Istorijat tehnološkog razvoja citogenetike

Aleksandra Dimitrijević, Jelena Lazović

Medicinski fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija / Medical faculty, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

PRIMLJEN / RECEIVED 16.01.2012.

PRIHVAĆEN / ACCEPTED 29.05.2012.

History of technological development of cytogenetics

APSTRAKT

Broj ljudskih hromozoma je otkriven 1956. Od tada je prošlo više od pedeset godina i razvijene su novije tehnike počevši od konvencionalnih povezujućih tehnika pa sve do niza molekularnih komparativnih genomskih hibridizacija koje se koriste i danas. Kombinacijom ovih konvencionalnih i molekularnih tehnika, citogenetika je postala nezamenljiv alat za dijagnostiku različitih genetskih poremećaja, utabajući put za moguće tretmane i upravljanje. Ovaj rad prikazuje istoriju i evoluciju citogenetike sve do trenutnog stanja tehnologije.

Ključne reči: citogenetika; hromozomi; istorijat.

ABSTRACT

Number of human chromosomes was discovered in 1956. Since then 50 years have passed and newer techniques have been developed since then, ranging from the initial conventional banding techniques to the currently used molecular array comparative genomic hybridization. With a combination of these conventional and molecular techniques, cytogenetics has become an indispensable tool for the diagnosis of various genetic disorders, paving the way for possible treatment and management. This paper traces the history and evolution of cytogenetics leading up to the current state of technology.

Key words: cytogenetics; chromosomes; history

KORESPONDENCIJA / CORRESPONDENCE

Aleksandra Dimitrijević, Daničićeva 2, 34000 Kragujevac, Srbija, Tel. 064/901-08-59

Aleksandra Dimitrijević, Daničićeva 2, 34000 Kragujevac, Serbia, Tel. +38164/901-08-59

ISTORIJAT CITOGENETIKE

Karl Vilhelm fon Nageli (1817-1891) je bio švajcarski botaničar, koji je proučavao deobu ćelija i oprašivanje. Smatra se da je on prvi opisao vlaknastu strukturu jedra biljne ćelije 1840. godine, i tada je nazvao tranzitorni citoblast, što je nama, danas, poznato kao hromozom. Kasnije, 1888. godine, Valdeier je prvi imenovao termin „hromozom“, nakon što je razvijena tehnika bojenja koja ih je činila vidljivim. Naziv hromozoma potiče od grčke reči chromos-boja, odnosno, lepo se boji određenim baznim bojama, i somatelo.¹ Citogenetika je proučavanje struktura i svojstva hromozoma, njihovo ponašanje tokom divizije somatskih ćelija u toku rasta i razvoja (mitoze), i divizije germinativnih ćelija tokom reprodukcije (mejoze), kao i njihov uticaj na fenotip. Citogenetika takođe uključuje proučavanje faktora koji izazivaju hromozomske promene. U početku bilo je teško odrediti diploidan broj kod sisara, zbog gužve hromozoma u metafazi. Veličina hromozoma i položaj centromere su parametri na osnovu kojih je moguće identifikovati hromosome. Međutim, mnogo pouzdanije metode, pogotovo za proučavanje promena u građi hromozoma, jesu citološke metode bojenja, koje su unapređene tokom 1950-ih.

Najčešće tkivo koje se koristi za analizu hromozoma jesu limfociti periferne krvi koji se odgajaju u kulturi tkiva. Posle izvesnog broja deoba dodaje se jedan biljni alkaloid – kolhicin koji sprečava formiranje deobnog vretena. Time se ćelija zaustavlja u metafazi mitoze kada su hromozomi najuočljiviji. Hromozomi se još dodatno obrađuju, a zatim se boje.² Boje koje se za to najčešće koriste su Gimsa i fluorescentna boja. Bojenjem se na svakom hromozomu dobija uočljiv, uvek ponovljiv i specifičan raspored traka (G-trake ako je bojeno Gimzom ili Q-trake ako je druga boja primenjena). Kada se hromozomi fotografiraju ili nacrtaju, zatim se po ivici iseku i poređaju u parove po veličini dobija se kariogram. Na osnovu kariograma se hromozomi mogu i shematski da prikažu i tada govorimo o idiogramu. Godine 1956, Džon Hin Tjio i Albert Livan su utvrdili da ljudi poseduju 46 hromozoma. Ovo je omogućilo detekciju numeričkih hromozomskih aberacija kao trizomija 21 (Daunov sindrom), 45X (Turnerov sindrom), 47 XXY (Klinefelterov sindrom), trizomija 13, trizomija 18, i filadelfijska hromozom kod bolesnika sa hroničnom mijeloidnom leukemijom. Takođe je otkriveno da bi ćelije iz amniotske tečnosti mogle da budu upotrebljene za određivanje hromozomskog statusa fetusa. Metafazi hromozomi su klasifikovani u sedam grupa na Denverskoj konferenciji (1960), sa revizijama na Londonskoj konvenciji (1963), i konferenciji u Čikagu (1966).

