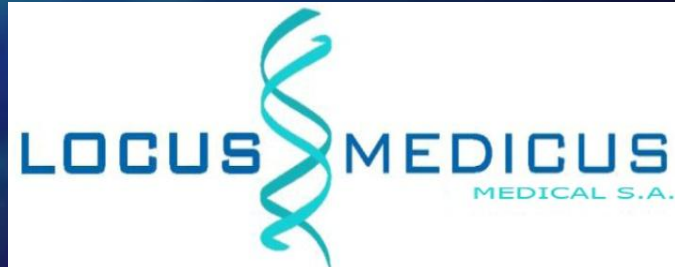


ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ

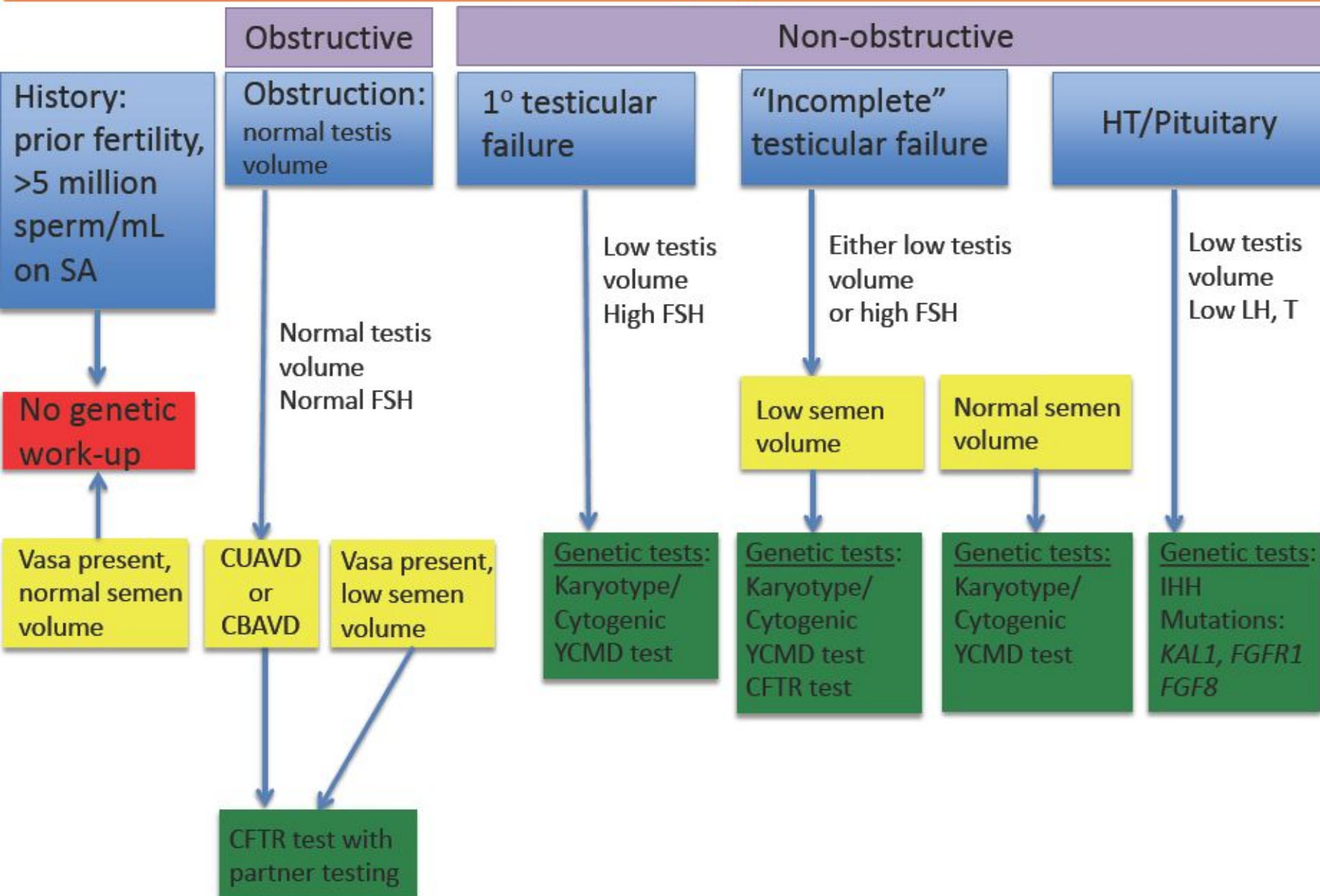
ΜΕΡΟΣ Β΄



ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

- ΚΑΡΥΟΤΥΠΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ
- FISH ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ
- ΚΥΣΤΙΚΗ ΙΝΩΣΗ
- ΜΙΚΡΟΕΛΜΕΙΨΕΙΣ ΤΟΥ Υ

Azoospermia or severe oligospermia: genetic testing algorithm



ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ (ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ)

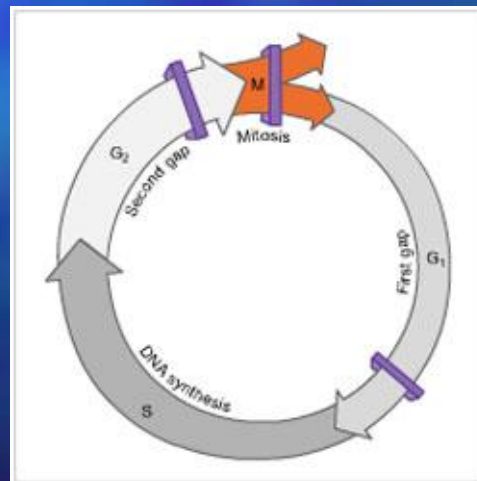
- Λήψη περιφερικού αίματος
- Εμβολιασμός υλικού στις καλλιέργειες και επώαση στους 37⁰C
- Συγχρονισμός και συγκομιδή των κυττάρων
- Επίστρωση, χρώση και ανάλυση των μεταφασικών πυρήνων (χρωμοσώματα)

Σε κάθε ένα από τρία διαφορετικά αποστειρωμένα nuc σωληνάρια προσθέτουμε τα εξής:

- 5 ml καλλιεργητικού υλικού (RPMI)
- 100 μl PHA (φυτοαιματογλουτινίνη) και
- 0.5 ml περιφερικό αίμα

Τοποθετούμε τα nuc σε επωαστήρα στους 37⁰C για 48 ώρες

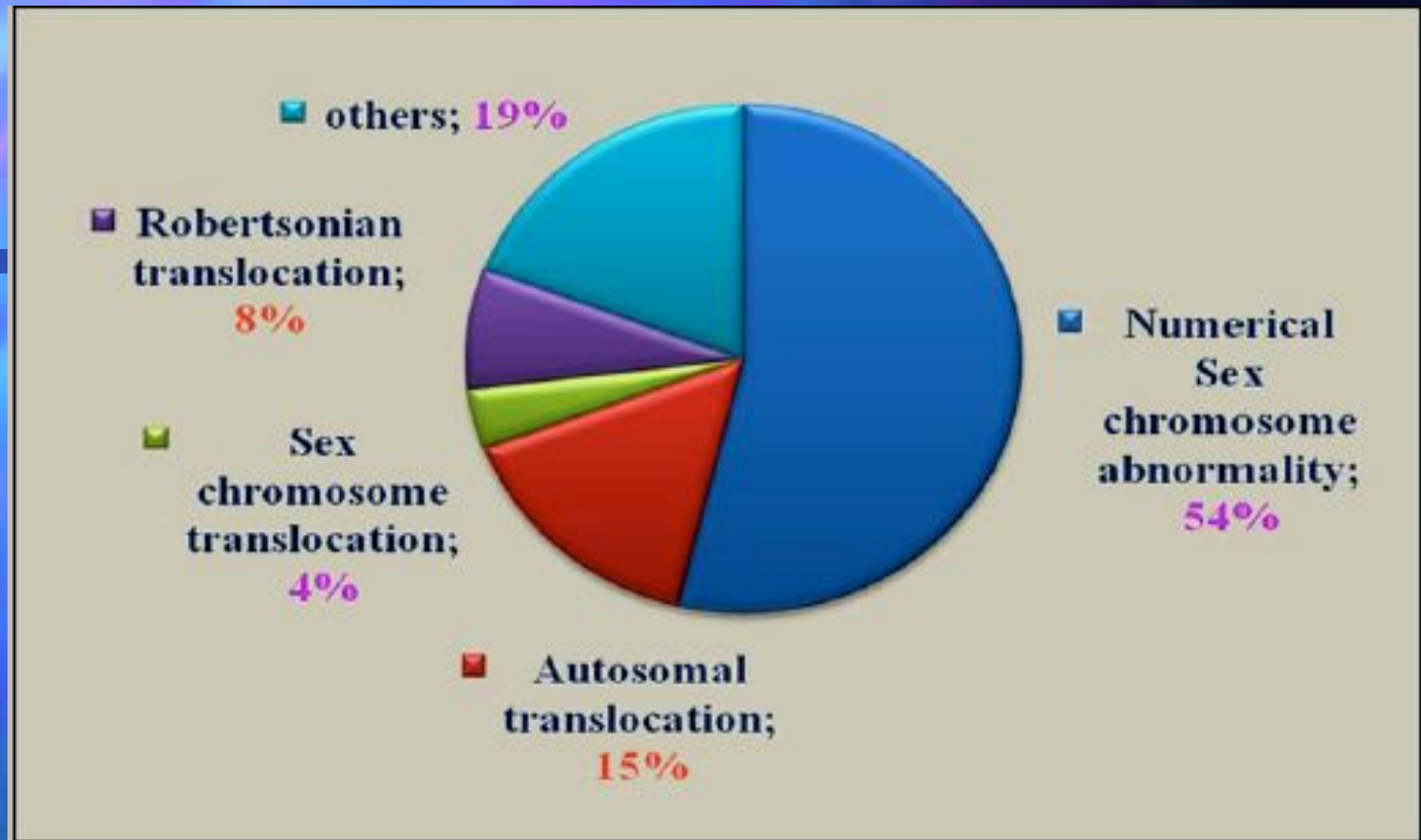
- Στις 48 ώρες προσθέτουμε σε κάθε πηκς 100μl θυμιδίνη και τα τοποθετούμε στον επωαστήρα στους 37⁰C για 16 περίπου ώρες
- Μετά τις 16 ώρες απομακρύνουμε τη θυμιδίνη ξεπλένοντας τα πηκς με καλλιεργητικό υλικό (RPMI) και τα τοποθετούμε στον επωαστήρα στους 37⁰C για άλλες 6 περίπου ώρες
- Στις 6 ώρες προσθέτουμε σε κάθε πηκς 40-50μl κολχικίνη και αφήνουμε στον επωαστήρα στους 37⁰C για 20 περίπου λεπτά



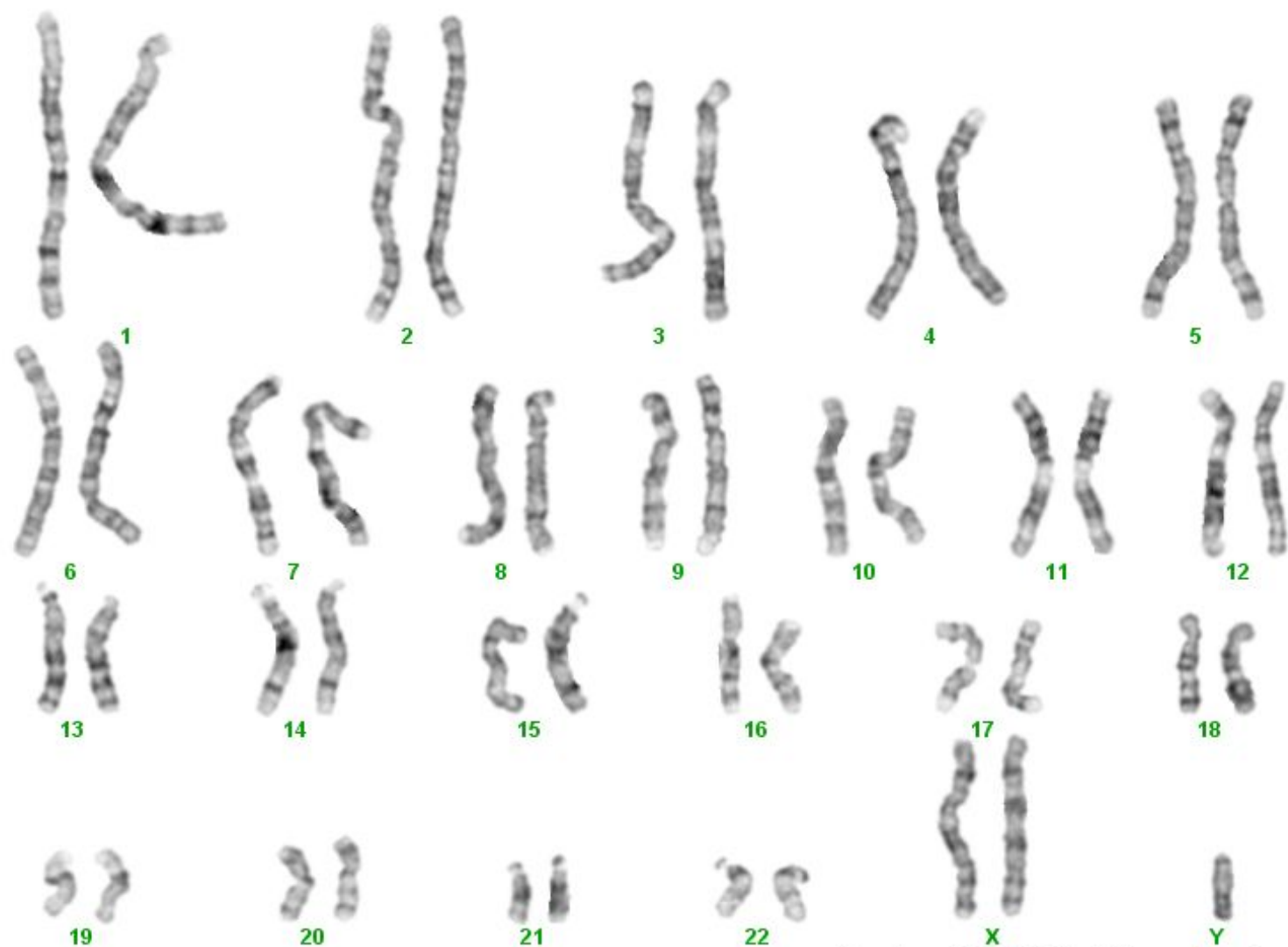
- Προσθέτουμε και αφήνουμε σε υπότονο διάλυμα (KCl ή NaCl) για περίπου λεπτά
- Ακολουθεί η μονιμοποίηση των κυττάρων με τη χρήση διαλύματος που αποτελείται από ένα μέρος οξικού οξέος και τρία μέρη μαθανόλης
- Επίστρωση των κυττάρων σε αντικειμενοφόρες πλάκες και χρώση των μεταφασικών πυρήνων

