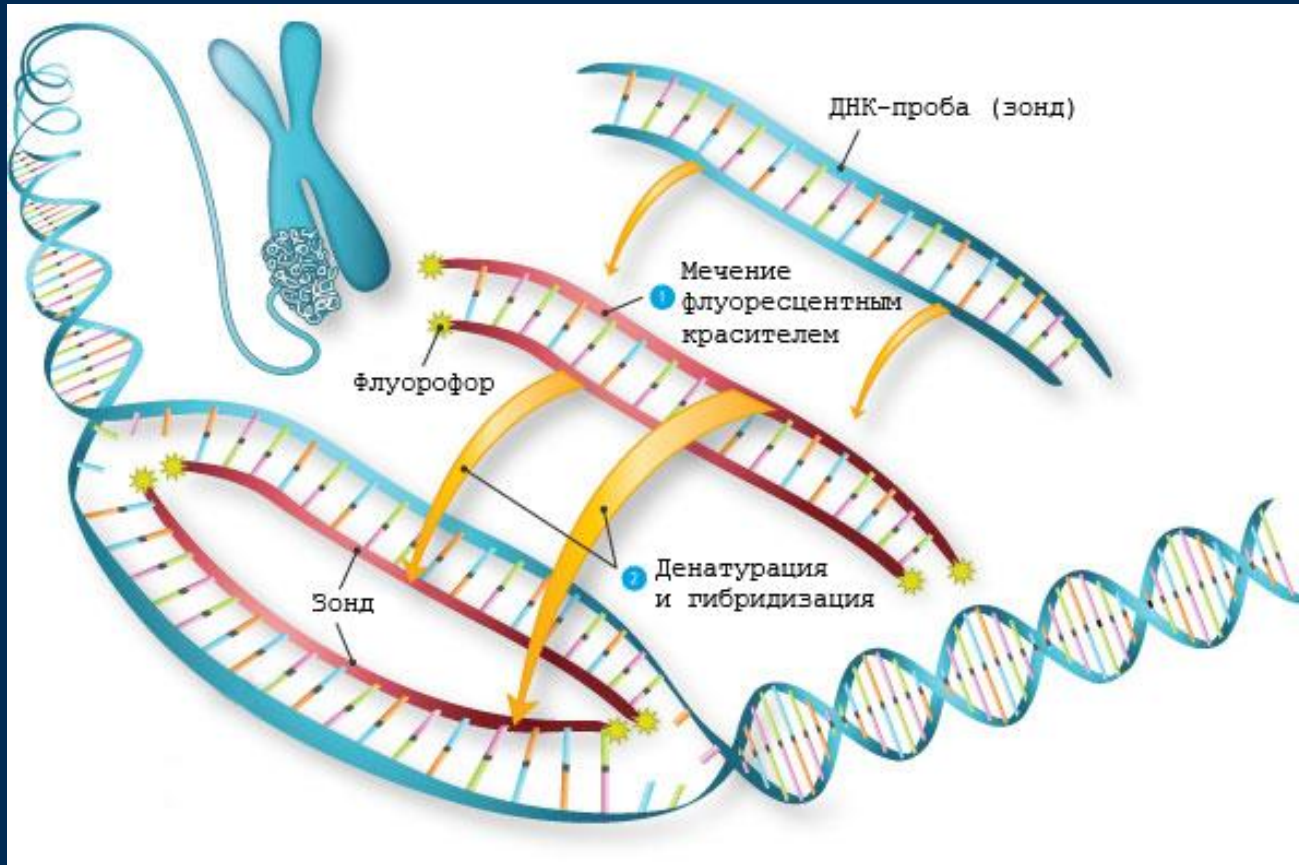


Основные принципы обозначения аномального кариотипа

- 50,X,+X,-Y,+10,+14,+17,+21
- 46,t(X;18)(p11.1;q11.2),t(Y;1)(q11.2;p13)
- 47,Y,t(X;13)(q27;q12),inv(10)(p13q22),r(10)(p12q25),+21
- 49,X,inv(X)(p21q26),+3,inv3(q21q26.2),+7,+10,-20,del(20)(q11.2),+21
- 50,XX,+1,+del(1)(p13),+dup(1)(q21q32),+inv(1)(p34q41),+8,-21
- 52,XY,.... ,+r,+mar

Гибридизация *in situ*

«рождение» молекулярной цитогенетики: 1980-е



Мечение с помощью радиоизотопов

Мечение с помощью флуоресцентных красителей - Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

FISH: «+» и «-»

- «±» Таргетный анализ: зависит от специфичности используемого ДНК-зонда
- «+» Разрешающая способность - 100-300 Кв
 - Возможность определения микрохромосомных перестроек (делеций, дупликаций, инверсий, инсерций)
- «+» Более объективный метод анализа
- «+» Относительно легкий, быстрый и хорошо воспроизводимый метод
- «+» Возможность проведения анализа на культурах клеток с низкой митотической активностью, фиксированных клетках и тканях (interphase FISH)

Области применения FISH

Преимплантационная генетическая диагностика

- Преимплантационный генетический скрининг (определение анеуплоидий хромосом 13,15,16,17, 18,21,22,X,Y)
- Преимплантационная генетическая диагностика (исследование дериватных хромосом у носителей хромосомных перестроек)

Пренатальная диагностика

- Скрининг основных анеуплоидий некультивированных клеток амниотической жидкости
- Уточнение/верификация результатов стандартного цитогенетического исследования