PRIPREMA HROMOZOMA

Svaka živa ćelija koja ima sposobnost da se deli i sadrži jedro, može se koristiti za proučavanje hromozoma. Najčešće se u te svrhe koriste limfociti periferne krvi, a sa istom uspešnošću moguće je upotrebiti i ćelije kože, kičmene moždine, horionskih resica, iz amniotske tečnosti i dr. Limfociti se gaje na podlozi koja sadrži materije za stimulaciju deoba T-limfocita, fitohemaglutinin, na 37°C, u sterilnim uslovima. Posle tri dana kulturi se dodaje citostatik kolhicin koji zaustavlja deobe u metafazi tako što spreči obrazovanje deobnog vretena. Metafaza je period deobe u kome se hromozomi najbolje vide jer su maksimalno kondenzovani. Dodavanjem hipotoničnog rastvora, po zakonima osmoze voda ulazi u limfocite i dolazi do njihovog prskanja čime se hromozomi oslobode iz jedra, rasprše. Fiksiranjem, postavljanjem na predmetna stakla za mikroskop i bojenjem hromozomi postaju spremni za izučavanje.

IDENTIFIKACIJA HROMOZOMA TEHNIKOM TRAKA

U početku su se hromozomi određivali Moorheadovom tehnikom bojenja hromozoma koji su bili podeljeni u sedam grupa na osnovu morfoloških karakteristika kao što su veličina i položaj centromere. Za bojenje hromozoma koristila su se uobičajne citološke boje poput acetokarmina, heksatoksilina, Leishmanove boje, Wrightove boje i Feulgenove boje. Za bojenje hromozoma danas se koriste Romanovsky boje koje uključuju boje Giemsa, Leishman i Wright. Najčešće se koristi uobičajna tehnika bojenja sa Giemsa bojom koja ravnomerno boji hromosome a centromere ostaju stisnute što omogućava merenje dužine hromozoma, položaj centromere i raspon krakova. Glavna prekretnica u razvoju citogenetike nastupa uvođenjem tehnika pruga početkom sedamdesetih godina (Caspersson i saradnici 1971), kojima se hromozomi mogu definisati prema karakterističnom rasporedu pruga duž hromozomske ose. Ovom metodom se pomoću kvinakrinskih boja koje se vezuju ravno na DNK dobijaju pruge, brojem i širinom specifične za svaki hromozom.^{3,4} Tom se metodom postiže bolji uvid u hromozomske homologe, koje su bez tehnika pruganja bile teško prepoznatljive. Zavisno od pripreme kulture tkiva dobijaju se različite vrste pruga. Svaka tehnika pruganja vezana je za samo određene hromozomske regije (G-metoda boji hromatide, T-metoda boji telomere, NOR-centromere). Svaki hromozom ima određeni uzorak pruganja što omogućuje razlikovanje pojedinih hromozoma unutar kariotipa. Pomoću tehnike pruganja svaki hromozom pokazuje celom dužinom svetlije i tamnije pruge koje predstavljaju euhromatinska i heterohromatinska područja hromozoma, te su se bolje identifikovali ne samo celi hromozomi, već i njihovi pojedini delovi, odnos-