Δύο είναι οι κύριες χρώσεις που χρησιμοποιούνται για κυτταρογενετική ανάλυση:

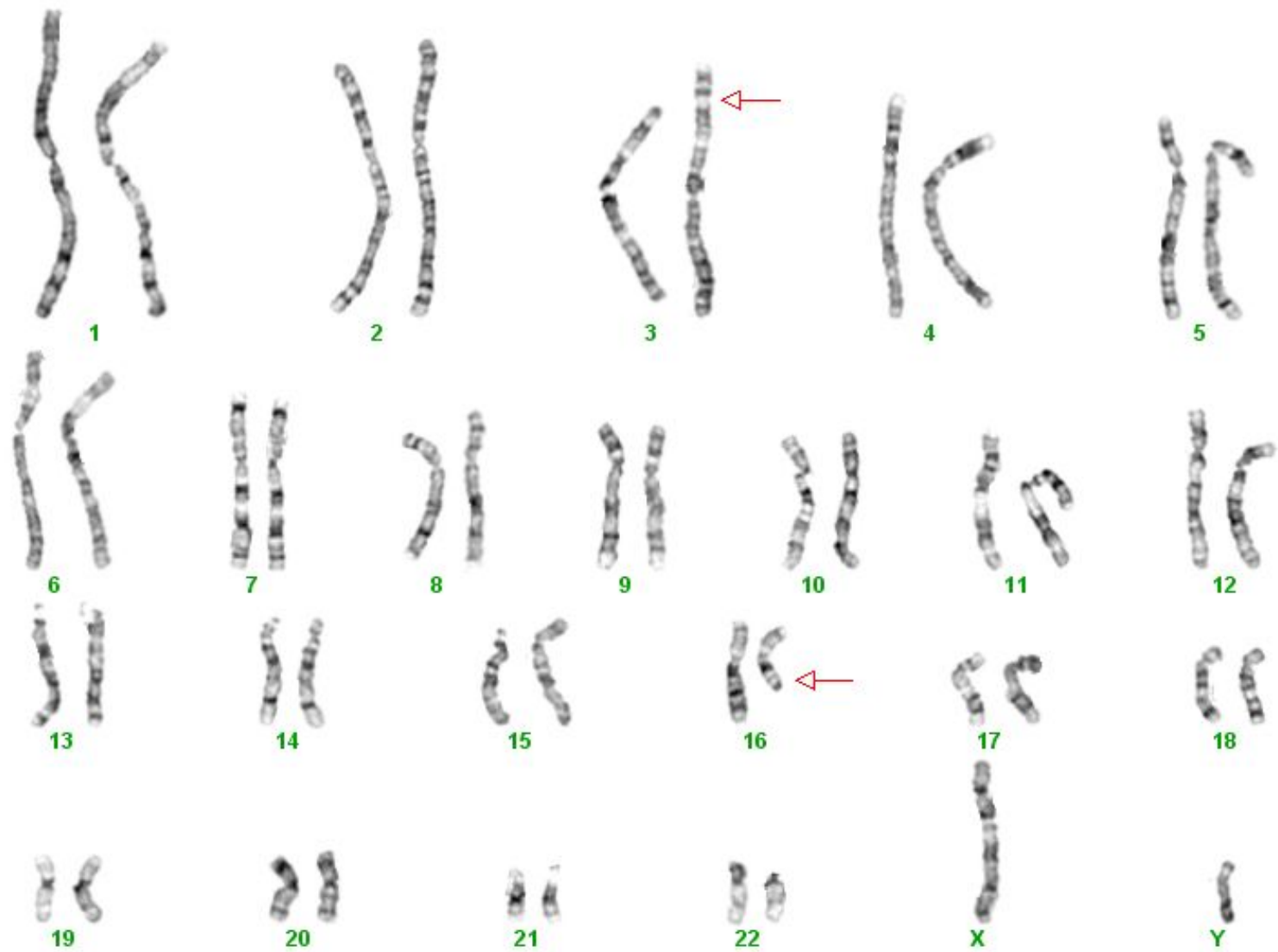
- Στη G-Banding, δημιουργούνται στα χρωμοσώματα διαδοχικά λευκές και σκούρες ζώνες ενώ
- Στην R-Banding, δημιουργείται στα χρωμοσώματα αντίθετη ζώνωση από αυτή της G-Banding



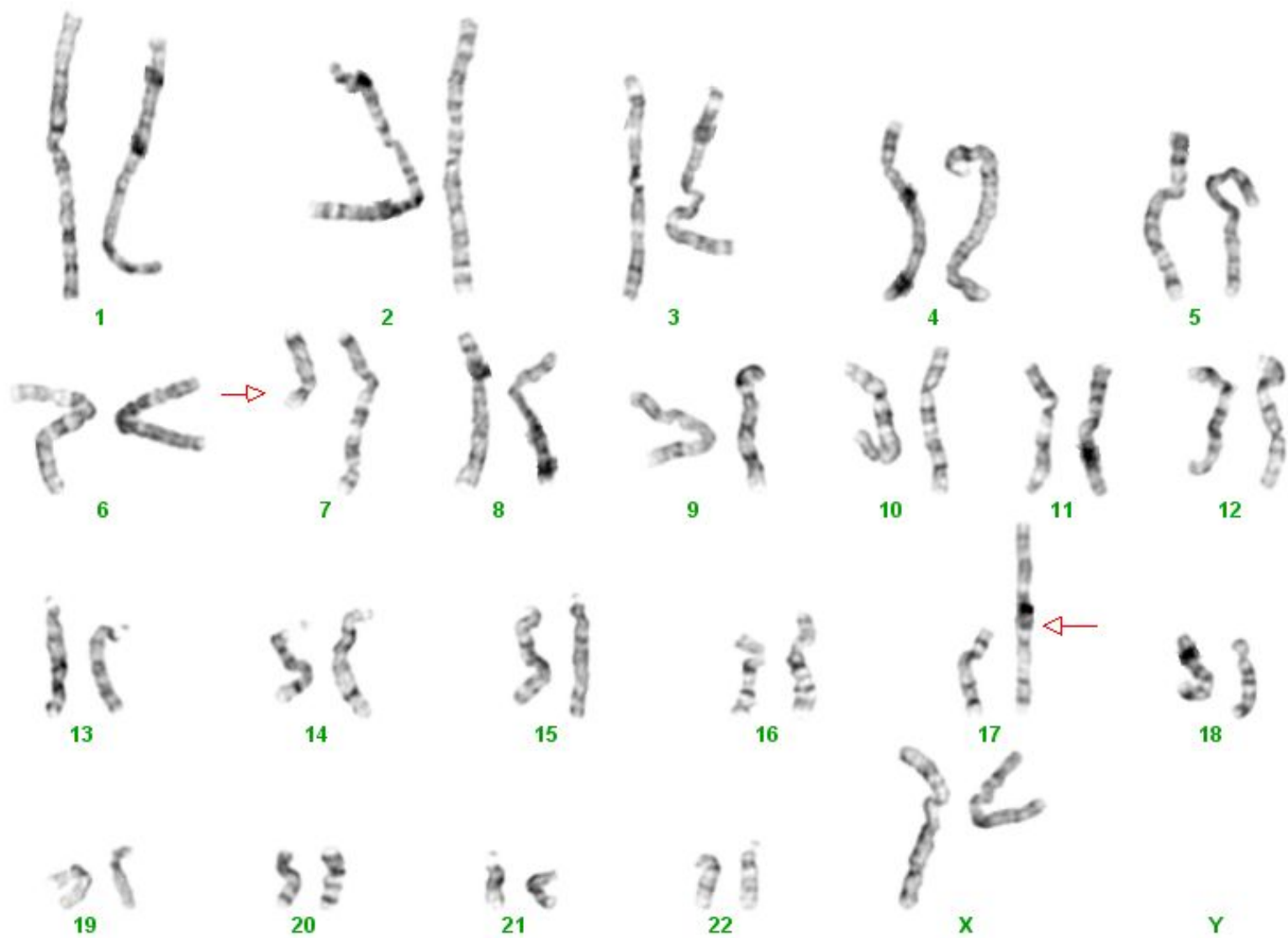
Συχνότητα διαφορετικών τύπων χρωσωμικών ανωμαλιών σε υπογόνιμους άρρενες



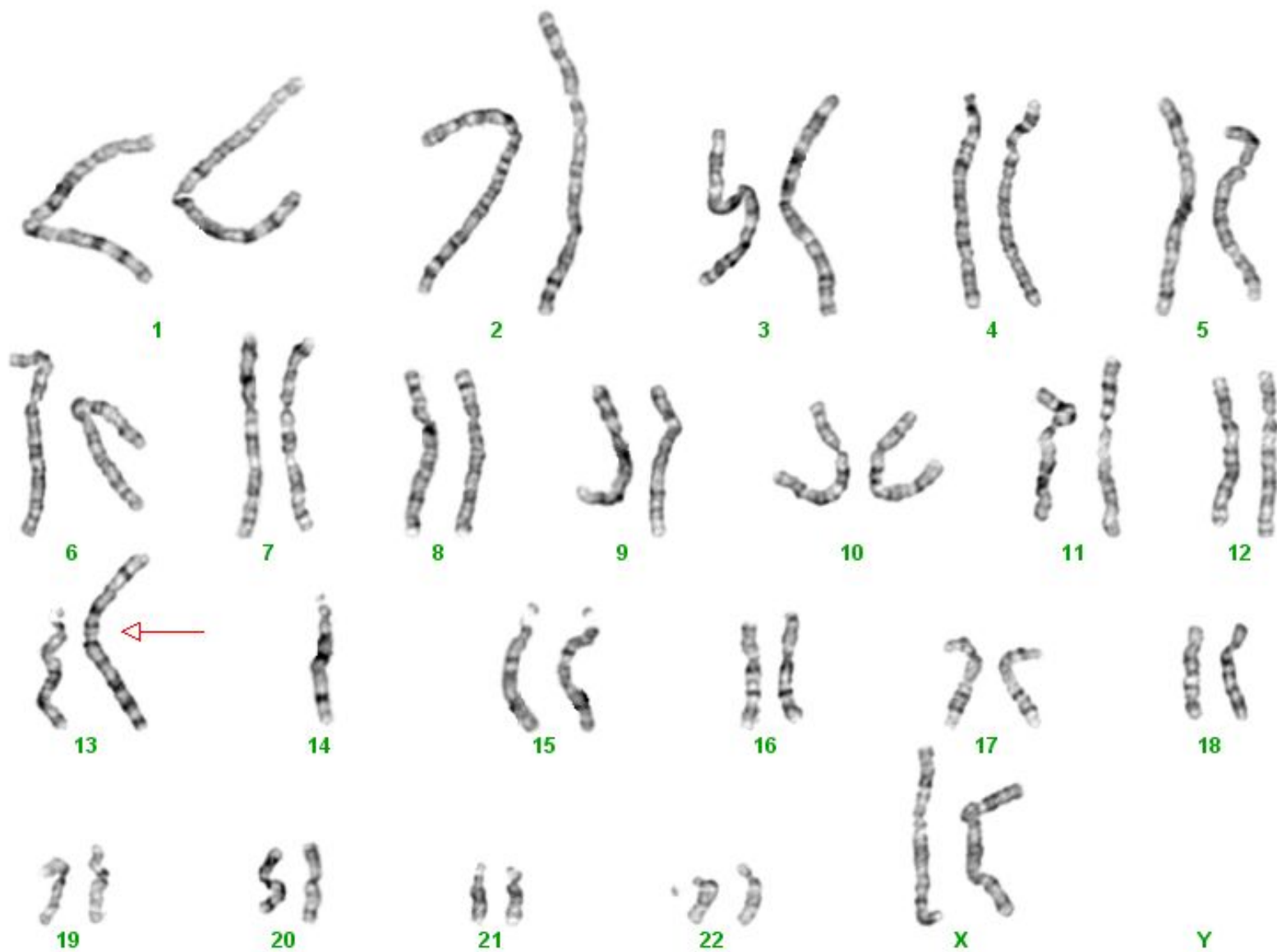
Karyotype: 47,XXY (Kleinfelter syndrome)



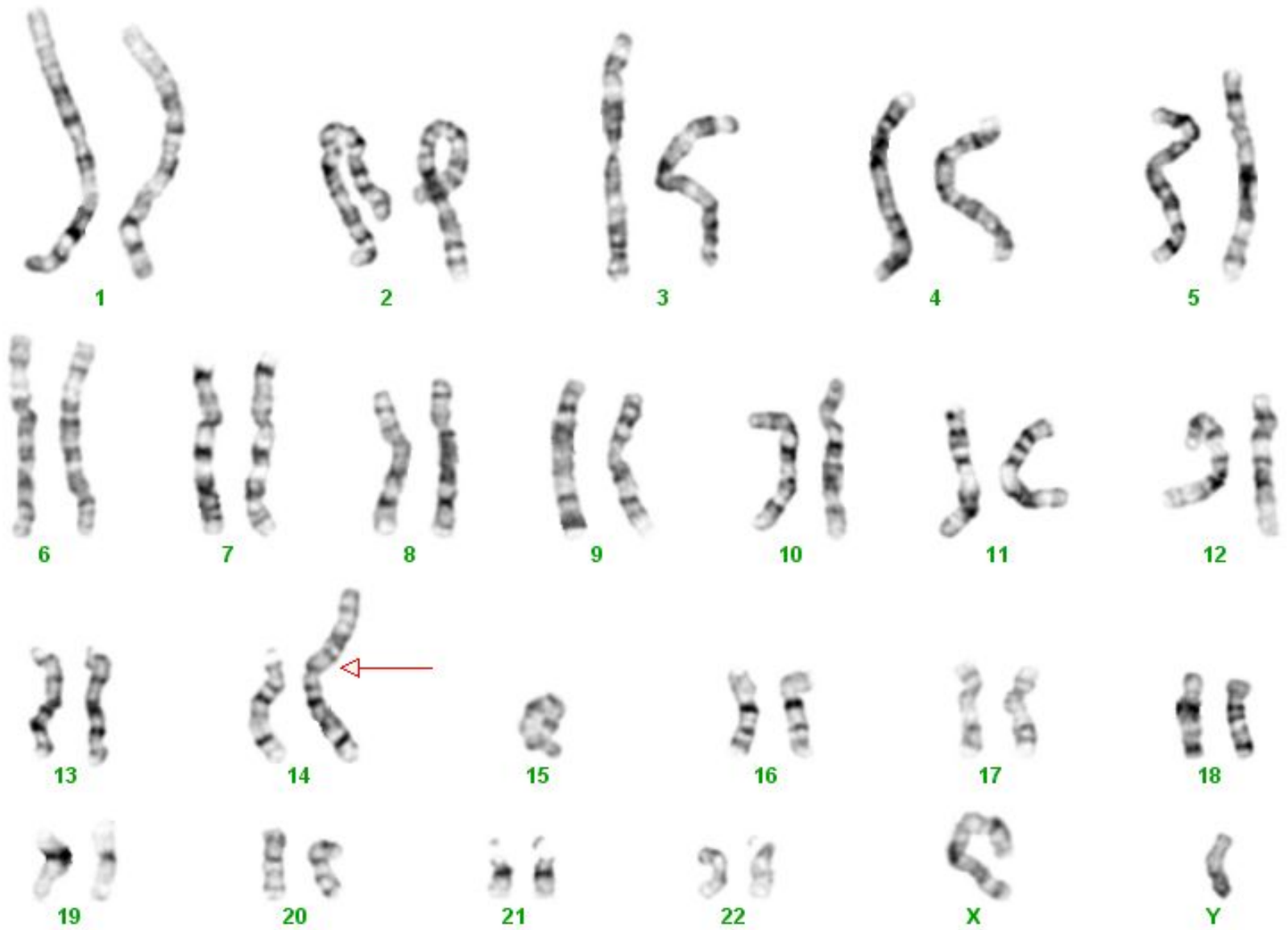
Karyotype: 46,XY,t(3;16)(p25.3;q13)



