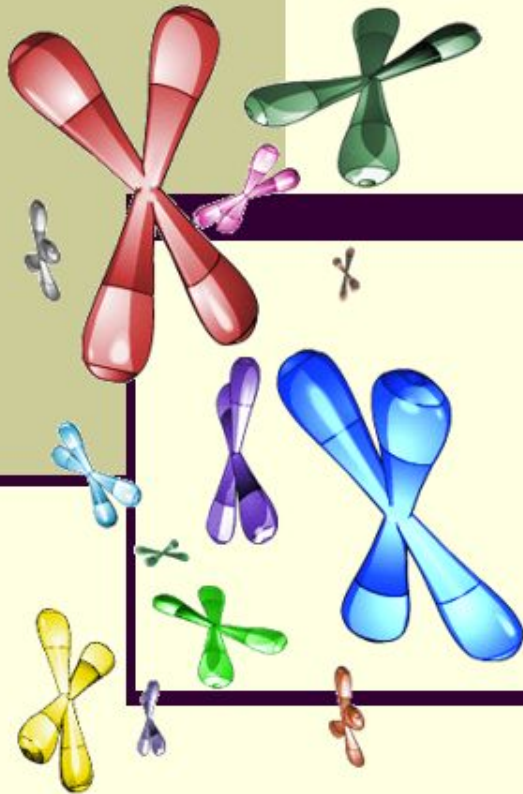


Metody molekulární cytogenetiky

Mgr. Hana Filková

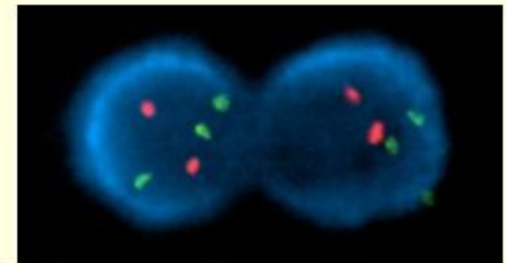


Oddělení lékařské genetiky
FN Brno



Molekulární cytogenetika – hlavní výhody

- představuje spojení mezi klasickou cytogenetikou a molekulární biologii
- využívá poznatky molekulární biologie, mikroskopie a počítačové analýzy obrazu ke studiu struktury a vlastností chromozomů
- umožňuje analýzy početních i strukturních odchylek chromozomů neidentifikovatelných klasickými cytogenetickými technikami
- zvyšuje rozlišení cytogenetických analýz
- nevyžaduje přítomnost mitózy, hodnocení aberací v interfázních buňkách (I-FISH)



Materiál pro cytogenetické vyšetření

- periferní krev
- vzorky různých tkání (biopsie kožní)
- buňky plodové vody, choriových klků, placenty
- pupečnicková krev
- buňky kostní dřeně
- vzorky solidních nádorů

- *Izolovaná DNA*
- *Suspenze buněk (jádra interfázní či metafáze)*

I. Metody molekulární cytogenetiky

FISH (fluorescenční in situ hybridizace)

detekce balancovaných i nebalancovaných změn

**Mnohobarevná FISH – M FISH;
Spektrální karyotypování (SKY)**

detekce balancovaných i nebalancovaných změn v genomu

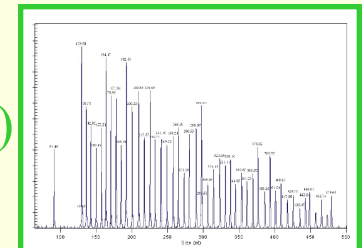
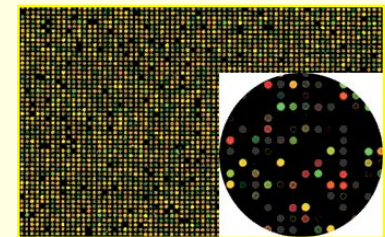
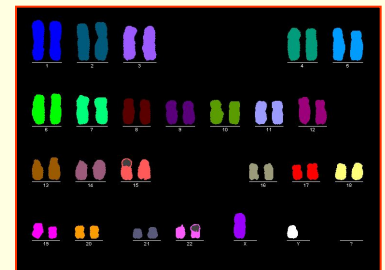
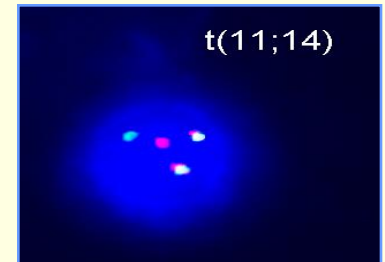
**Array-CGH - komparativní genomová
hybridizace na čipech**