no omogućeno je otkrivanje velikog broja do tada neotkrivenih hromozomskih aberacija. Metode pruganja mogu se podeliti prema načinu bojenja (apsorbcijsko i fluorescensko bojenje). Za razliku od tehnika fluorescenskog bojenja kod kojih se u većini slučajeva koristi jednostavno bojenje fluorescenskim bojama (fluorohromima), ostale tehnike pruganja uključuju neku vrstu predtretmana pre bojenja. Najčešće korišćeno pruganje je G-pruganje. To je metoda u kojoj se hromozomi tretiraju tripsinom, a nakon toga boje ljubičastom bojom Giemsa. Svaki homologi par ima jedinstven profil G-pruga što omogućuje prepoznavanje pojedinih hromozoma u kariotipu. Tretirani hromozomski preparati analiziraju se pod svetlosnim mikroskopom. Pregleda se 15-20 metafaznih ćelija, pa im se odredi broj hromozoma. Za detaljnu analizu izabere se najmanje 5 najkvalitetnijih metafaznih pločica. Detaljna analiza temelji se na poređenju svake pruge na jednom hromozomu sa prugom homologog hromozoma. Nakon mikroskopske analize fotografiju se najkvalitetnije metafazne ćelije. Izrežu se svi hromozomi i slože u parove prema veličini i uzroku pruganja u kariotip (Seabright, 1971). Osim G-pruganja koriste se još i C-pruganje, Q-pruganje, T-pruganje i R-pruganje, kao i NOR-bojenje i DAPI/Distamicin A bojenje. C-pruganjem dobijaju se rezultati bojenjem preparata Giemsa bojom nakon tretmana sa NAOH. Pruge koje se dobijaju predstavljaju konstitutivni heterohromatin u području centromera (Sumner, 1972). T-pruganje se koristi za bojenje područja telomera na hromozomu kako bi se sprovele citogenetičke analize (Dutrillaux 1973). R-pruganje obuhvata dve vrste pruganja: RHG (Giemsa Reverse Banding) i AO pruganje (Acridin Orange). RHG pruganje se koristi za analizu delecija i translokacija. Ova tehnika uključuje inkubaciju stakalaca u vrućem fosfatnom puferu sa Giemsa bojom. Hromozomi na ovaj način pokazuju tamno obojene R-pruge i slabo vidljive G-pruge. R-pruge su bogate GC-regijama dok su AT-regije uništene zbog toplote. AO-pruganje se sprovodi pomoću Acridin Orange fluorohroma koji se vezuje na DNK. Kod NOR-bojenja se hromozomi tretiraju sa rastvorom srebrno-nitrata koja se vezuje za regije nuklearnog organizatora (NOR-Nucleolar Organizing Regions), odnosno sekundarna suženja akrocentričnih hromozoma (Verma i saradnici, 1976). DAPI/Distamicin A bojenje se koristi kod identifikacije jako malih hromozoma koje je nemoguće bojiti standardnim tehnikama.

TEHNIKA TRAKA VISOKE REZOLUCIJE

Ova tehnika je zahtevnija i njome se dobija detaljniji raspored traka na hromozomima. Ako se analiza hromozoma radi tehnikom G traka, onda se dobija 400-500 traka po jednoj haploidnoj garnituri hromozoma čoveka pri čemu svaka traka sadrži oko 6000 – 8000 kilobaza iz DNK. Tehnikom traka visoke rezolucije radi se na hromozomima koji su za-

ustavljeni u profazi ili prometafazi. Tada hromozomi nisu potpuno kondenzovani pa su osetljiviji čime je omogućeno dobijanje detaljnijeg broja, čak 800 traka po haploidnoj broju hromozoma.

ANALIZA KARIOTIPA

Prvo se određuje broj hromozoma na osnovu njihovog brojanja u najčešće 10 - 15 ćelija. Nekada se broji i u većem broju kao na primer u slučaju mozaicizma što se broje hromozomi u više od 30 ćelija. Prebrojani hromozomi se zatim analiziraju prema rasporedu traka koji je specifičan za svaki pojedinačni hromozom. To se radi ili pod mikroskopom ili, češće, izučavanjem fotografija raspršenih hromozoma u metafazi.