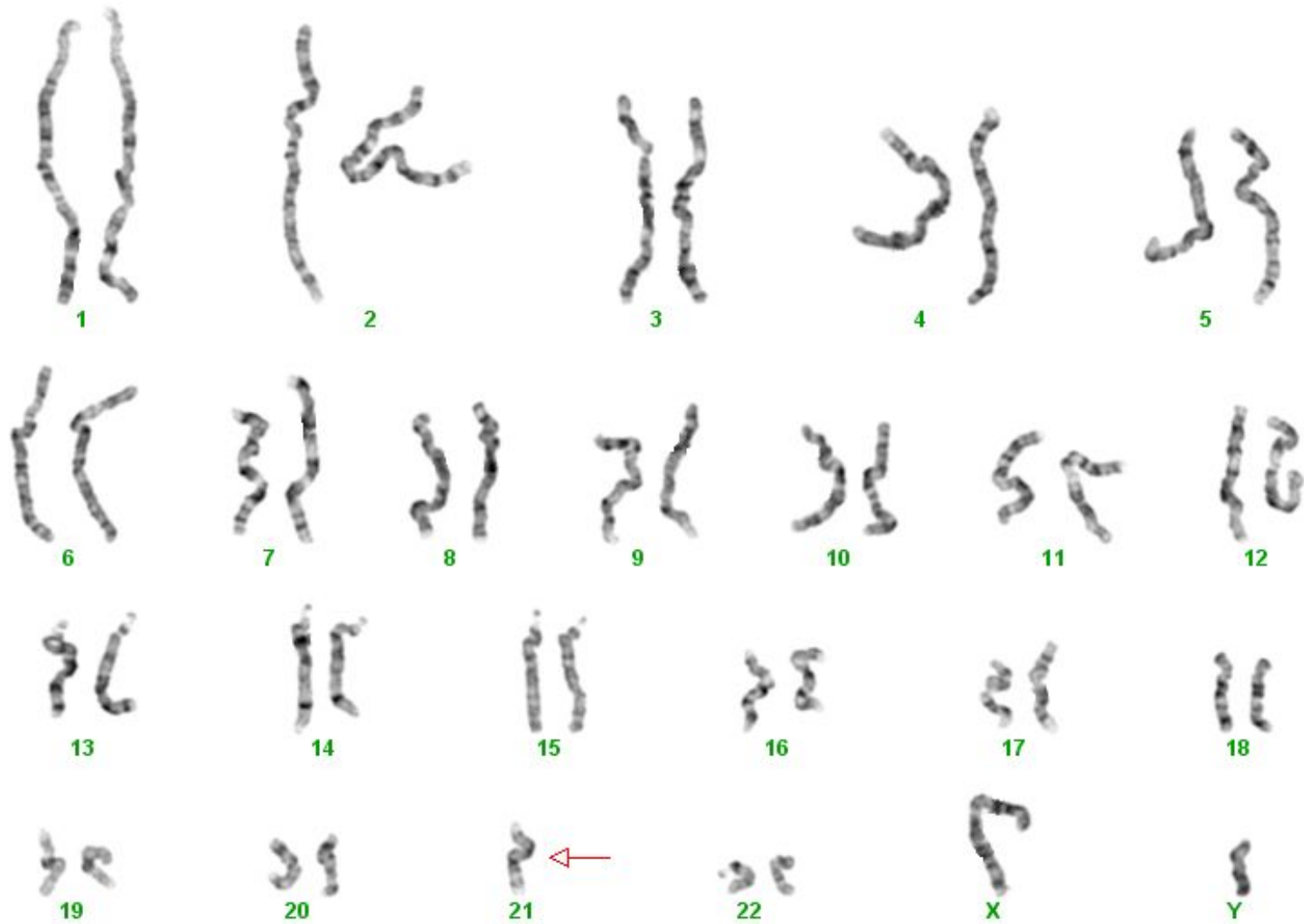
Karyotype: 46,XX,t(7;17)(q11.21;p13.1)



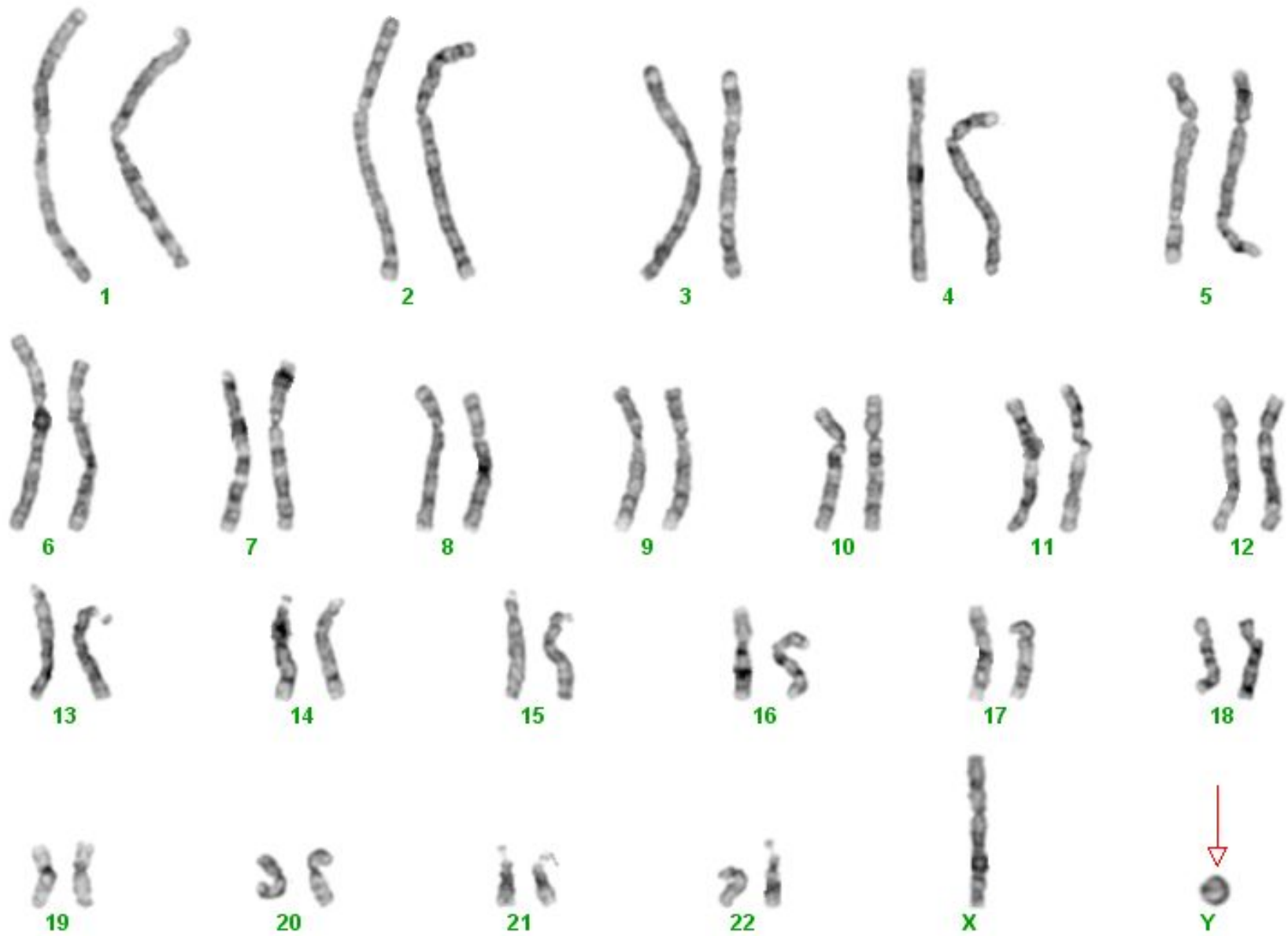
Karyotype: 45,XX,rob(13;14)(q10;q10)



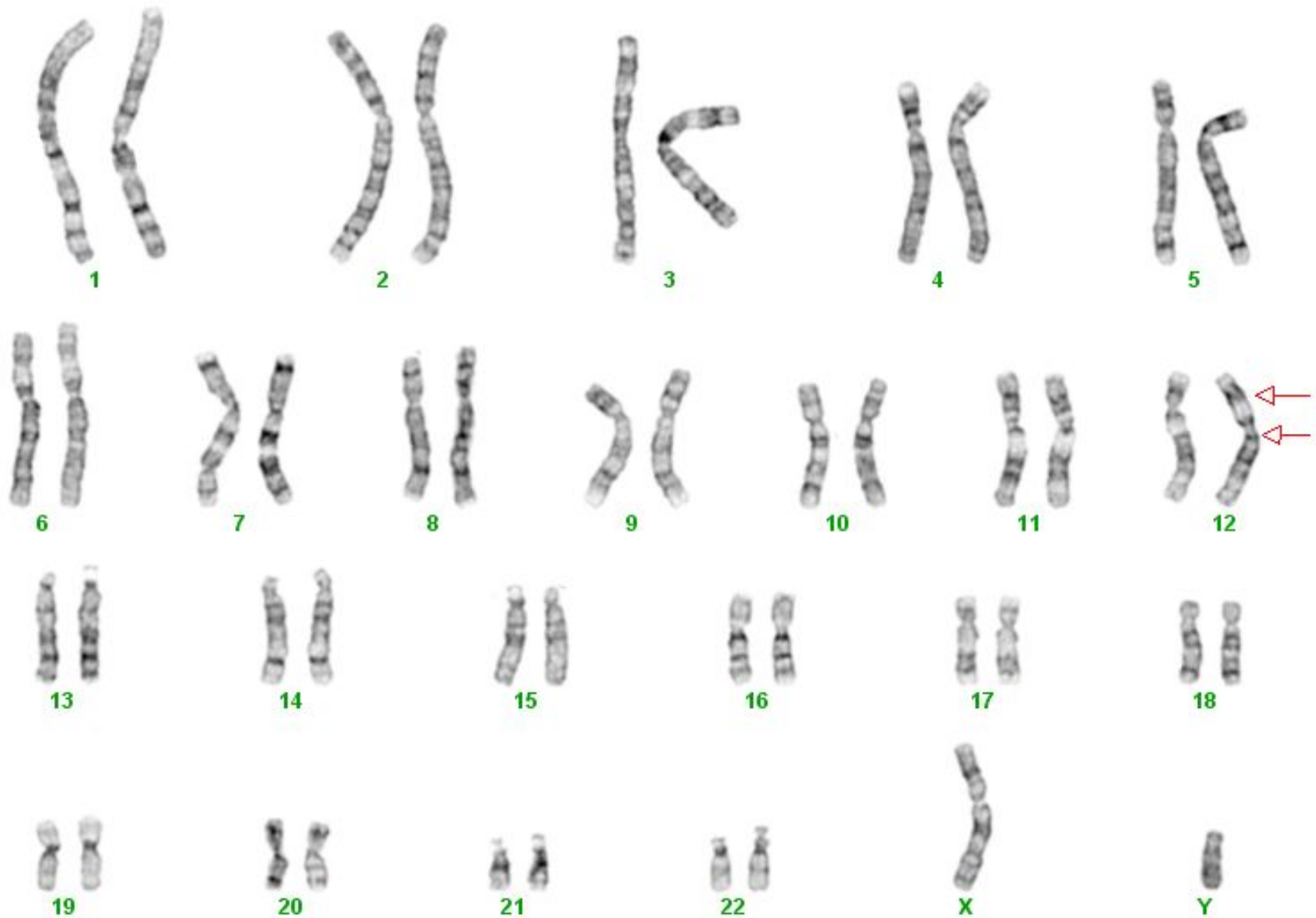
Karyotype: 45,XY,rob(14;15)(q10;q10)