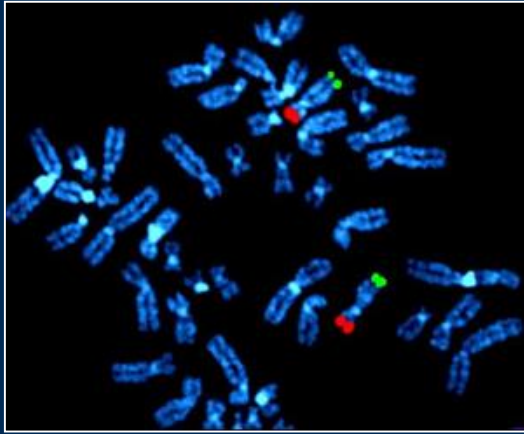
Постнатальная диагностика

- Уточнение/верификация результатов стандартного цитогенетического исследования
- Исследование сложных перестроек - тройных и более сложных транслокаций, инсерций
- Определение степени мозаицизма
- Исследование природы маркерных хромосом
- Исследование хромосомных перестроек в онкогематологии
- Диагностика солидных опухолей
- Скрининг анеуплоидий сперматозоидов

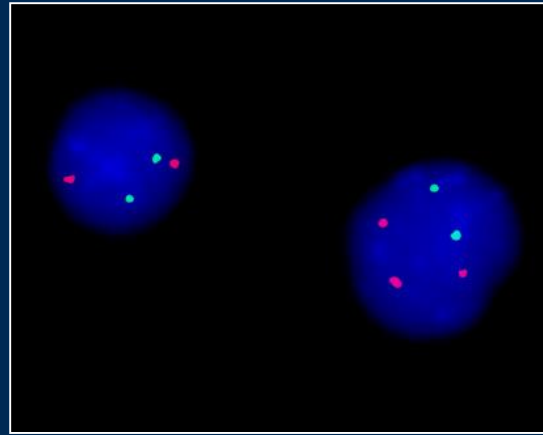
ДНК-пробы

- **LSI** - локус-специфичные пробы
(locus specific identifiers)
- **CEP** - центромероспецифичные пробы
(chromosome enumeration probes)
- **WCP** - цельнохромосомные пробы
(whole chromosome painting probes)
- **SubTel** - субтеломерные пробы (хромосомоспецифичные)
(subtelomere probes)
- **Telp/Telq** - теломероспецифичные пробы
(telomere probes)

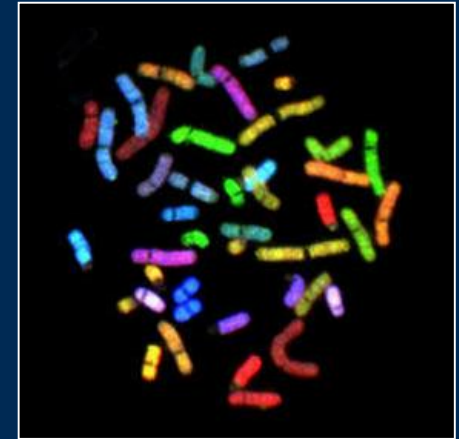
Варианты FISH



Metaphase FISH



Interphase FISH



Multi-color FISH



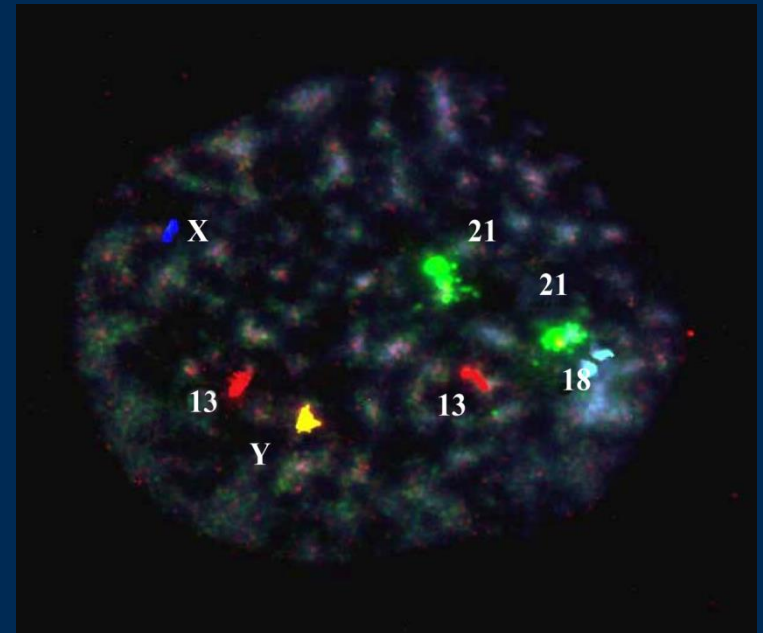
MCB-FISH

LSI – локус-специфичные пробы (locus specific identifiers)

- Специфичны к строго определенным последовательностям ДНК

Используются в диагностике:

- Анеуплоидий
- Делеций → Микроделеционных синдромов
- Дупликаций
- Инверсий
- Транслокаций
- Уточнение точек разрыва при хромосомных перестройках

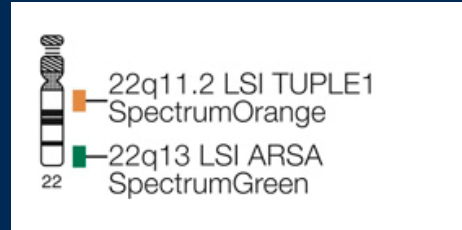


nuc ish Xcen(DXZ1x1),Ycen(DYZ3x1),13q14(RB1x2),
18cen(D18Z1x1),21q22(D21S341x2)

PGT multicolor probe mix (Abbott molecular): X – blue, Y – gold, 13 – red, 18 – aqua, 21 – green.