FLUORESCENTNA IN SITU HIBRIDIZACIJA (FISH)

Ova metoda se koristi u kliničkoj dijagnostici. Zasniva na sposobnosti jednolančane DNK da hibridizuje. Postoje utvrđeni jednolančani delovi DNK koji predstavljaju tzv. probe obeležene fluorohromom tako da se mogu videti pod fluorescentnim mikroskopom. Uzorak DNK uzet od pacijenta hibridizuje sa probom, a zatim se region u kome je izvršena hibridizacija posmatra fluorescentnim mikroskopom. Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) je metoda u kojoj se primenjuju fluorescentno obeležene DNK probe u cilju detekcije specifičnih regiona na metafaznim hromozomima ili na interfaznim hromozomskim teritorijama. Ova metoda omogućava preciznu detekciju numeričkih hromozomskih aberacija, strukturnih hromozomskih rearanžmana, uključujući i identifikaciju tačaka prekida na hromozomima i aberacija na nivou pojedinačnih gena. Najmanja hromozomska promena koja se može detektovati tehnikom hromozomskih traka je reda veličine 2-3 Mb, dok se FISH probama detektuju i regioni manji od 0,5 kb.1 Sa druge strane, prednost FISH-a u odnosu na klasičnu metodu hromozomske in situ hibridizacije jeste u primeni fluorescentnih molekula (fluoroboja) za obeležavanje DNK proba. Upotreba fluorescentnih molekula kao obeleživača obezbeđuje bržu detekciju signala u odnosu na primenu radioaktivnih izotopa (^{32}P , ^3H) kao obeleživača, a ujedno je sigurnija i praktičnija.

TIPOVI FISH PROBA

Postoji veliki broj različitih tipova FISH proba koje su danas u upotrebi:

- centromerne probe se sastoje od sekvenci DNK koje se ponavljaju u predelu centromere određenih hromozoma i mogu se koristiti kod ćelija koje se ne dele (primer ćelije horionskih resica za prenatalnu dijagnostiku trizomije hro-

mozoma);

- probe za jedinstvene sekvence hromozoma specifične su za određeno mesto gena na hromozomu (genski lokus);

- telomerne probe urađene su za svih 24 hromozoma kod čoveka: 22 autozoma kao i X i Y hromosome; pomoću njih se mogu utvrditi delecije i translokacije u subtelomernim regionima koje dovode do pojave neobjašnjivih mentalnih poremećaja kod dece;

- probe za bojenje celih hromozoma se koriste kao smeša proba dobijenih iz različitih delova hromozoma koje, kada se koriste zajedno, daju sliku celog hromozoma;

- multipli FISH (M-FISH) je smeša obojenih proba za sve hromosome čoveka čijom primenom se dobija višebojni kariotip čoveka u kome svaki par hromozoma može bitiodređen na osnovu za njega karakteristične boje i izučavan pomoću kompjuterskog programa koji analizira sliku.

PRIMENA FISH METODE

FISH metoda je visoko senzitivna i specifična metoda kojom se detektuju promene na hromozomima manje od 0,5 kb. U zavisnosti od tipa DNK proba koje se koriste u FISH-u, ova metoda ima primenu u dijagnostici numeričkih hromozomskih aberacija, strukturnih hromozomskih rearanžmana, mikrolelecija, za identifikaciju tačaka prekida na hromozomima i aberacija na nivou pojedinačnih gena. Jedna od najčešćih primena FISH metode je u dijagnostici mikrolelecijskih sindroma uz upotrebu gen-specifičnih DNK proba.^{5,6} To je ciljana analiza poremećaja specifičnih genskih lokusa čije postojanje se pretpostavlja na osnovu kliničke slike pacijenta. Danas se u dijagnostici čestih mikrolelecijskih sindroma koriste komercijalne DNK probe.^{7,8,9} Komercijalne DNK probe se sastoje od dve lokus (gen) specifične DNK probe obeležene različitim fluorohromom od kojih jedna omogućava identifikaciju kritične regije određenog mikrolelecijskog sindroma, a druga predstavlja kontrolnu DNK probu za identifikaciju hromozomskog tipa. Na urednom nalazu identifikovana su 4 signala od toga su dva kontrolna i dva signala kritične regije na oba homologa, dok prisutnost jednog signala za kritičnu regiju ukazuje na mikroleleciju