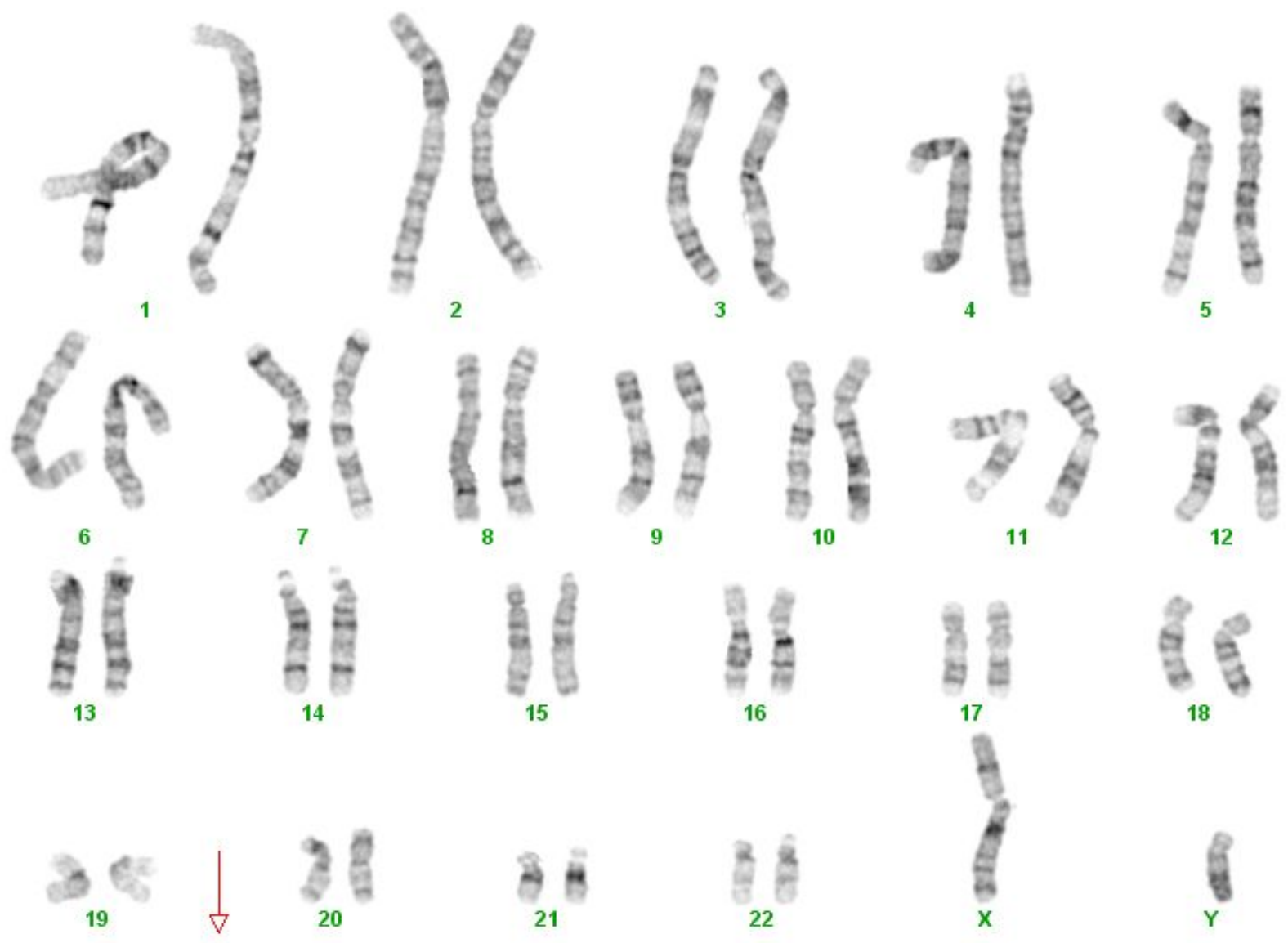
Karyotype: 45,XY,rob(21;21)(q10;q10)



Karyotype: 46,X,r(Y)

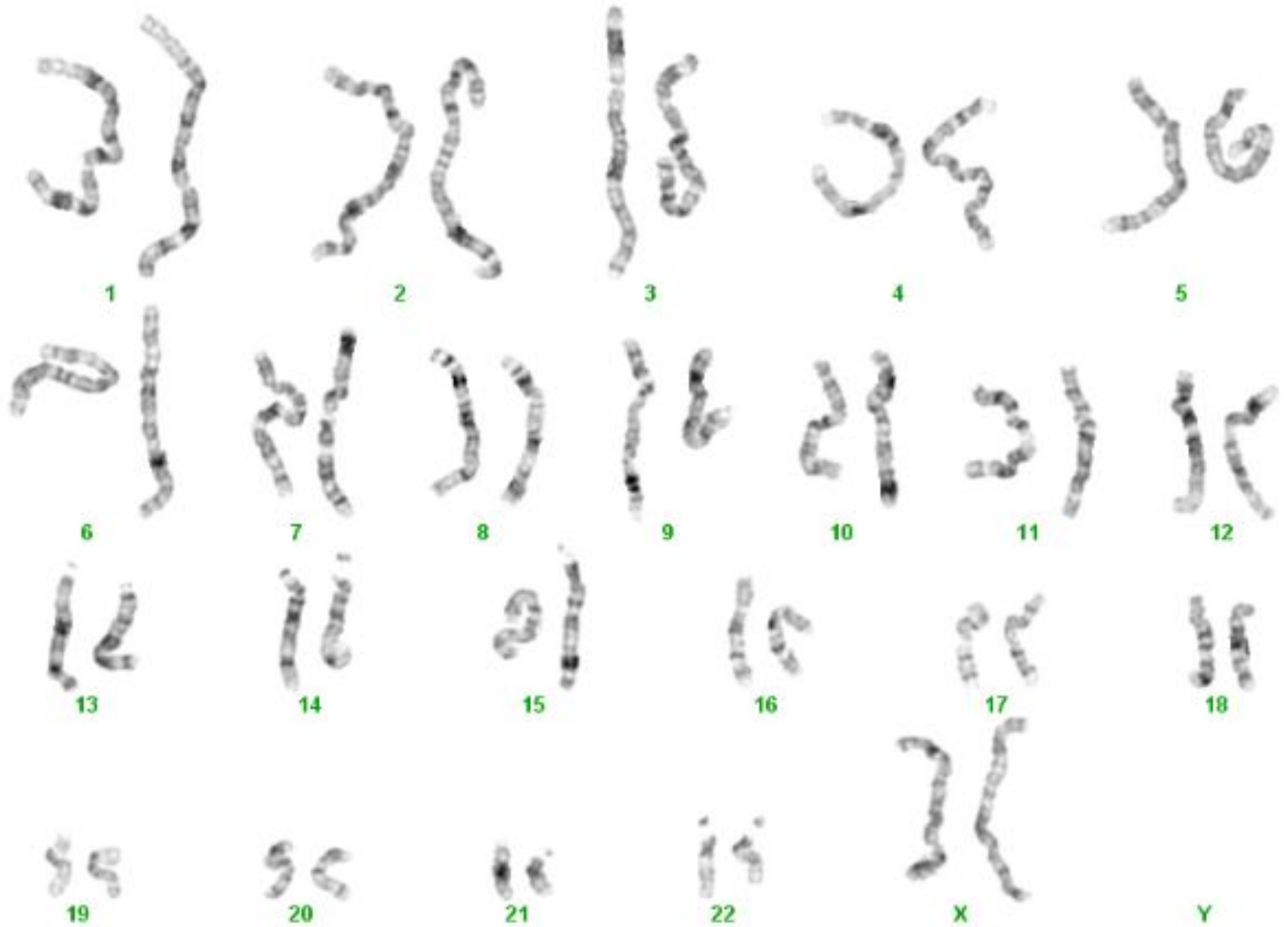


Karyotype: 46,XY,inv(12)(p11.2;q13.3)



marker chromosome

Karyotype: 47,XY,+mar



Karyotype: 46,XX male SRY+

- Σε υπογόνιμους άρρενες με δομικές χρωμοσωμικές αναδιατάξεις (αντιμεταθέσεις, παρικεντρικές αναστροφές, κ.α.) θα πρέπει να διευκρινίζεται πάντα:
 - 1) Το ποσοστό των καθέξιν αποβολών που θα οφείλονται στο χρωμοσωμικό εύρημα
 - 2) Το ποσοστό γέννησης βιώσιμου εμβρύου με χρωμοσωμικές ανωμαλίες

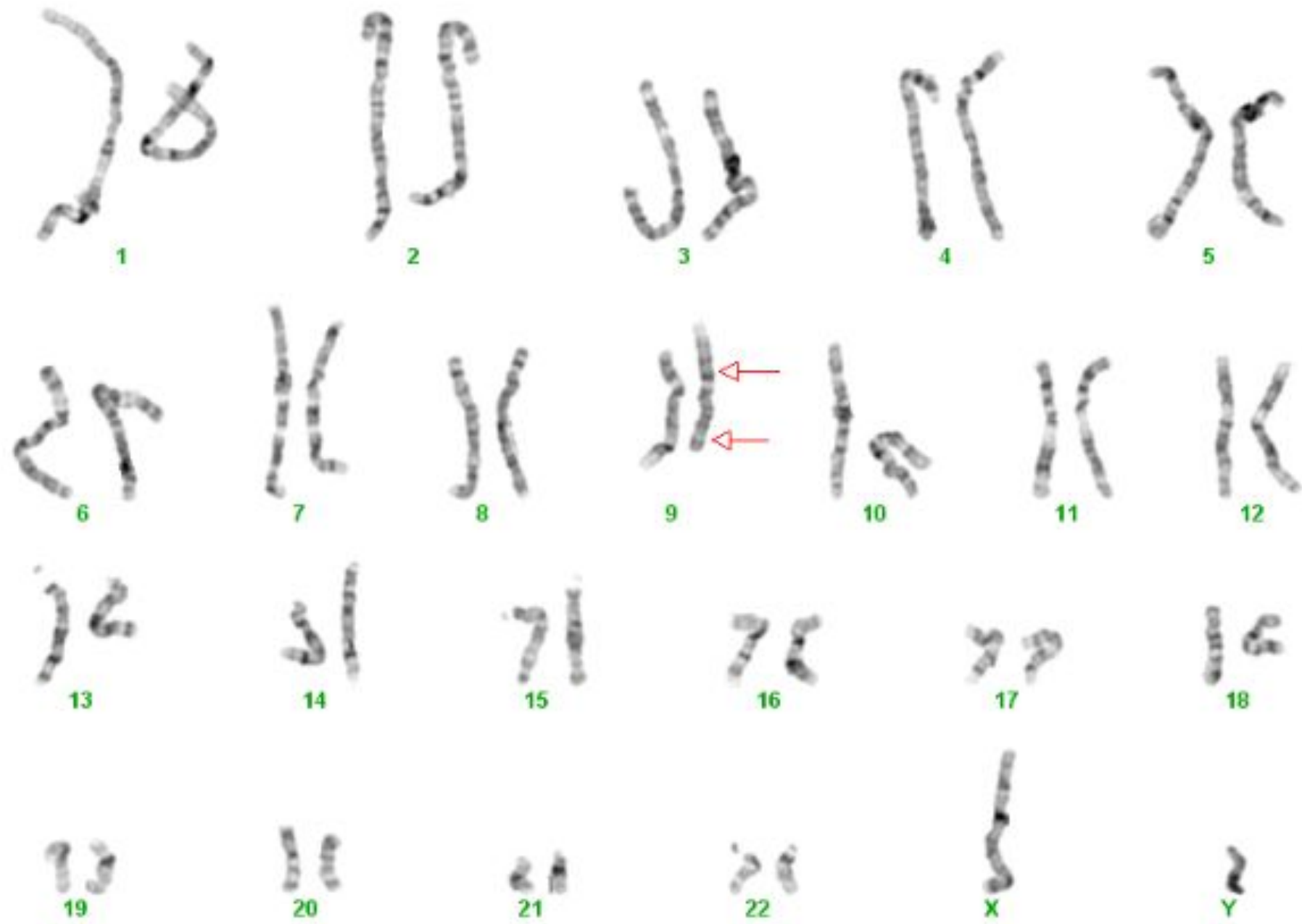
■ Αντιμεταθέσεις

Αντιμεταθέσεις όπου το εμπλεκόμενο χρωμοσωμικό υλικό είναι μεγάλο (και τα δύο χρωμοσώματα), εμπλέκονται σε καθέξιν αποβολές ή όχι.

Σε αντιμεταθέσεις όπου το εμπλεκόμενο χρωμοσωμικό υλικό είναι πολύ μικρό (τουλάχιστον το ένα χρωμόσωμα), εμπλέκονται σε καθέξιν αποβολές καθώς και γεννήσεις εμβρύων με παθολογικό φαινότυπο.

Περικεντρικές αναστροφές

Οι περικεντρικές αναστροφές εμπλέκονται σε καθέξιν αποβολές στις περιπτώσεις όπου το χρωμοσωμικό όπου αναστρέφεται είναι μεγαλύτερο του 50% του χρωμοσώματος στο οποίο ανήκει. Οι περικεντρικές αναστροφές σπάνια εμπλέκονται στη γέννηση παθολογικών εμβρύων.

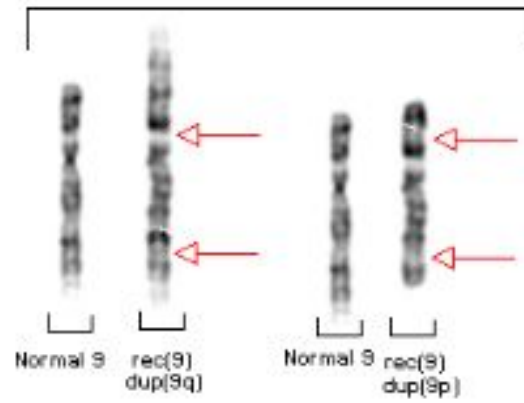


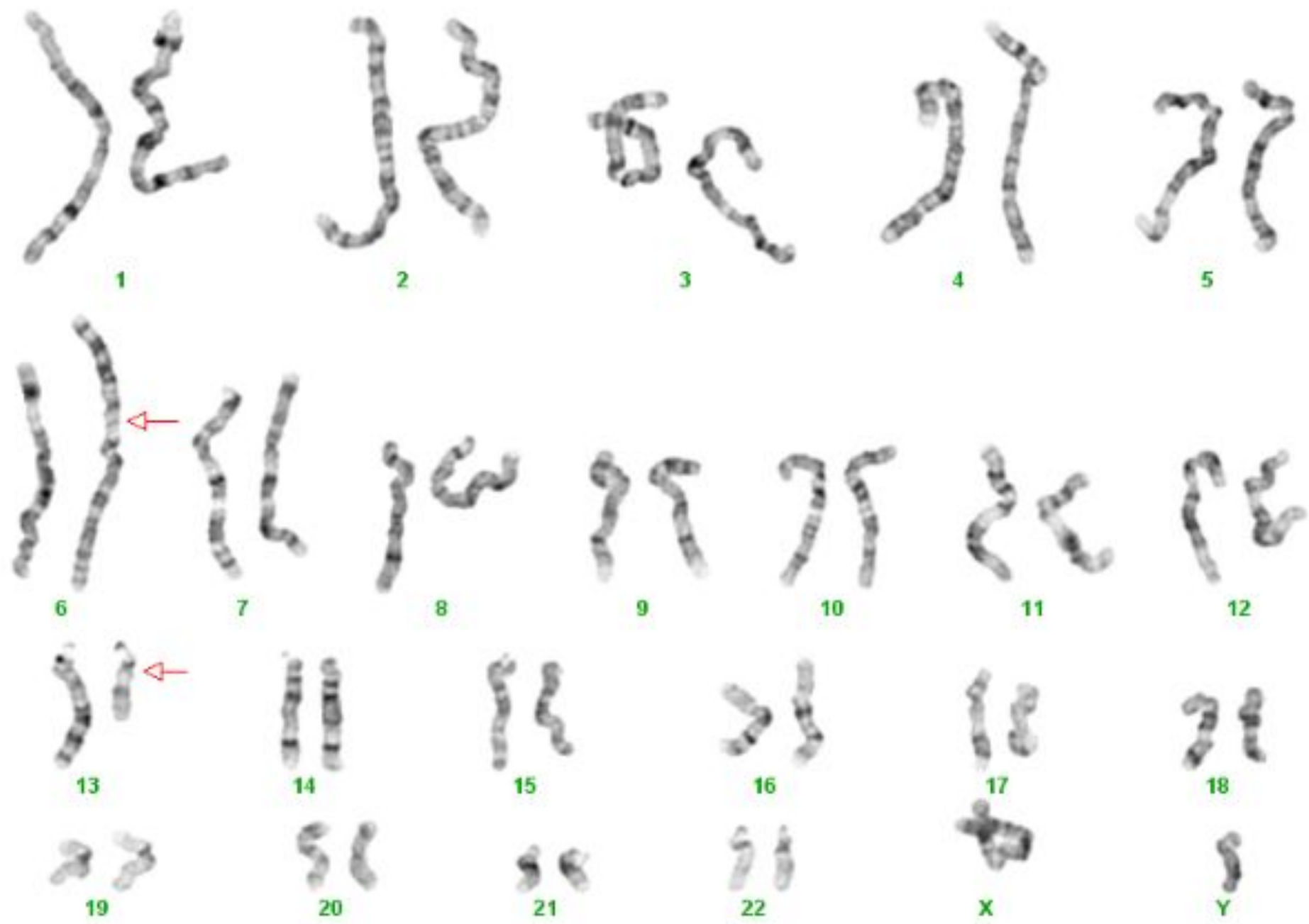
Karyotype: 46,XY,inv(9)(p22.3q22.3)