Микроделеционные синдромы, выявляемые с помощью FISH

- Cri-du-Chat
- Miller-Dieker Syndrome
- Smith-Magenis Syndrome
- DiGeorge/Velo-Cardio-Facial/CATCH-22/Shprintzen Syndrome
- Kallman Syndrome
- Williams Syndrome
- Wolf-Hirschhorn
- Prader-Willi/Angelman Syndrome



Анализ методом FISH с использованием пробы, специфичной к 22q11.2 (DiGeorge Syndrome critical region) - сигнал красного цвета. Сигнал зеленого цвета - внутренний контроль.



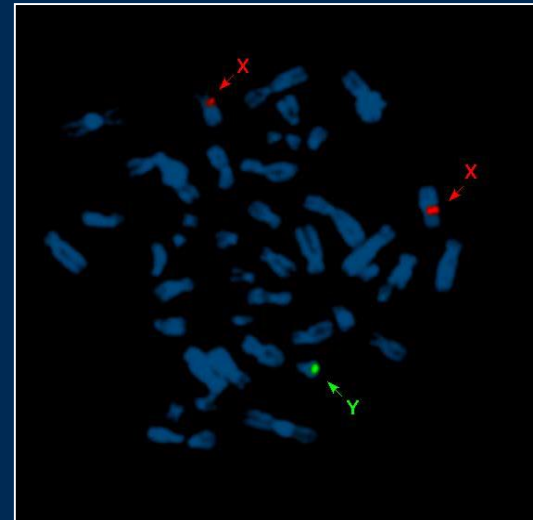
СЕР – центромероспецифичные пробы (chromosome enumeration probes)

- Специфичны к центромерным и прицентромерным повторам ДНК

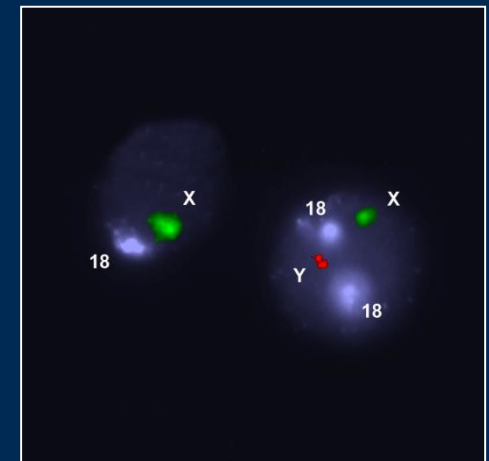
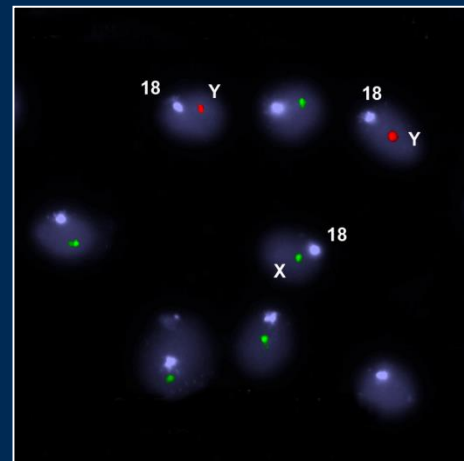
Используются в
диагностике:

- Быстрый скрининг анеуплоидий
- Транслокаций
- Определение природы центромеры маркерных хромосом