Agilent's Human CGH Microarray Kit

detekce nebalancovaných změn v celém genomu

MLPA (Multiple Ligation-dependent Probe Amplification)

detekce nebalancovaných změn

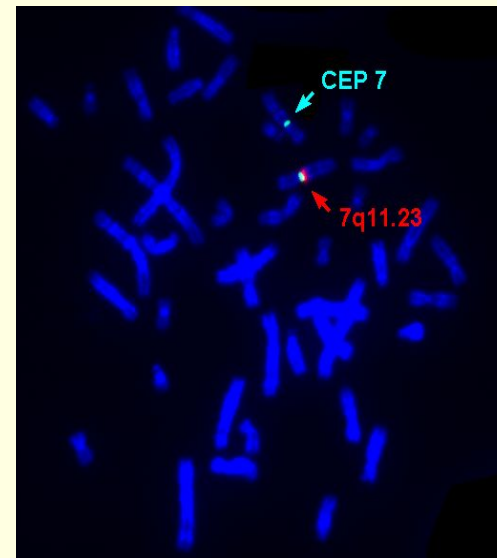
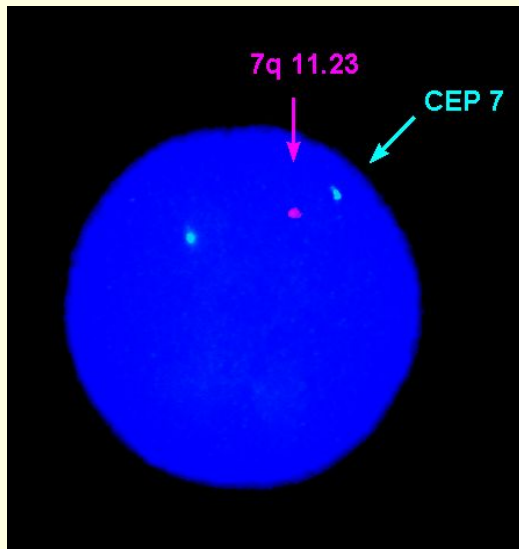


FISH = fluorescenční *in situ* hybridizace

Umožňuje detekci balancovaných i nebalancovaných změn v interfázních buňkách i v mitózách

- 1969 Parduová a Gall - radioaktivní značení
- 1986 Pinkel a spol. - fluorescenční značení (FISH)