Heterozygous Parent



Recombinant Offspring





Karyotype: 46,XY,t(6;13)(p21.2;q12.1)

SEGRAGATION MODES

1) 2:2 segregation mode

- Alternate (Normal / Balanced)
- Adjacent (adjacent-1 / adjacent-2)

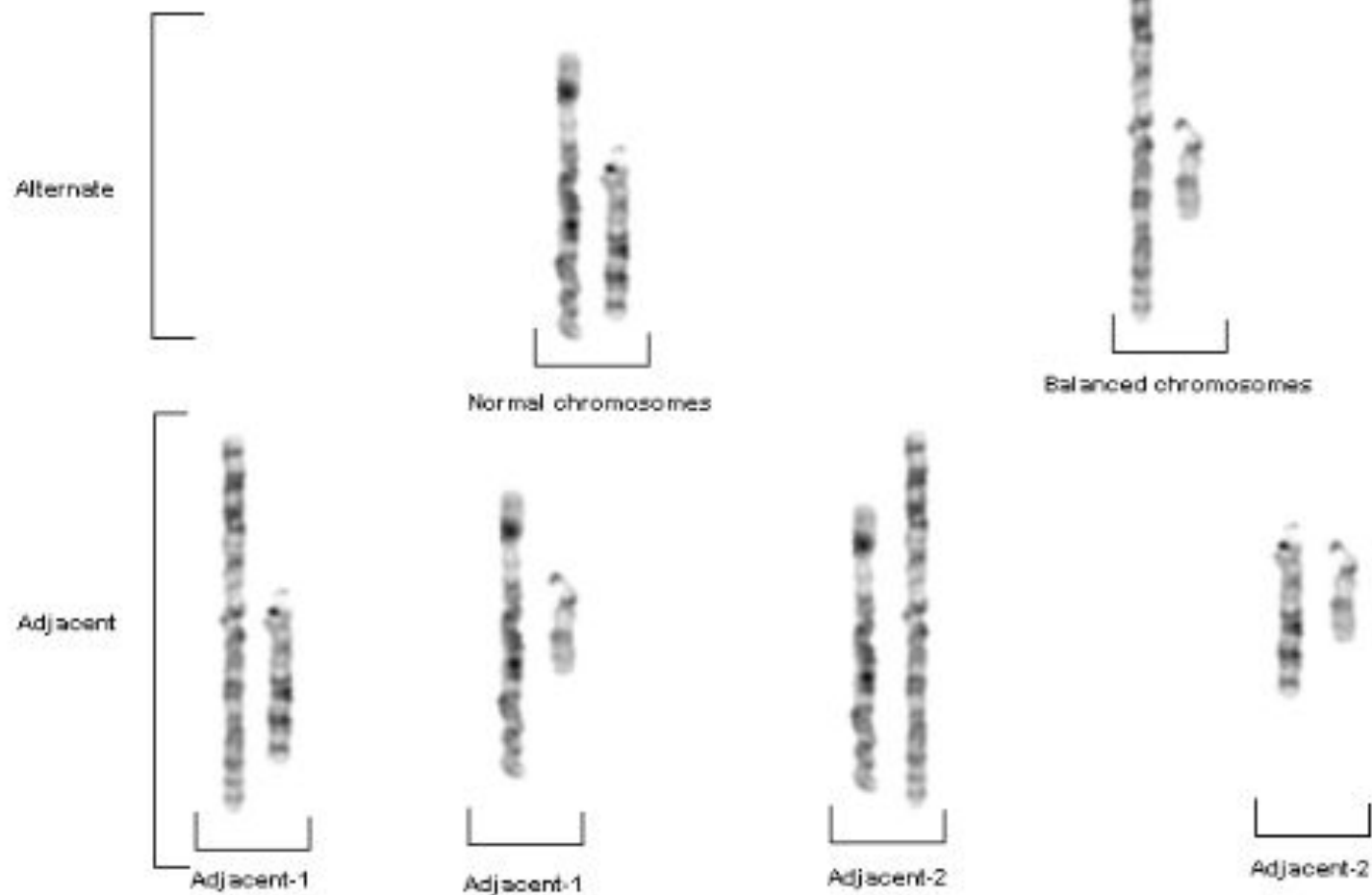
2) 3:1 segregation mode

- Tertiary trisomy, monosomy
- Interchange trisomy, monosomy

3) 4:0 segregation mode

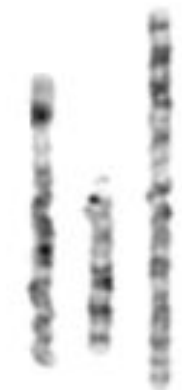
- Double trisomy
- Double monosomy

2:2 segregation mode



3:1 segregation mode

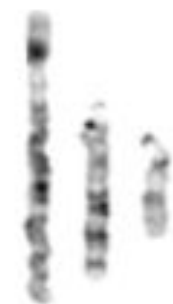
Tertiary trisomy, monosomy



tertiary trisomy



tertiary monosomy



tertiary trisomy



tertiary monosomy

Interchange trisomy, monosomy



interchange trisomy



interchange monosomy



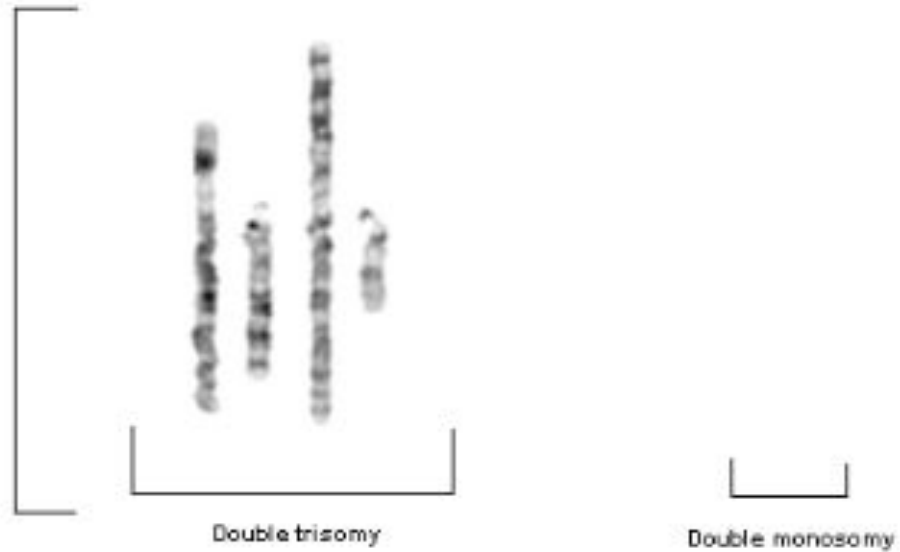
interchange trisomy

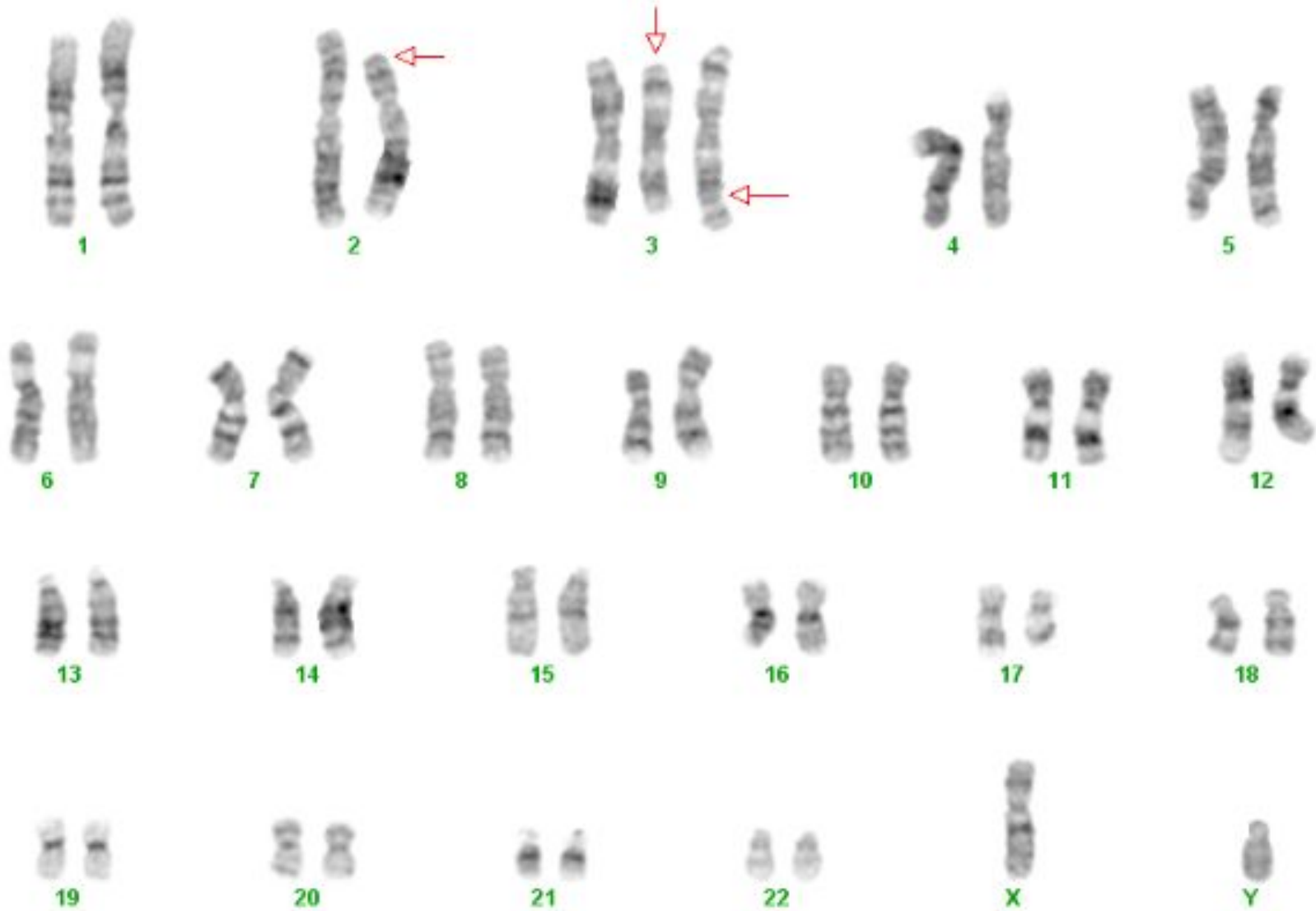


interchange monosomy

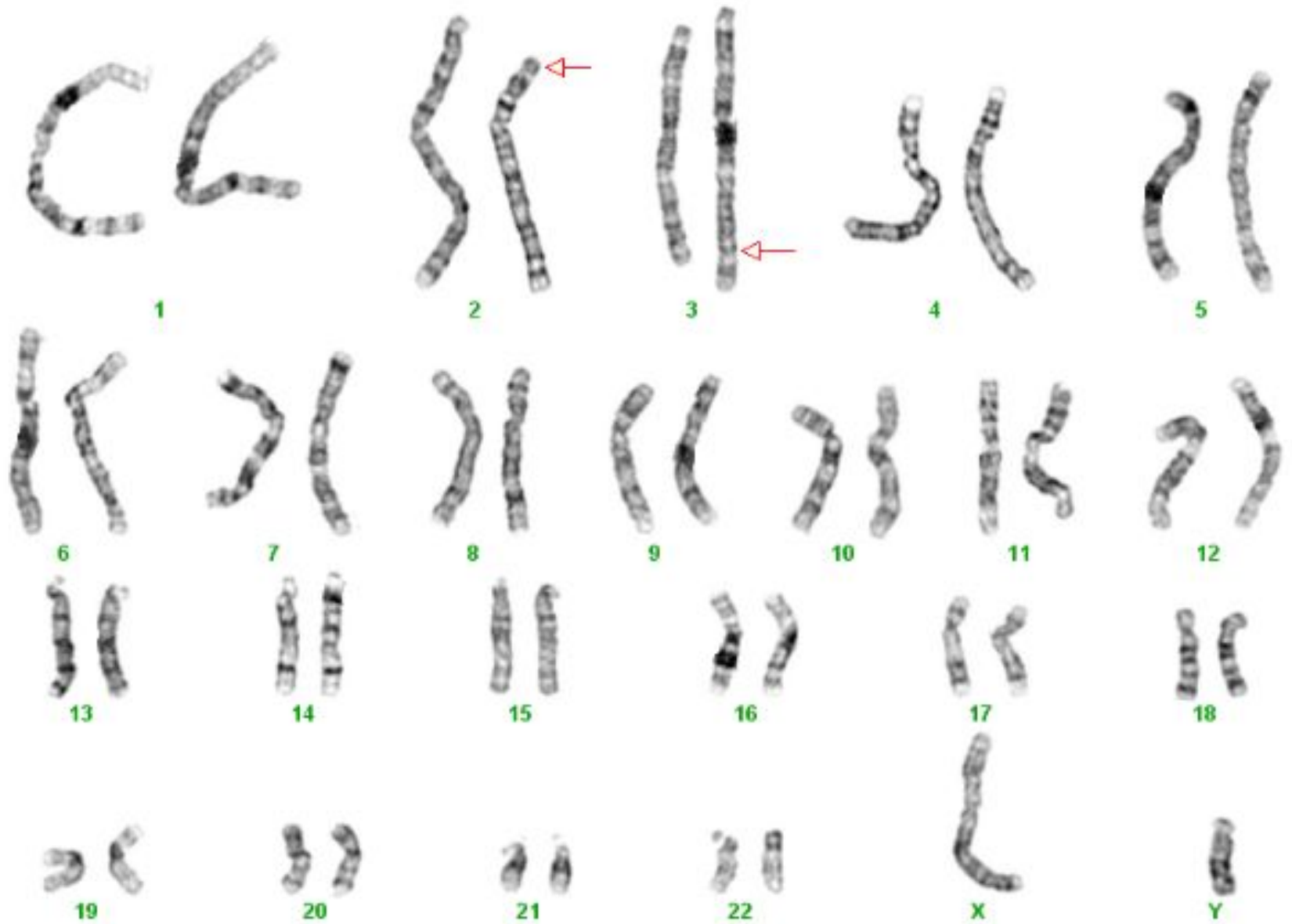
4:0 Segregation mode

Complete nondisjunction





Embryo karyotype: 47,XY,t(2;3)(p22;q29),+3



Karyotype: 46,XY,t(2;3)(p22;q29)