KOMPARATIVNA GENOMSKA HIBRIDIZACIJA –CGH METODA

Komparativna genomska hibridizacija (engl. Comparative Genomic Hybridisation – CGH) se koristi za ispitivanje duplikacija i delecija velikih hromozomskih regiona (od 10 do 12 Mb) i za ispitivanje numeričkih hromozomskih aberacija. Ovakav tip promena u kariotipu je karakterističan za maligne ćelije tako da je ova metoda postala nezamen-

ljiva za ispitivanje genomskog imbalansa u tumorskim genomima. CGH je bazirana na kvantitativnom dvobojnom FISH-u u kome se vrši simultana hibridizacija dve različito obeležene genomske probe sa normalnim metafaznim hromozomom. Kao genomske probe se koriste kontrolna DNK i DNK tumorskog tkiva. Komparativna genomska hibridizacija (Comparative Genomic Hybridization – CGH) koristi se za analizu DNK hromozoma tumorskih ćelija. DNK ćelije tumora ili test DNK se obeleži jednom bojom (zele- nom), a normalna DNK koja služi kao kontrolna drugom bojom, crvenom. Oba uzorka se pomešaju i ostave da hibridizuju sa normalnim metafaznim hromozomima. Ako se posle toga uoči povećana zelena fluorescencija u odnosu na crvenu to znači da ispitivani uzorak ima veću količinu DNK nego kontrola. Ako je, pak, smanjena zelena fluorescencija u odnosu na crvenu to je znak da testirani uzorak poseduje deleciju.

PRIMENA I PREDNOST CGH METODE

CGH je korisna za analizu numeričkih i strukturnih hromozomskih (velikih delecija i duplikacija) aberacija kod solidnih tumora. Na primer, ispitivanjem tkiva cervikalnog epitela u različitim stadijumima displazije CGH metodom je pokazano da duplikacija dugog kraka hromozoma 3 (dup 3q) doprinosi prelasku tumora iz stadijuma displazije u stadijum invazivnog karcinoma.⁸ Glavna prednost CGH metode jeste da je za analizu potrebna samo DNK izolovana iz tumorskog tkiva čime se izbegava veoma teška priprema metafaznih hromozoma iz tumorskih tkiva koji su najčešće i veoma loše morfologije i rezolucije. Umesto njih koriste se kariotipski normalni metafazni hromozomi. Još jedna prednost ove metode je mogućnost analize tkiva fiksiranog u parafinu ili formalinu, s obzirom da se DNK iz takvih uzoraka uspešno izoluje, dok se iz njih ne mogu napraviti preparati metafaznih hromozoma. CGH analiza tumorskih tkiva fiksiranih u formalinu iz različitih stadijuma jednog maligniteta omogućava genotip- fenotip poređenje, odnosno korelisanje uočenih genetičkih promena sa kliničkim promena sa kliničkim tokom bolesti.

SPECTRAL KARYOTYPING – SKY METODA

SKY metoda je bazirana na simultanoj hibridizaciji 24 pomešane hromozom-specifične probe (probe za bojenje hromozoma) od kojih je svaka obeležena različitim fluorobojom. Svaki od 24 fluocitometrom sortiranih humanih hromozoma (hromozomi 1 do 22, X i Y) se obeležava sa po jednom fluorobojom ili sa specifičnom kombinacijom fluoroboja. Koristi se kombinacija maksimalno 5 fluoroboja što obezbeđuje jedinstveni spektralni signal za svaki hromozomski par. Obeležavanje proba vrši se inkorporisanjem nukleotida konjugovanih sa fluorobojama u reakciji AP-

PCR-a (engl. Arbitrary primed-PCR). Dobijene probe za bojenje hromozoma se pomešaju i doda se višak neobeležene Cot-1 DNK. Smeša SKY proba se hibridizuje sa preparatom metafaznih hromozoma 24-72 časa na 37°C i nakon hibridizacije višak nevezane probe se ispira posthibridizacionim pranjima.