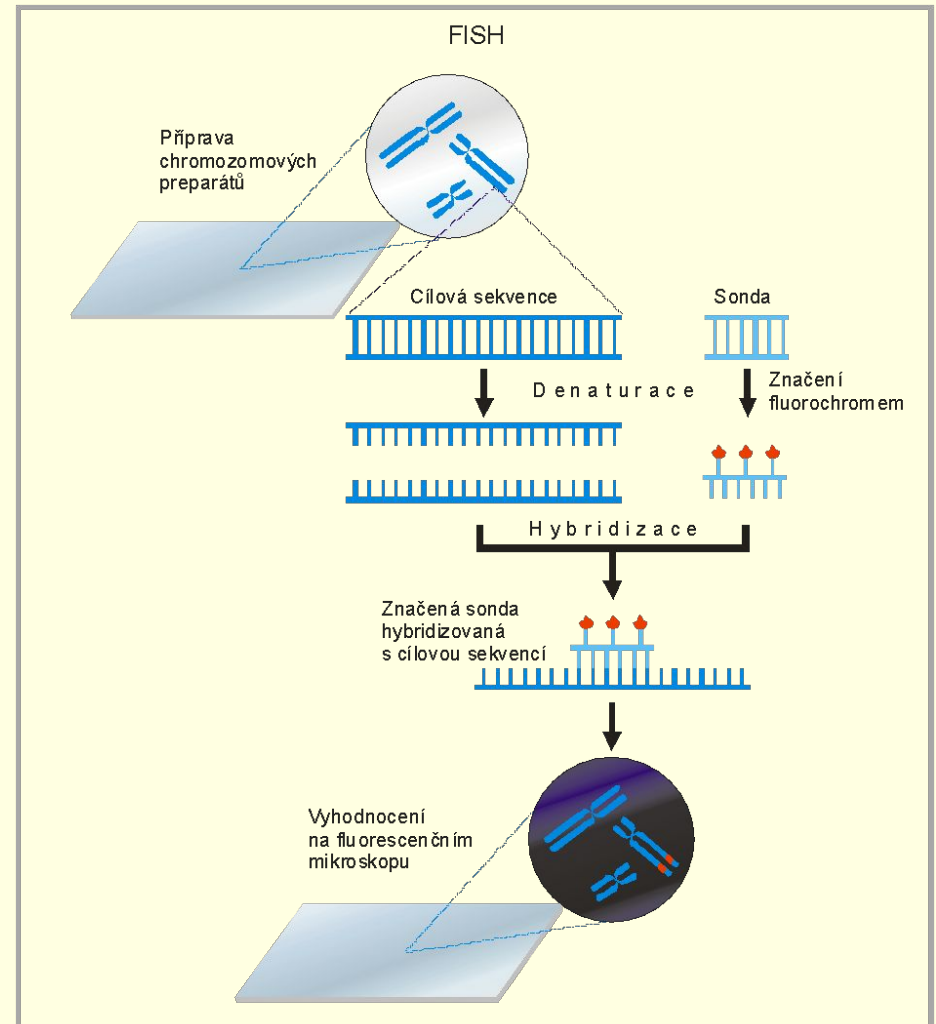
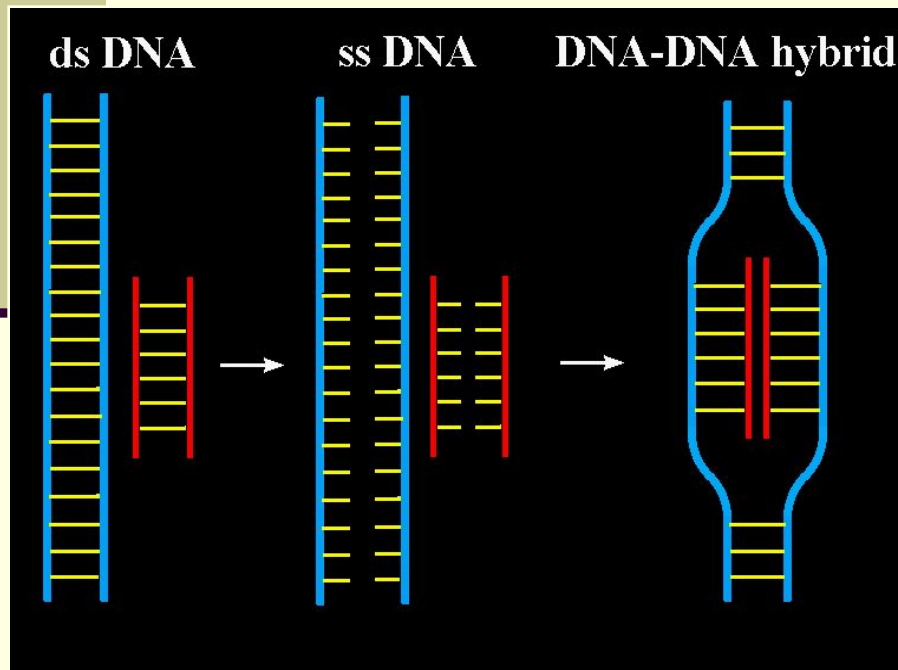
Hybridizace sondy (značené fluorescenčním barvivem) s chromozómy na cytogenetickém preparátu