Μοριακή Κυτταρογενετική

- Η πιο διαδεδομένη μοριακή κυτταρογενετική είναι η FISH (fluorescent In situ Hybridization)
- Είναι μια σχετικά απλή τεχνική όπου μπορεί να εφαρμοσθεί σε πολλά διαφορετικά είδη δειγμάτων (περιφερικό αίμα, σπερματοζωάρια)
- Η βασική αρχή της FISH αφορά τη σήμανση με φθοριοχρώματα ειδικών DNA-ιχνηθετών, οι οποίοι υβριδοποιούνται συμπληρωματικά με το DNA στόχο του ιστού προς ανάλυση

Διάφοροι ιχνηθέτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν
όπως:

- Κεντρομερικοί, όπου ανιχνεύουν αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες
- Ειδικοί για συγκεκριμένα γονίδια, όπου ανιχνεύουν γονιδιακές ελλείψεις, ενισχύσεις καθώς και γονιδιακές αναδιατάξεις και τέλος
- Ειδικοί για την ανίχνευση συγκεκριμένων χρωμοσωμικών αναδιατάξεων, που χρησιμοποιούνται κυρίως στις αιματολογικές νεοπλασίες

Ο ιχνηθέτης (probe) για να υβριδοποιήσει το DNA-στόχο θα πρέπει να γίνει αποδιάταξη τόσο στο ίδιο όσο και στο DNA-στόχο. Αυτό μπορεί να γίνει με δύο τρόπους:

- Ταυτόχρονη αποδιάταξη του ιχνηθέτη και της αντικειμενοφόρου πλάκας, όπου τοποθετούμε το διάλυμα που περιέχει τον ιχνηθέτη πάνω στην περιοχή της αντικειμενοφόρου πλάκας που έχει τα περισσότερα κύτταρα. Καλύπτουμε την περιοχή με μία καλυπτρίδα και τοποθετούμε το πλακάκι στην θερμαινόμενη πλάκα στους 73° για 2-5 λεπτά.

- Αποδιάταξη του ιχνηθέτη και της αντικειμενοφόρας πλάκας ξεχωριστά. Σε αυτή την περίπτωση εμποτίζουμε το πλακάκι προς ανάλυση σε διάλυμα φορμαμιδίου 70%, το οποίο βρίσκεται σε υδατόλουτρο στους 73^ο για 5 λεπτά και μετά το περνάμε από μία σειρά από αιθανόλες για 1 κάθε φορά (70%,85% και 100%). Έπειτα βάζουμε το διάλυμα του ιχνηθέτη σε eppendorf tube και το τοποθετούμε στο υδατόλουτρο στους 73^ογια 5 λεπτά. Τοποθετούμε το διάλυμα του ιχνηθέτη στην αντικειμενοφόρο πλάκα και τοποθετούμε την καλυπτρίδα.

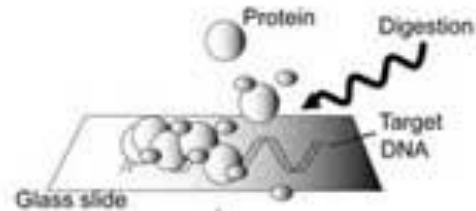
Βάζουμε το πλακάκι στον κλίβανο στους 73° για 12-16 ώρες, σε ένα κουτί που να του παρέχει αρκετή υγρασία.

Τα ξεπλύματα γίνονται με τέσσερα διαλύματα που βρίσκονται σε υδατόλουτρο στους 43° :

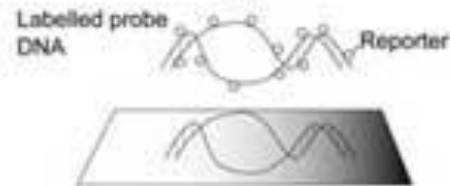
1. 50% φορμαμίδιο
2. 50% φορμαμίδιο
3. 2xSSC και
4. NP40

Όταν περάσει το διάλυμά μας αυτή την επεξεργασία, θα μπει μια αντιχρωστική, το DAPI και θα ξαναμπει καλυπτρίδα από πάνω.

1. DNA unmasking



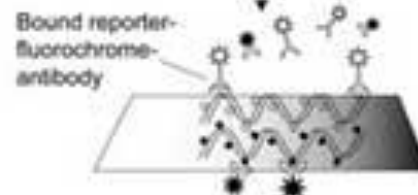
2. Probe and target denaturation



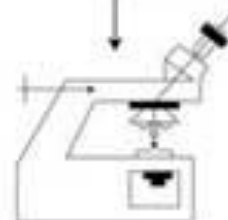
3. Probe-target DNA hybridization



4. Detection



5. Image analysis on fluorescent microscope



- FISH για ανίχνευση ανευπλοειδιών στα σπερματοζωάρια
- FISH για την ανίχνευση του χρωμοσωμικού διαχωρισμού στα σπερματοζωάρια σε άρρενες που φέρουν ισοζυγισμένες αυτοσωμικές μεταθέσεις (segregation modes)

FISH probes specific for chromosomes X, Y and 18



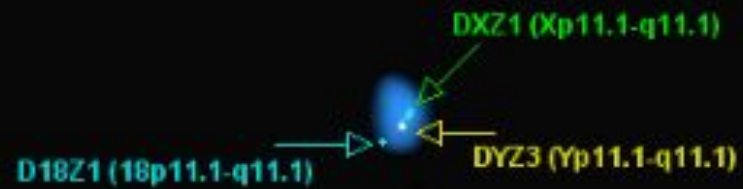
Normal haploid sperm cell (N 23,X)

FISH probes specific for chromosomes X, Y and 18



Normal haploid sperm cell (N 23,Y)

FISH probes specific for chromosomes X , Y and 18



Abnormal haploid sperm cell (N 24,XY)

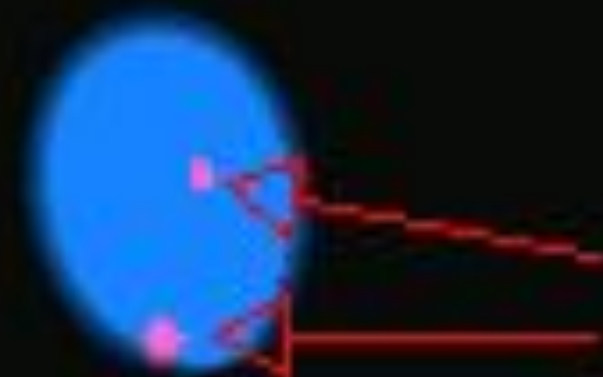
FISH probes specific for chromosomes X, Y and 18



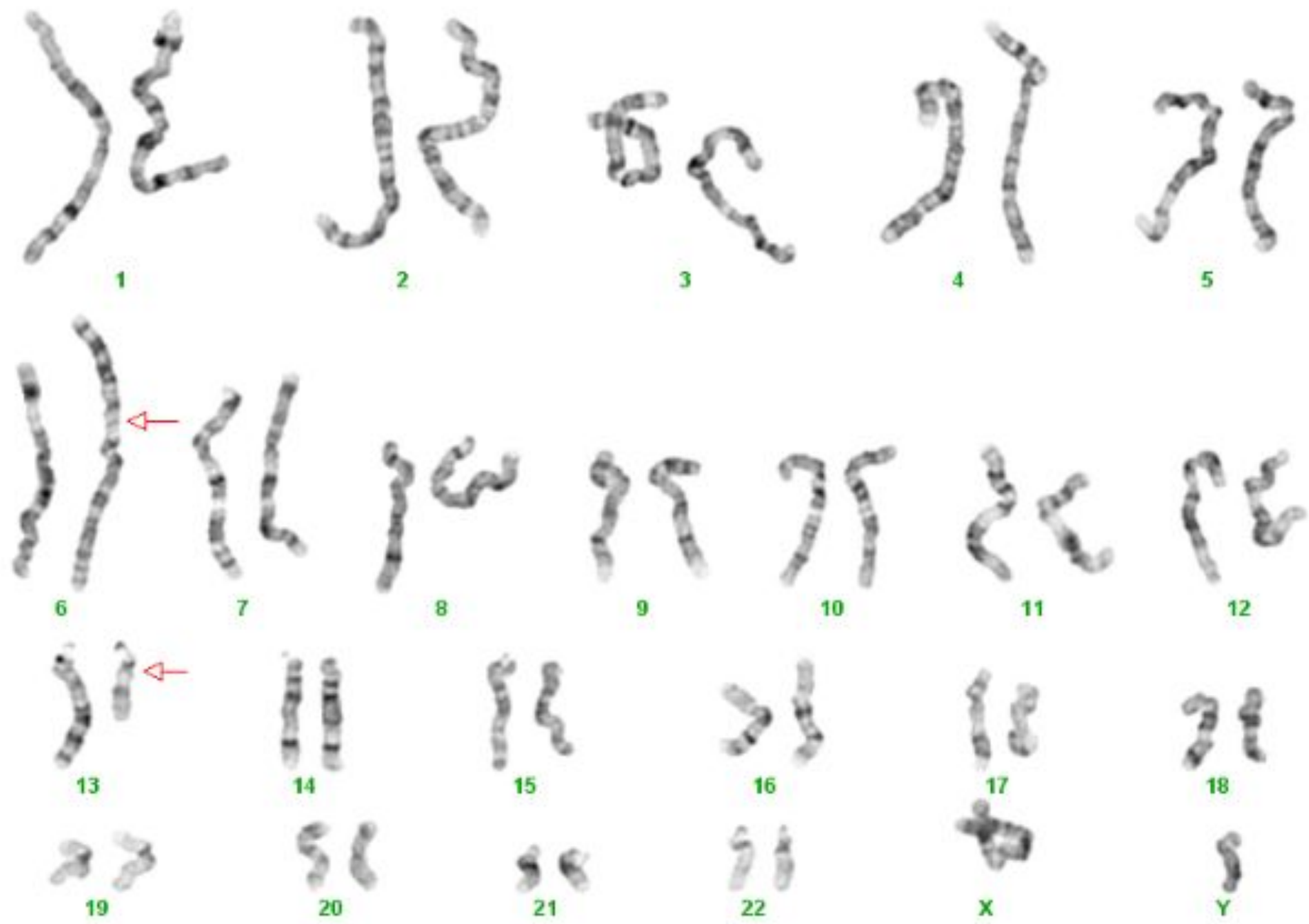
Abnormal haploid sperm cell (N 24,X,18,18)



Chromosome 21

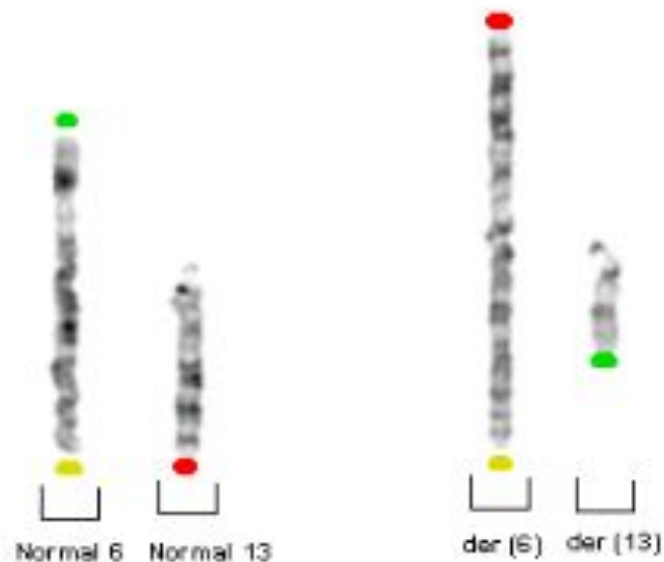


Chromosomes 21



Karyotype: 46,XY,t(6;13)(p21.2;q12.1)

FISH probes specific for chromosomal regions **6 pter**, **6 qter probe** and **13 qter**



FISH probes specific for chromosomal regions **6 pter** , **6 qter** and **13 qter**



Normal haploid sperm cell (23N) with normal or balanced chromosomes 6 and 13
(2:2 alternate segregation mode)

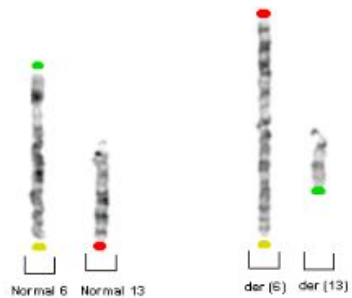
FISH probes specific for chromosomal regions **6 pter**, **6 qter** and **13 qter**



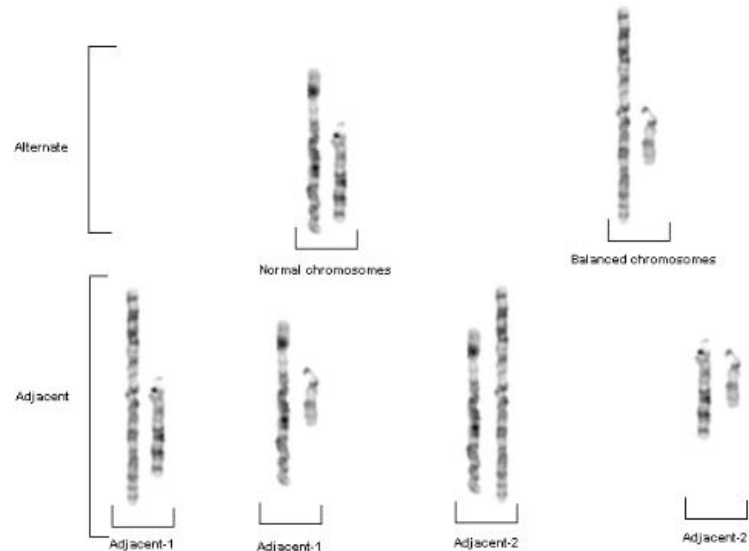
Abnormal haploid sperm cell (23N) with one normal chromosome 6, and one derivative chromosome 13 .