Скрининг анеуплоидий
хромосом сперматозоидов



47, XXY

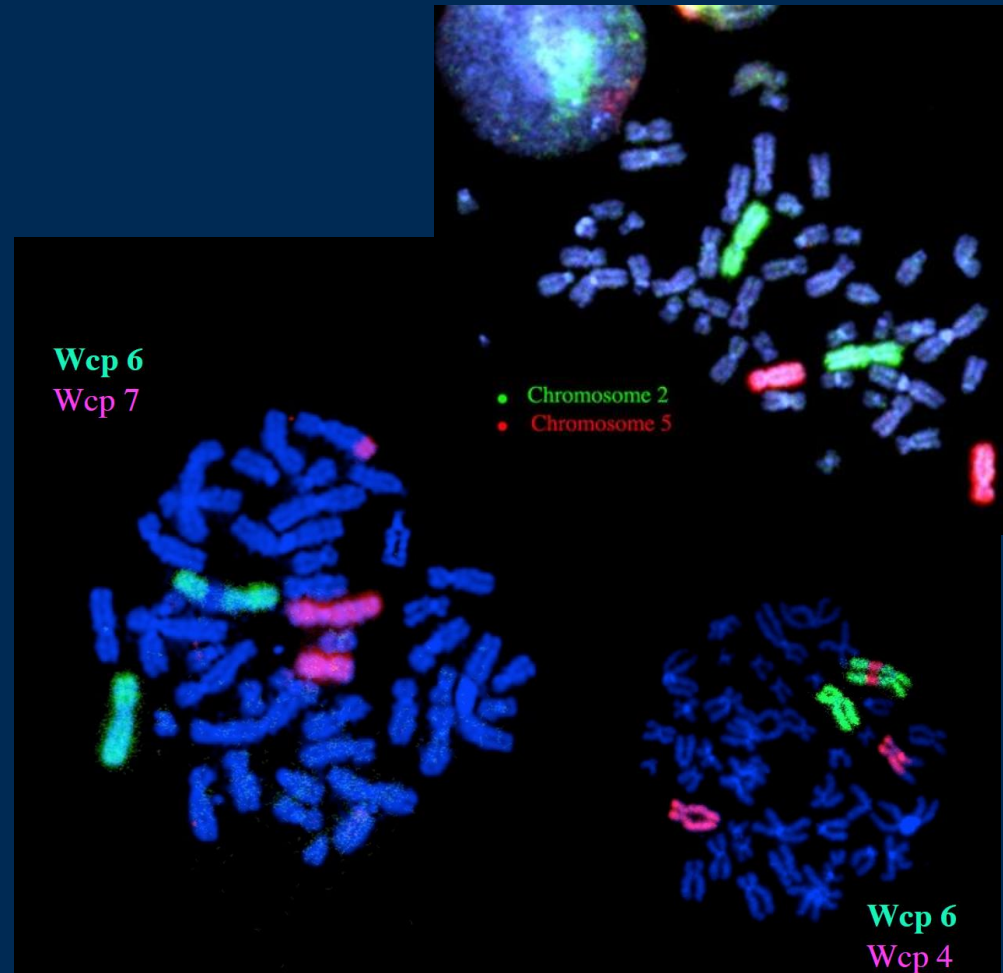


WCP- целнохромосомные пробы (whole chromosome painting probes)

Специфичны в отношении всей хромосомы - окрашивание p- и q-плечей

Используются в диагностике:

- Исследование хромосомных перестроек - транслокаций, инсерций
- Верификация, уточнение результатов кариотипирования
- Определение природы маркерных хромосом, дополнительного хромосомного материала

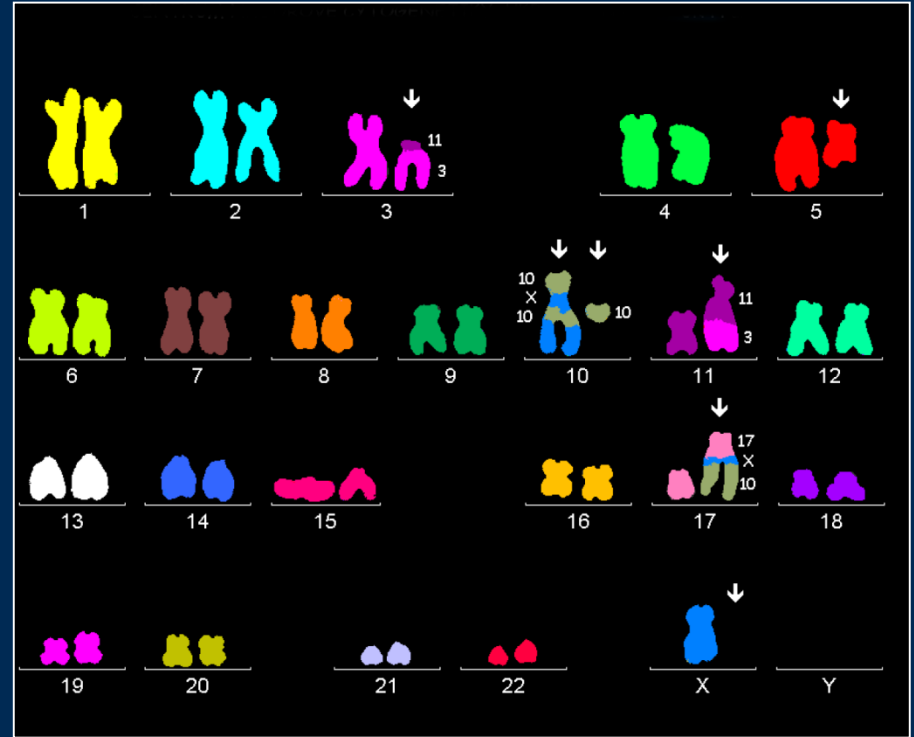
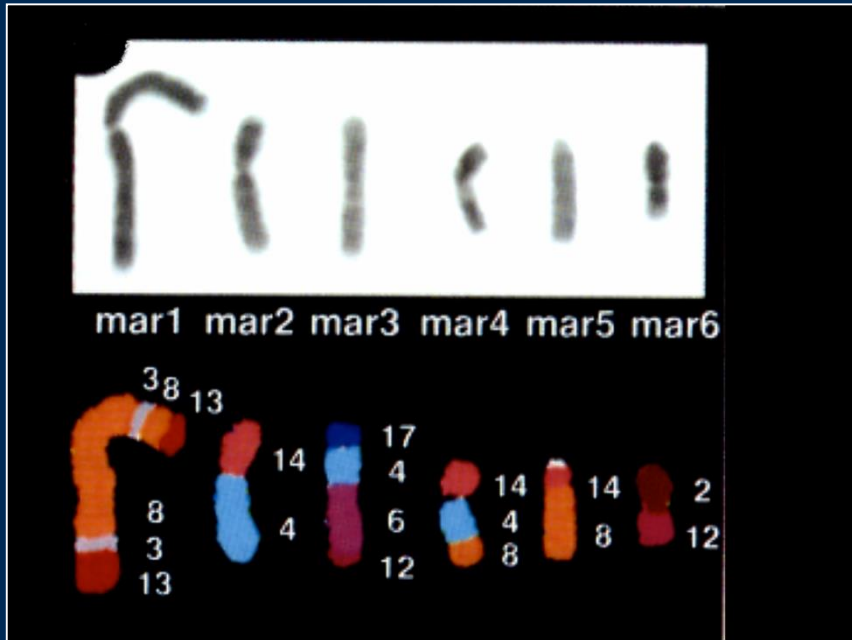


Multi-color FISH (спектральное кариотипирование - SKY)

Одновременный анализ всех 24 хромосом

Используются в диагностике:

- Изучение сложных межхромосомных перестроек – тройных и более сложных транслокаций, инсерций
- Определение природы маркерных хромосом



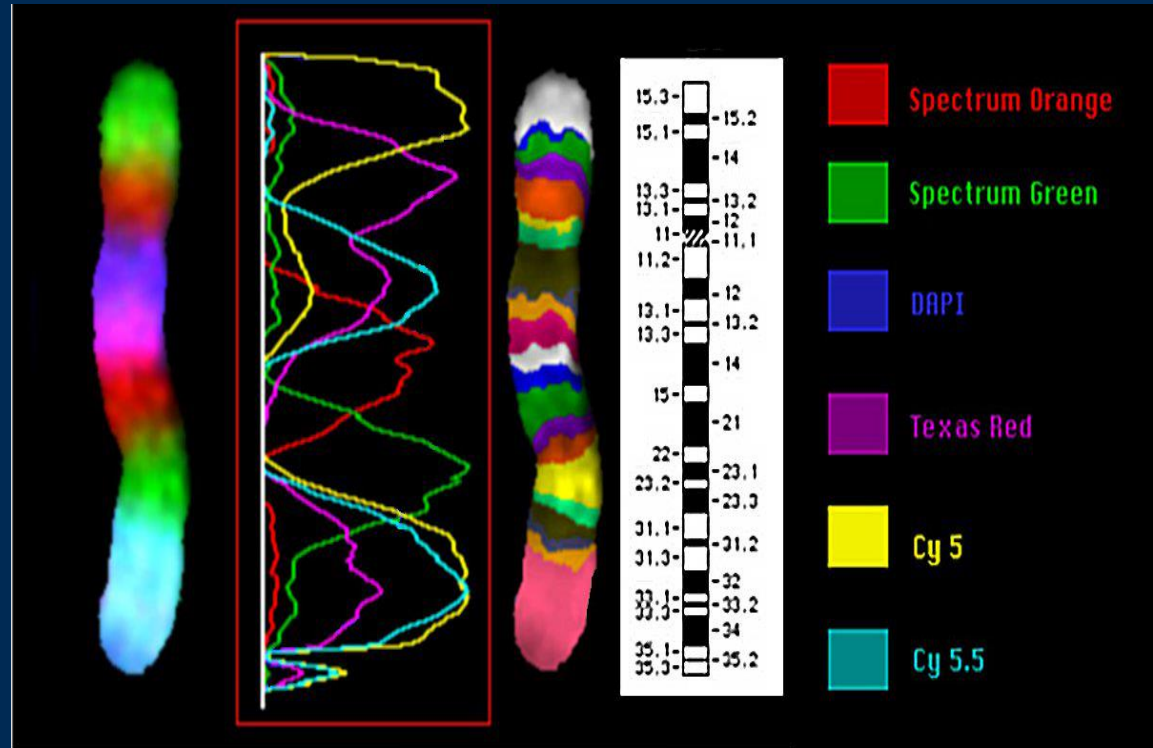
$$2^n - 1$$

Multicolor banding - MCB FISH

Изучение
внутрихромосомных
перестроек:

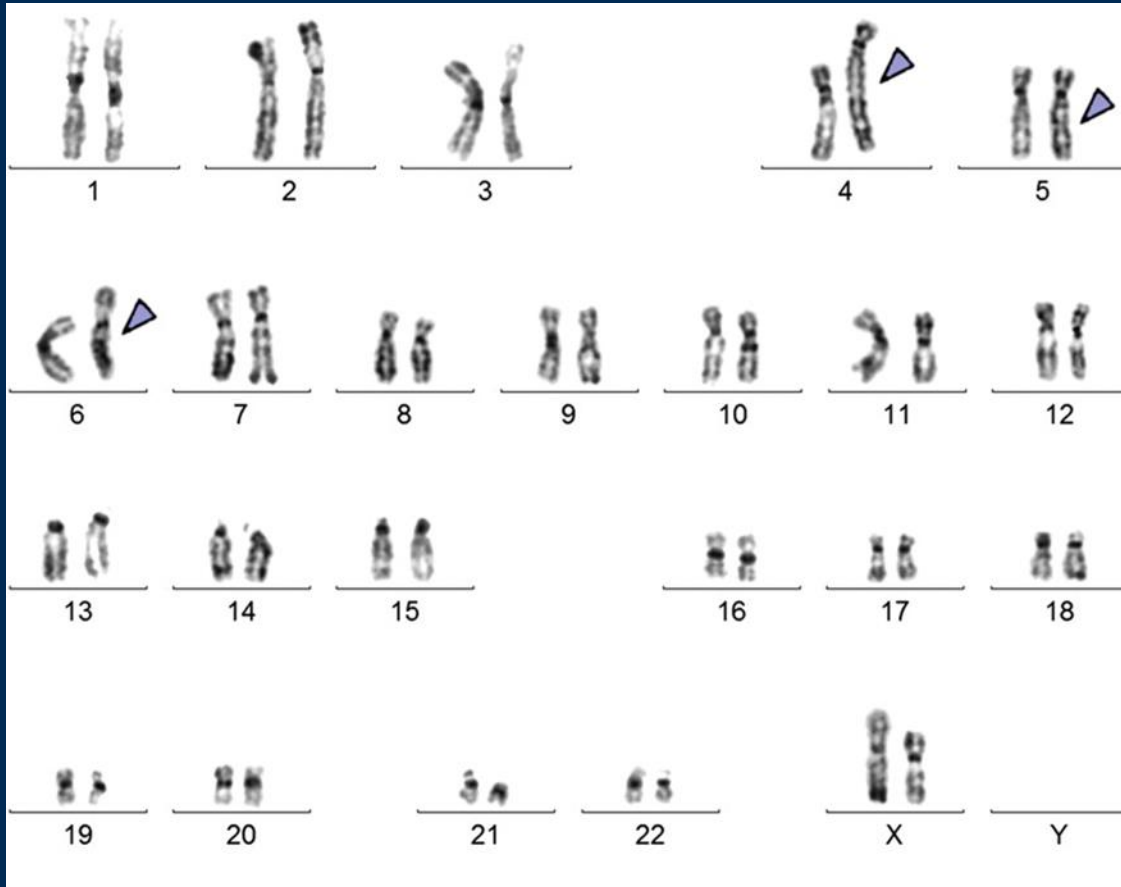
- Инверсий
- Инсерций
- Делеций
- Дупликаций