SKY U DIJAGNOSTIČKOJ UPOTREBI

SKY metoda je našla mnogobrojne primene u identifikaciji hromozomskih aberacija asociranih sa humanim oboljenjima posebno u citogenetici tumora i preimplantacionoj genetici (za detekciju uzroka spontanih pobačaja koji su posebno vezani za abnormalnosti hromozoma 9, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22, X i Y). SKY je pogodan za identifikaciju finih strukturnih hromozomskih aberacija, kao što su translokacije telomera, koje se teško zapažaju korišćenjem tehnika hromozoskih traka, za identifikaciju malih markera čija detekcija nije sigurna korišćenjem rutinskih bojenja u tehnikama hromozomskih traka, za karakterizaciju kariotipa sa kompleksnim rearanžmanima, za analizu hromozomskih rearanžmana u humanim i mišjim tumorskim ćelijama. Na primer, analizom kariotipa sa kompleksnim rearanžmanom iz ćelijske linije primarnog tumora mokraćne bešike uočava se balansirana translokacija između hromozoma 8 i 17, t(8), nebalansirana translokacija hromozoma 6 i 15, koja rezultuje derivatnim hromozomom 6, der(6)t(6;15) i nebalansirana translokacija hromozoma 1 i 12, koja rezultuje derivatnim hromozomom 1, der(1)t(1;12)8. Derivatni hromozom podrazumeva strukturno rearanžiran hromozom nastao fuzijom 2 ili više hromozoma i označava se prema onom hromozomu koji ima centromeru. Primena SKY metode u proučavanju mišjih i humanih tumorskih ćelija je pokazala da homologi hromozomski regioni podležu rearanžmanima kod mišjeg i humanog kancera dojke.

ZAKLJUČAK

Danas se rad u laboratorijama za citogenetička istraživanja ne može zamisliti bez primene metoda molekularne citogenetike. To ne znači da su ove metode zamenile metode klasične citogenetike, već one zapravo predstavljaju njihovu dopunu. Nažalost, ni metode molekularne citogenetike nisu uvek dovoljno senzitivne za pojedine hromozomske aberacije. Iz ovog razloga je neophodno pravilno odabrati i kombinovati pojedine tehnike kako bi se najpreciznije i najbrže obavila analiza. Za pravilno postavljanje dijagnoze i otkrivanja mehanizma nastanka poremećaja genoma, pored navedenih metoda klasične citogenetike (tehnik hromozomskih traka) i metoda molekularne citogenetike (FISH, CGH, SKY) neophodna su i klinička ispitivanja. Potrebe za molekularnom citogenetskom analizom iz dana u dana rastu jer su ove metode relativno jeftine, pouzdane i brze. Metode molekularne citogenetike dopunjuju savremene metode molekularne medicine i daju im novi kvalitet i širu primenu.

LITERATURA:

1. Kearney L. Molecular cytogenetics. *Best Pract Res Clin Haemato* 2001; 14: 645-68.
2. Petković I, Barišić I. Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) in clinical genetics. *Paediatr Croat* 2001; 45:175-8.
3. Blancato JK. Fluorescence in situ hybridization. In: Gersen SL, Keagle MB, eds. *The principles of clinical cytogenetics*. Totowa: Human Press, 1999: 443-73.
4. Carpenter NJ. Molecular cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 769-78.
5. Petković I. Molekularna citogenetika u dijagnostici mikrodelecijskih sindroma. *Paediatr Croat* 2004; 48(Supl 1): 143-9.
6. Petković I, Barišić I, Morožin L. Diagnosis of microdeletion syndromes using the FISH method in Croatia. *Ann Genet* 2003; 46: 255.
7. Drew LJ, Crabtree GW, Markx S, et al. The 22q11.2 microdeletion: fifteen years of insights into the genetic and neural complexity of psychiatric disorders. *Int J Dev Neurosci* 2011; 29(3): 259-81.
8. Fauth C, Speicher MR. Classifying by colors: FISH based genome analysis. *Cytogenet Cell Genet* 2001; 93: 1-10.
9. Lichter P. Multicolor Fishing: what's the catch? *Trends Genet* 1997; 13: 475-9.
10. Schrock E, Veldman T, Ning Y. Spectral karyotyping refines cytogenetics diagnostics of constitutional chromosomal abnormalities. *Hum Genet* 1997; 101: 255-62.