(2:2 adjacent -1 segregation mode)

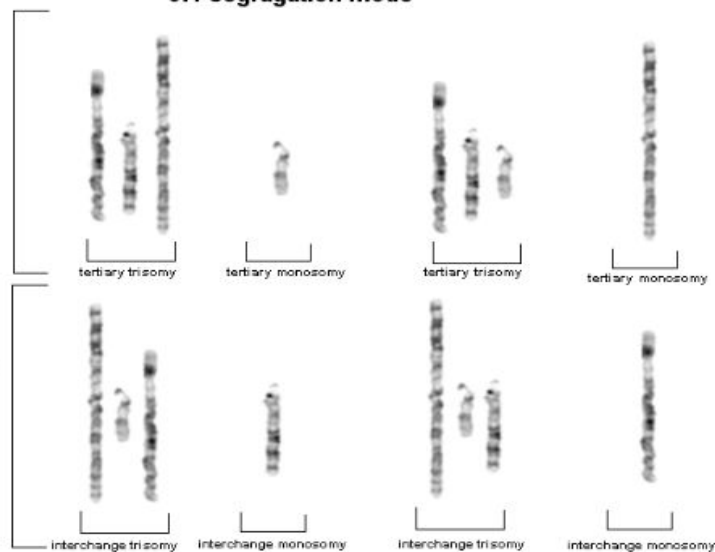
FISH probes specific for chromosomal regions 6 pter, 6 qter probe and 13 qter



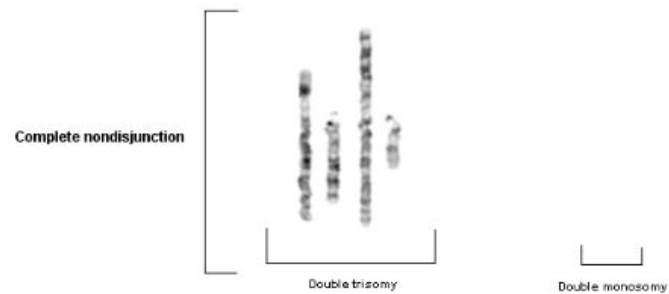
2:2 segregation mode



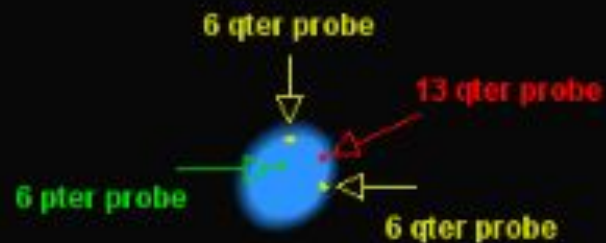
3:1 segregation mode



4:0 Segregation mode

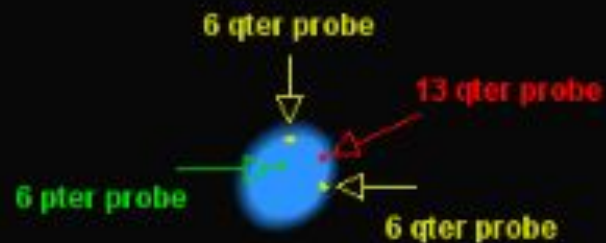


FISH probes specific for chromosomal regions **6 pter**, **6 qter** and **13 qter**



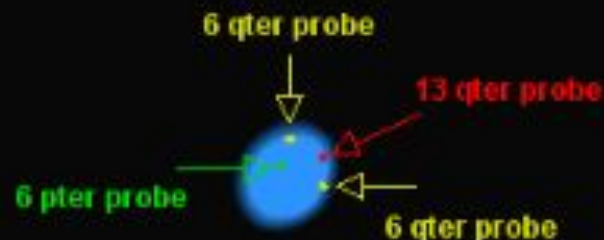
Normal? Abnormal? Segregation mode?

FISH probes specific for chromosomal regions **6 pter**, **6 qter** and **13 qter**



Abnormal haploid sperm cell (23N). Segregation mode?

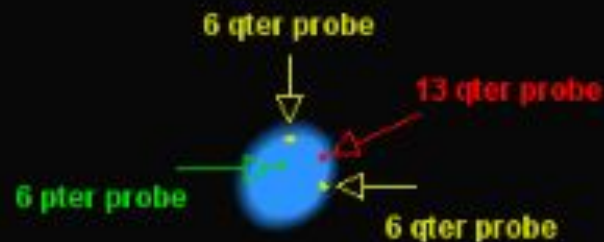
FISH probes specific for chromosomal regions **6 pter**, **6 qter** and **13 qter**



Abnormal haploid sperm cell (23N) with one normal chromosome 6, one derivative chromosome 6 and no chromosome 13.

Segregation mode?

FISH probes specific for chromosomal regions **6 pter**, **6 qter** and **13 qter**

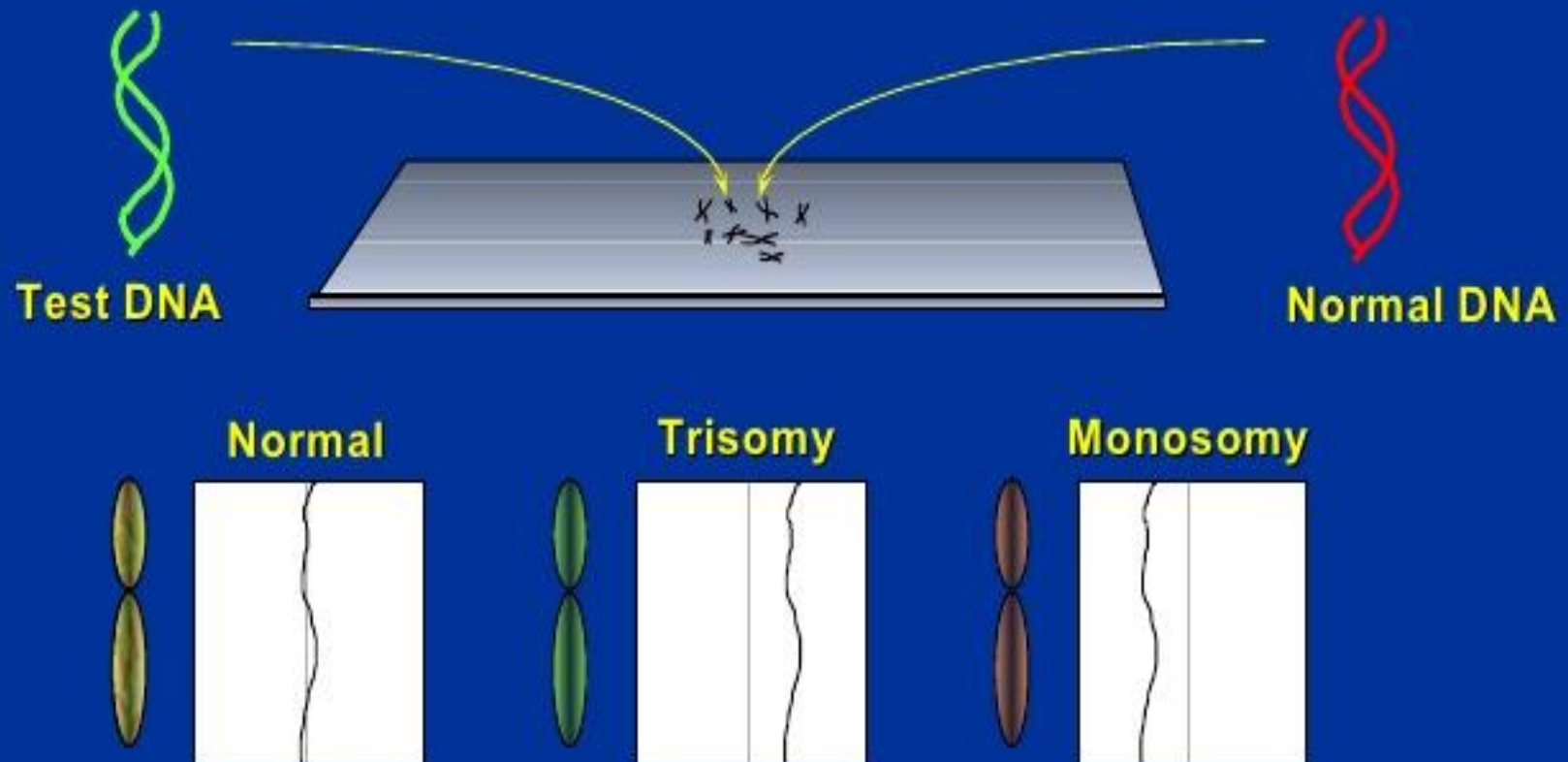


Abnormal haploid sperm cell (23N) with one normal chromosome 6, one derivative chromosome 6 and no chromosome 13.

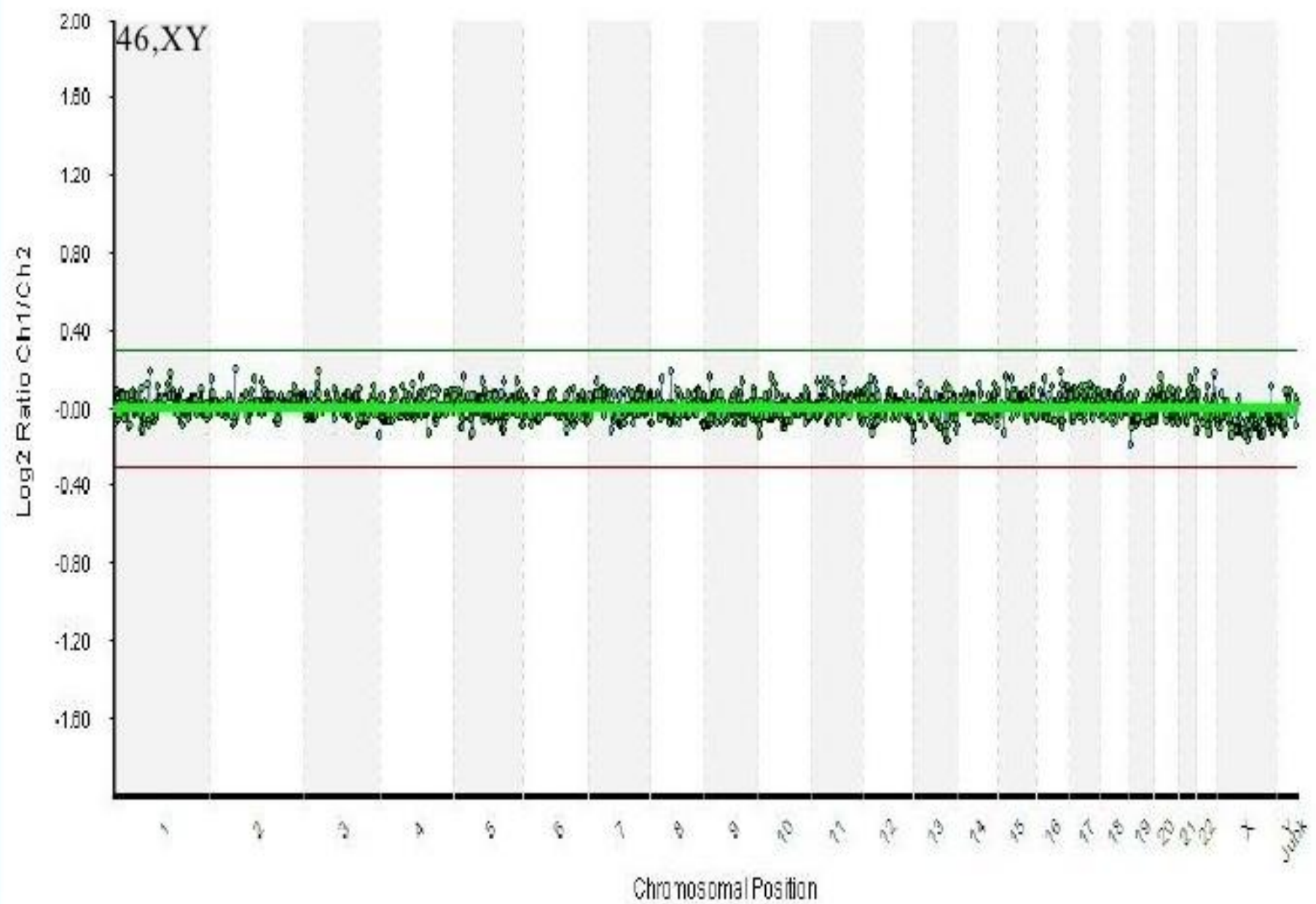
(2:2 adjacent -2 segregation mode)