Уточнение точек
разрывов при
межхромосомных
перестройках



MCB-FISH для уточнения точек разрыва при комплексной хромосомной перестройке (CCR)

46,XX,der(4),der(5),der(6)



	normal chromosome	der(4)	der(5)	der(6)
MCB 4				
MCB 5				
MCB 6				

	Аналит. разрешение	Числ.хр. нарушения	Структурные перестройки		CNV	LOH	Мозаицизм
			сбл	несбл			
G-banding							
• Стандартный (400-550 сег.)	5 - 10 Mb	+	+	+	-	-	> 6%
• Высокого разрешения (1000 сег.)	1 - 2 Mb	+	+	+	-	-	> 6%
FISH							
LSI-пробы	до 100 kb	+	+	+	+	-	3-5%
Array-CGH							
• Human CGH 44K	400-500 kb	+	-	+	+	-	> 20%
• Human CGH 180K	100-120 kb	+	-	+	+	-	> 20%
• Human CGH +SNP, 180K	100-120 kb	+	-	+	+	+	> 20%
• Human CGH +SNP, 400K	40-50 kb	+	-	+	+	+	> 20%

Приказ Минздрава РФ от 30.12.1993 N 316 (ред. от 05.08.2003) "О дальнейшем развитии медико-генетической службы Министерства здравоохранения Российской Федерации"

Основным видом деятельности учреждений МГС является профилактика врожденной и наследственной патологии путем организации и проведения ретро- и проспективного медико-генетического консультирования, пренатальной диагностики, прееклинической диагностики у новорожденных наследственных болезней, направление больных на лечение и диспансерное наблюдение семей с наследственной патологией.

Уровни организации МГС (Приложение 1, п.2):

- *районный, городской*
- *региональный (областной, краевой, республиканский)*
- *межрегиональный*
- *Федеральный (МГЦ)*

Задачи подразделений МГК (Приложение 2)

Регламентация работы персонала МГК (Приложение 2)

Пример штатного расписания МГК (Приложение 2)

Перечень основного оборудования и реактивов (Приложение 3)

Нормативы расхода спиртов (Приложение 3)

Приказ от 15 ноября 2012 г. N 917н «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи больным с врожденными и (или) наследственными заболеваниями»

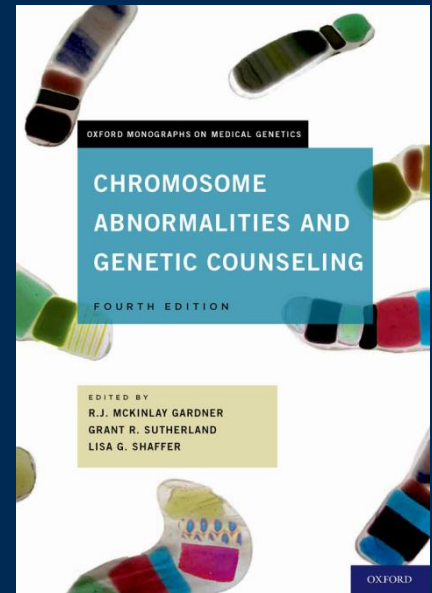
- Правила организации деятельности медико-генетической консультации (центра) (Приложение 1)
- Рекомендуемые штатные нормативы (Приложение 2)
- Стандарт оснащения цитогенетической лаборатории (с возможностью проведения FISH) (Приложение 3)
- Стандарт оснащения лаборатории молекулярно-генетической диагностики (Приложение 3)

Приказ Минздрава России от 28.12.2000 N 457 "О совершенствовании пренатальной диагностики в профилактике наследственных и врожденных заболеваний у детей"

- Инструкция по проведению инвазивной диагностики плода и генетического исследования биоптатов клеток (Приложение 3)

Литература

R.J. McKinlay Gardner, Grant R. Sutherland and Lisa G. Shaffer (2012). *Chromosome abnormalities and genetic counseling*. 4th ed. Oxford University Press, New York.