Postup FISH

Zhotovení kvalitních preparátů

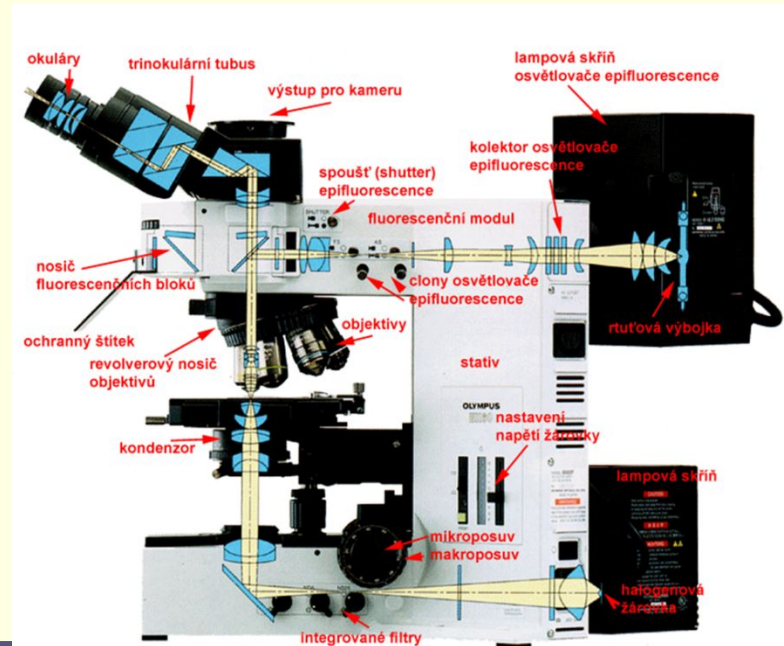
1. Denaturace sondy i cílového místa
2. Hybridizace
3. Odmytí
4. Barvení pozadí
5. Hodnocení pomocí fluorescenčního mikroskopu



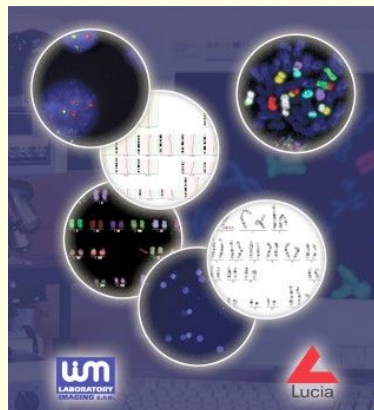
FISH Vybavení



- fluorescenční mikroskop vybavený sadou fluorescenčních filtrů
- citlivá ČB kamera
- počítač a specifické programové moduly pro aplikace FISH, M-FISH



A screenshot of the MetaSystems website. The header includes the company name and logo. The main content area features a large image of the Ikaros Karyotyping System, a computer monitor displaying a karyotype, and a list of software features such as 'CoolCube 1', 'Add. Capture', 'Object Threshold', and 'Mask Metaphase'. The website also includes a navigation menu with 'Home', 'Applications', 'Products', 'News', and 'About', and a search bar at the bottom.

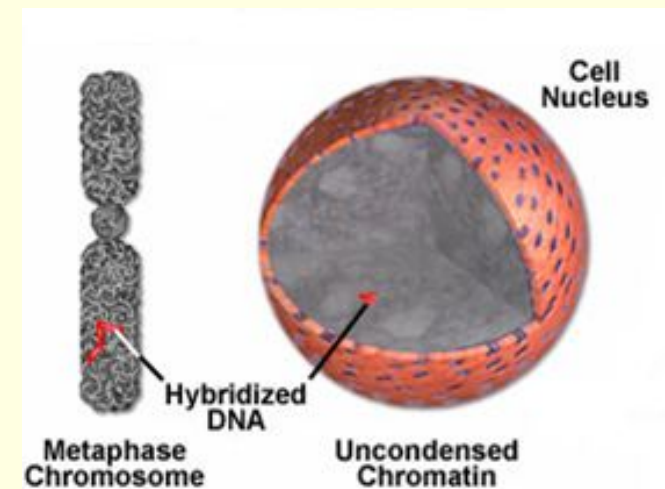
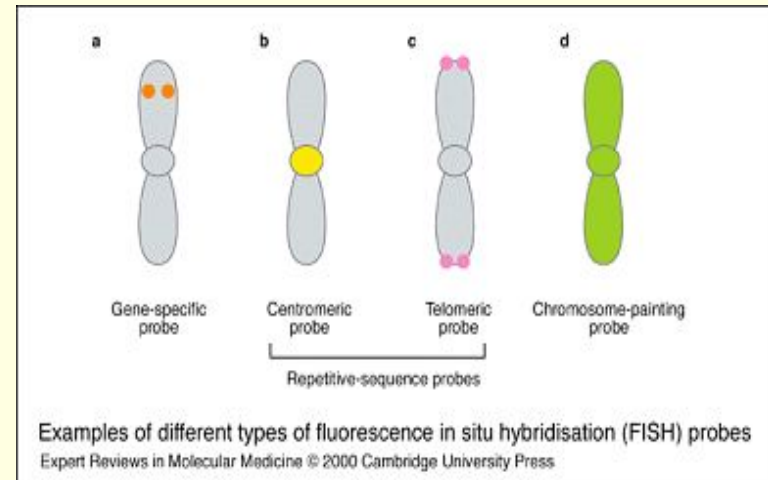