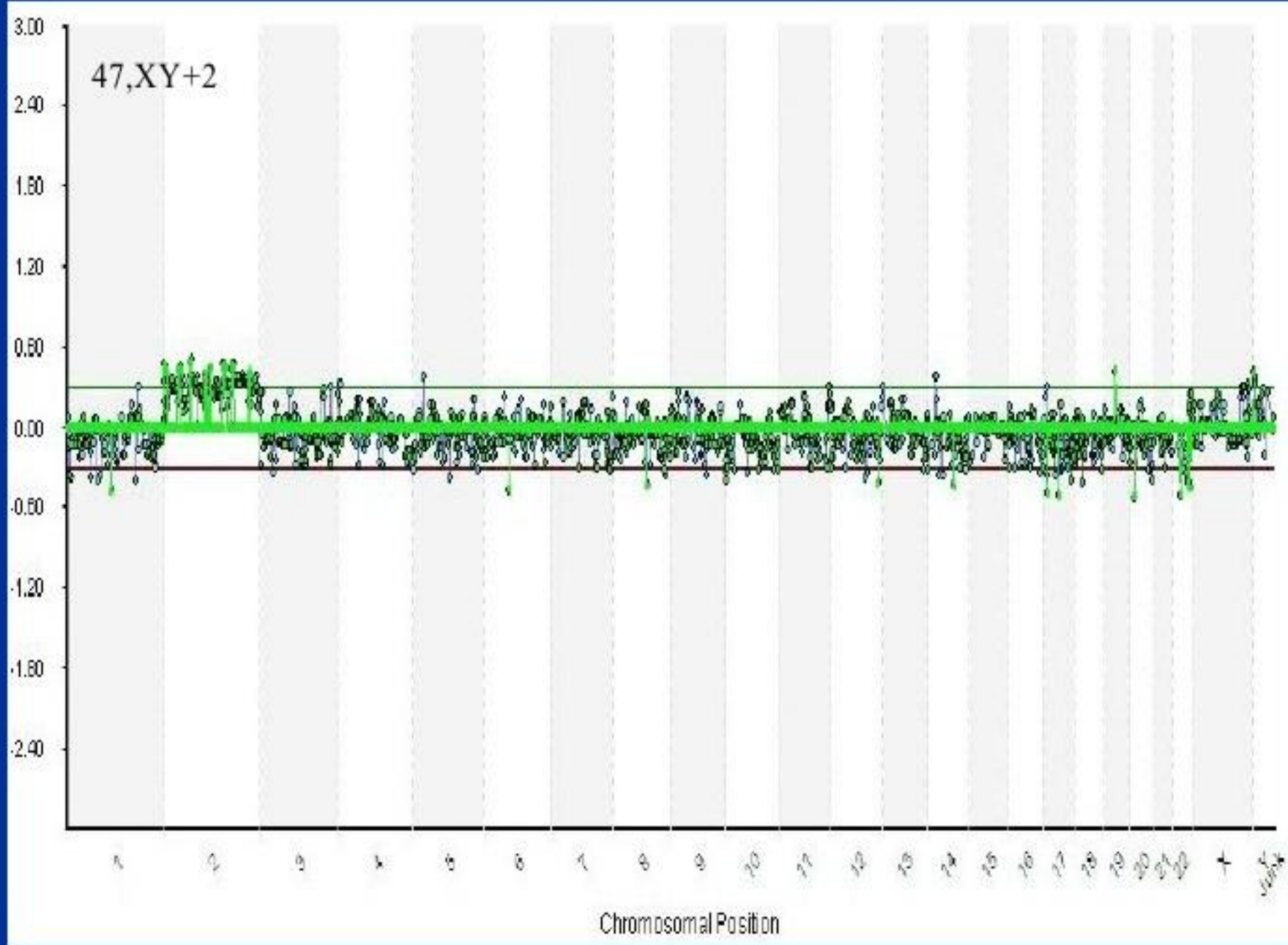
- Με την τεχνική array CGH συγκρίνεται ο αριθμός αντιγράφων DNA (CNVs) ενός γονιδιώματος δείγματος αναφοράς (control) με εκείνο ενός ασθενούς, μέσω διαφορετικής σήμανσης του γενομικού DNA με διαφορετικά φθοριοχρώματα. Τα ιχνηθετημένα δείγματα υβριδίζονται ανταγωνιστικά πάνω σε συστοιχία αλληλουχιών DNA, στέρεα ακινητοποιημένων σε γυάλινα πλακίδια- και όχι σε μεταφασικά χρωμοσώματα- και ακολούθως αναλύεται ο λόγος των φθοριοχρωμάτων που προκύπτει. Κατά συνέπεια, η τεχνική array CGH είναι καθαρά μοριακή με κυτταρογενετικές εφαρμογές και αντιπροσωπεύει μέθοδο υβριδική.

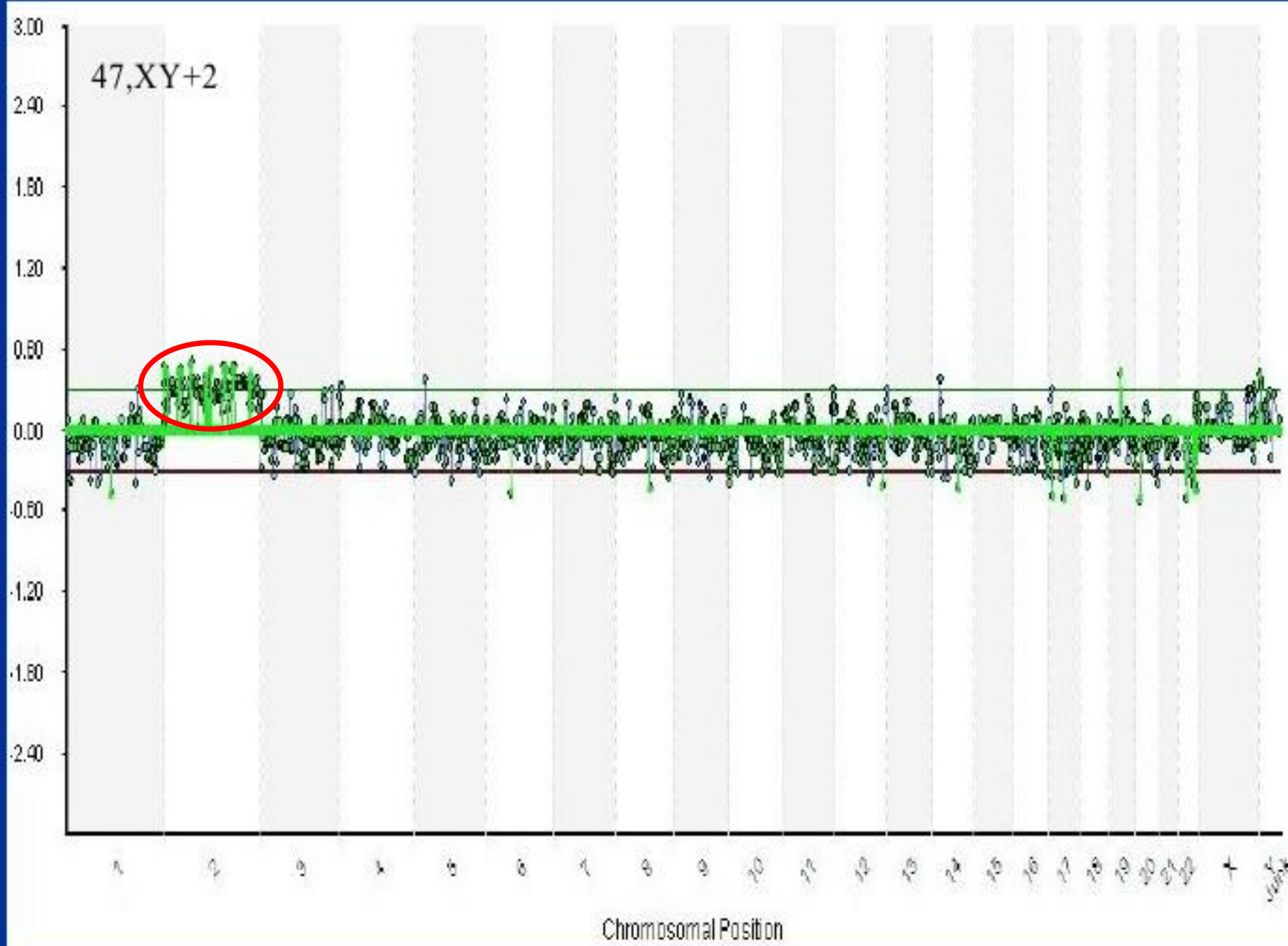
Comparative Genome Hybridization (CGH)



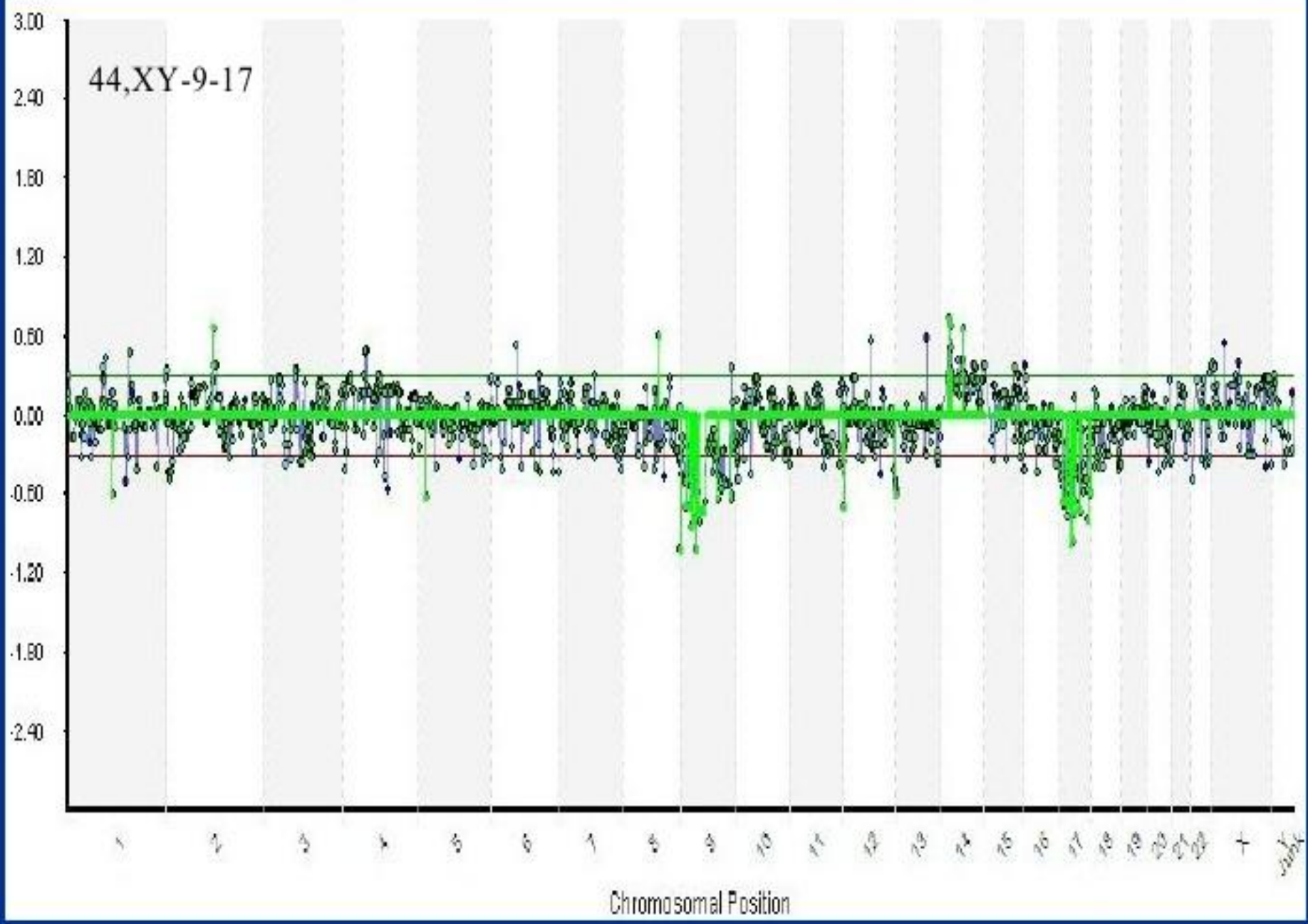
Kallioniemi et al. (1992), applied to single cells by Wells et al. (1999)



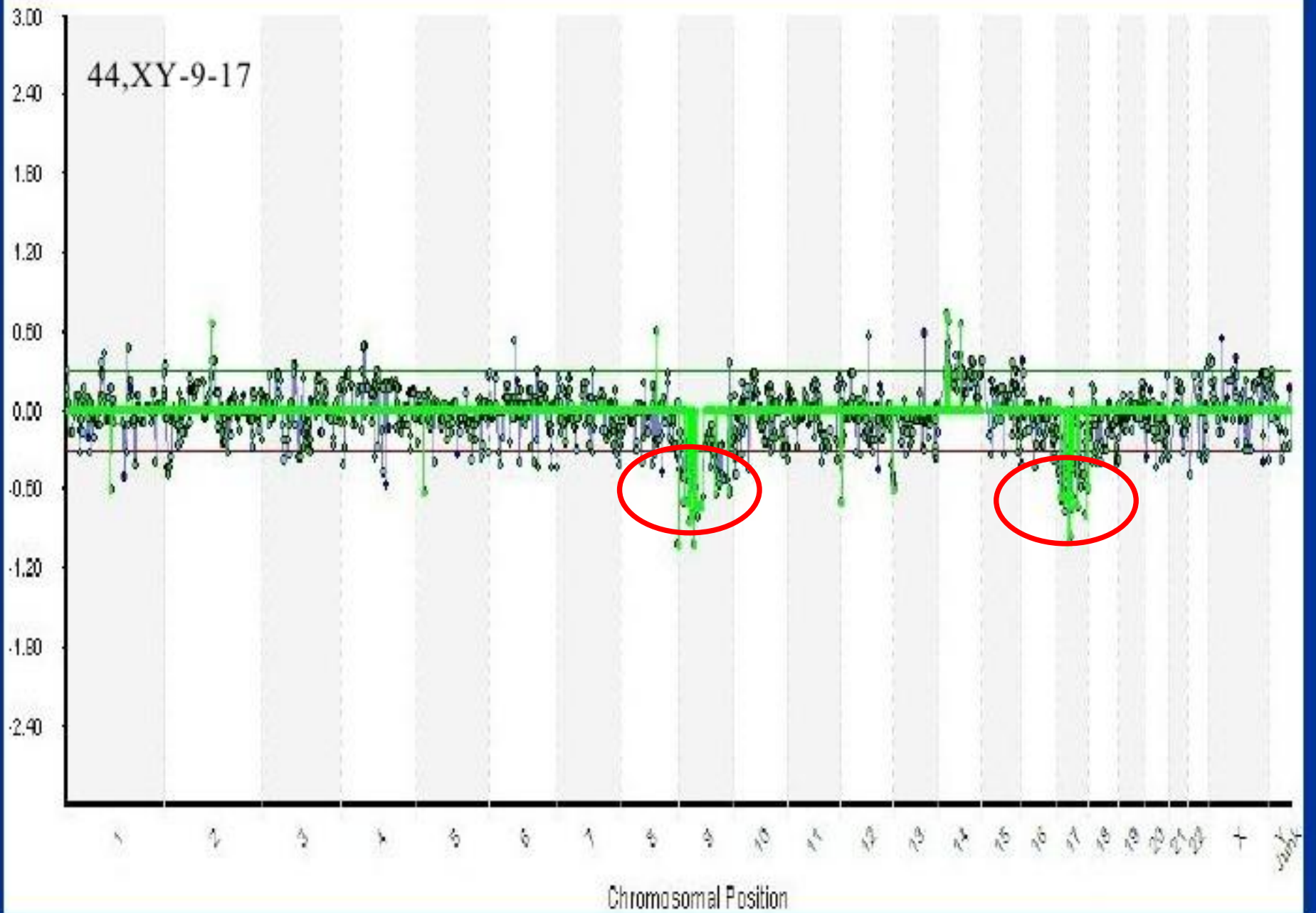




44,XY-9-17



44,XY-9-17





Ευχαριστώ για την προσοχή σας!