С. Г. Ворсанова, Ю. Б. Юров
В. Н. Чернышов
Медицинская цитогенетика
Медпрактика-М, 2006

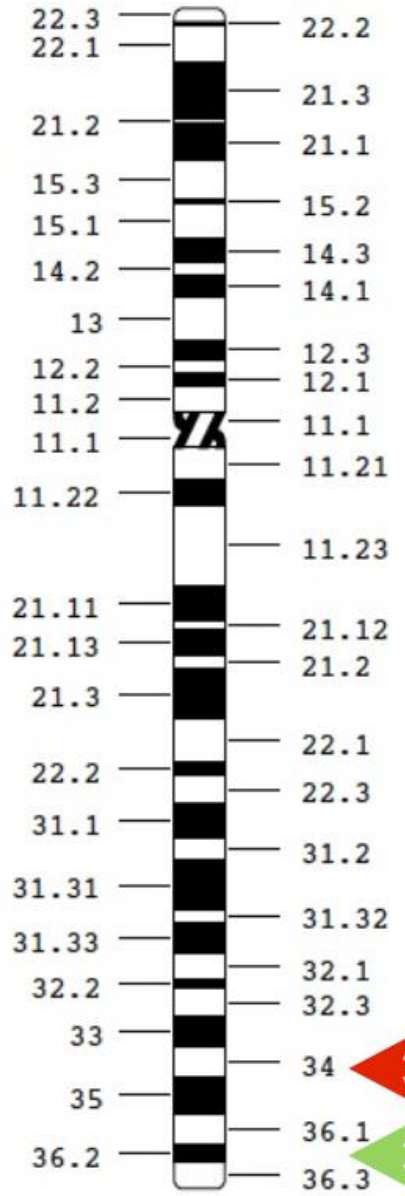
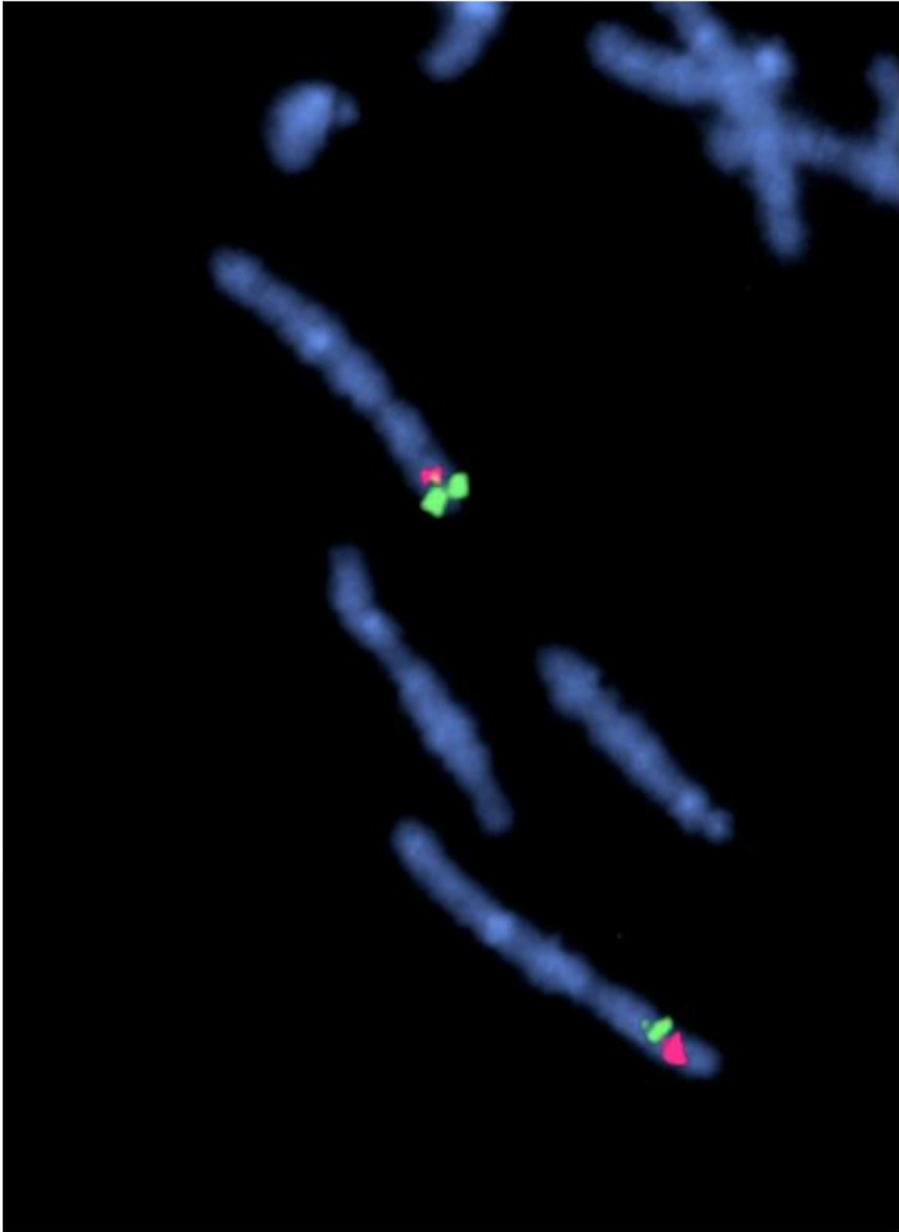
Баранов В.С., Кузнецова Т. В.
Цитогенетика эмбрионального
развития человека: Научно-
практические аспекты . — СПб:
Издательство Н-Л, 2006. — 640 с..
2006