FISH : Typy sond

- Celochromozomové
- Centromerické
- Sondy subtelomerické
- Sondy lokus specifické

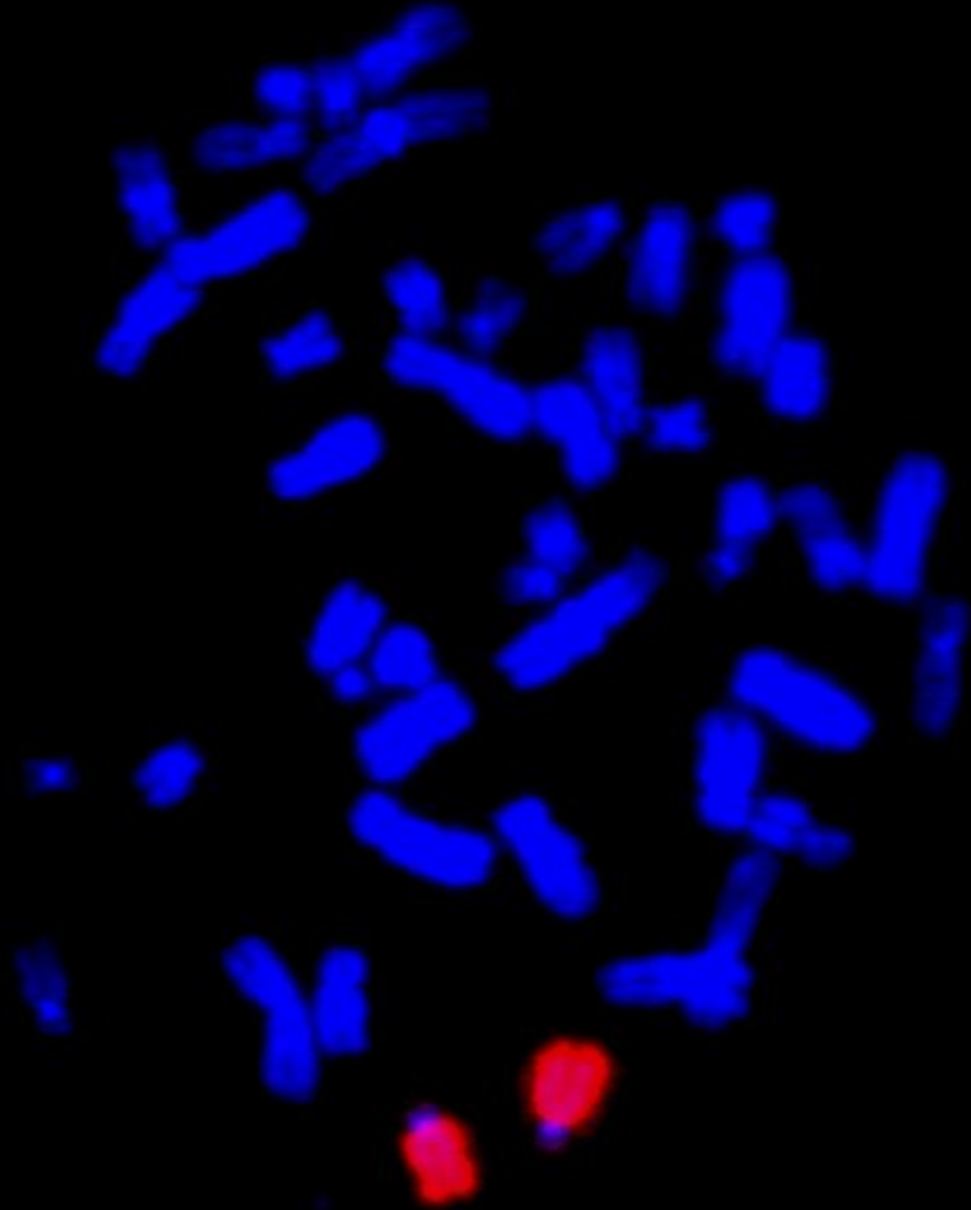
Sondy pro jedinečné sekvence:

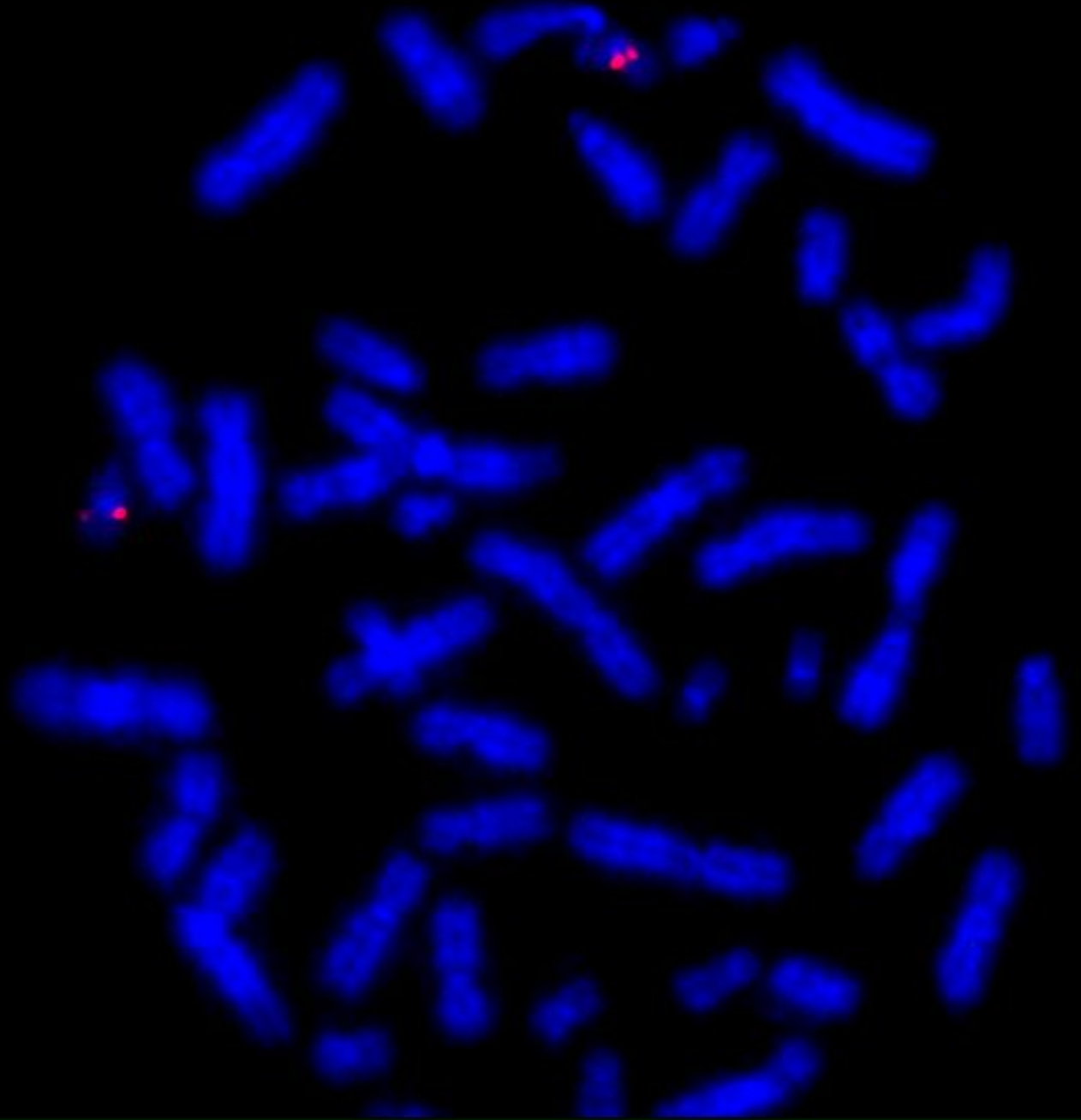
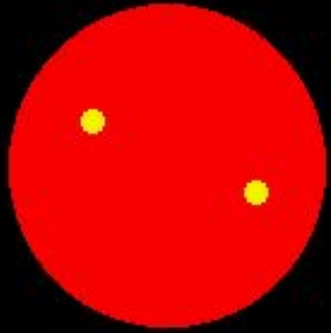
- plazmidové (500pb-5 kb)
- kosmidové (20-50 kb)
- bakteriofág lambda (8-15 kb)
- YAC klony (50-1000 kb)