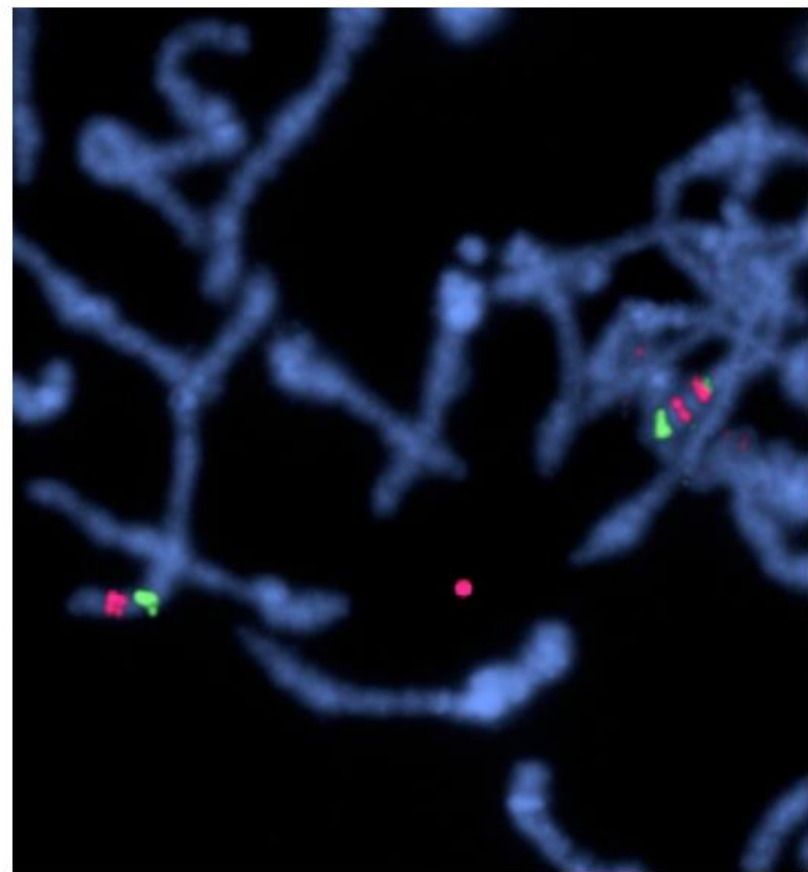
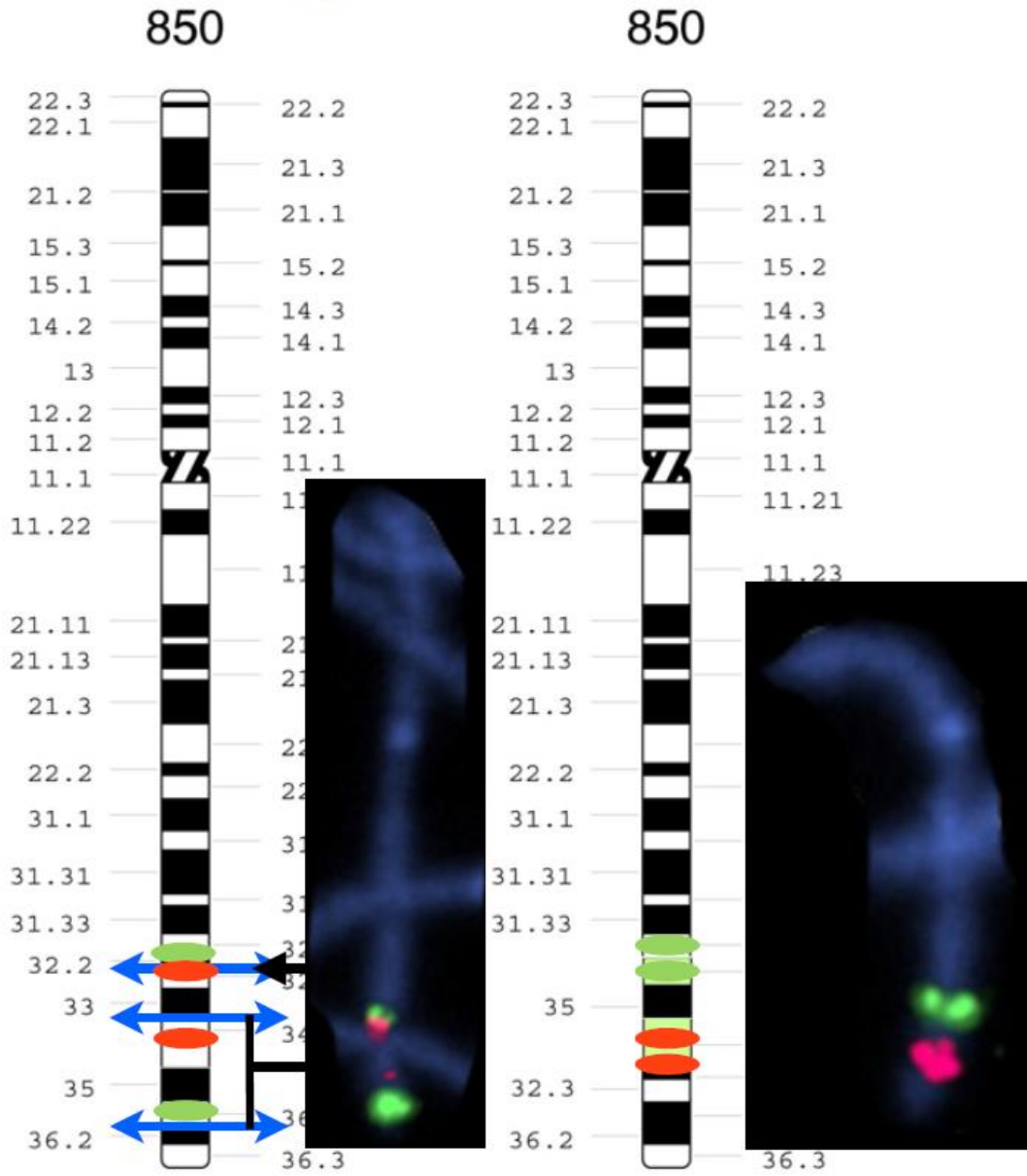
Inv(7)(q34q36)?



7



Hypothesis II : inverted insertion



Inverted insertion