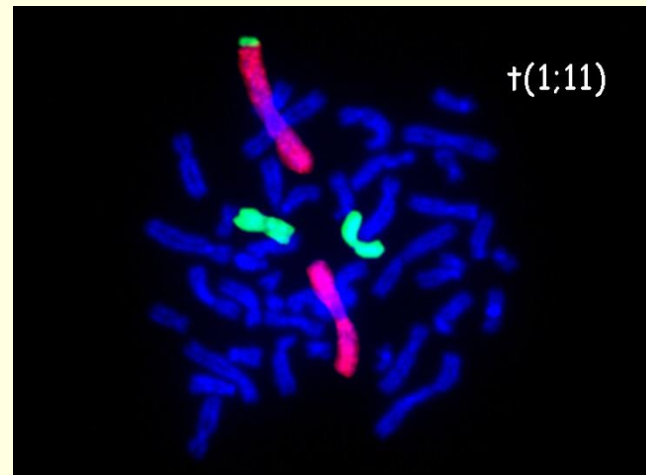
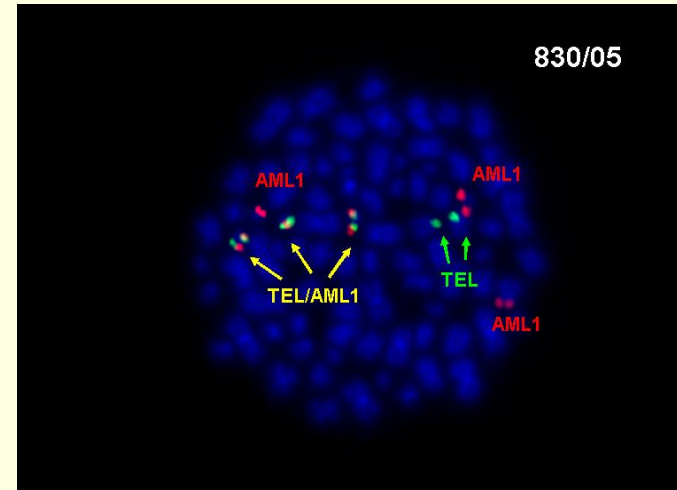
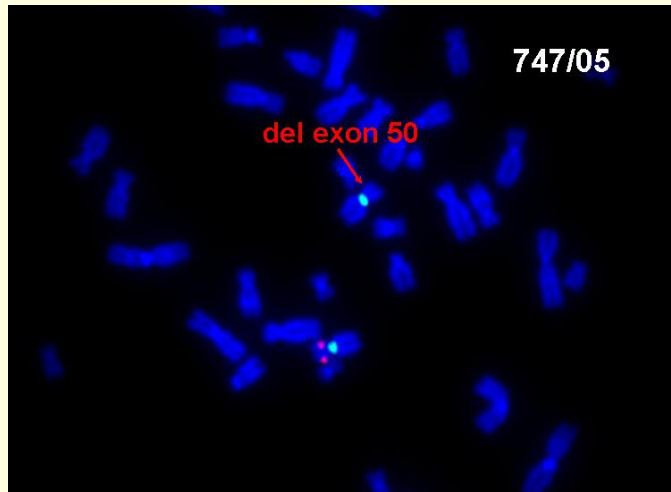
Značení DNA sond

- **fluorochromy**, Texas Red, Spectrum Green, Spectrum Orange, FITC, TRITC, SpectrumAqua, SpectrumGold, aj





FISH : Přítomnost, počet a poloha signálů



Mnohobarevná FISH (M FISH)

Spektrální karyotypování (SKY)

vícebarevné FISH techniky – detekce více značených sond na jednom preparátu

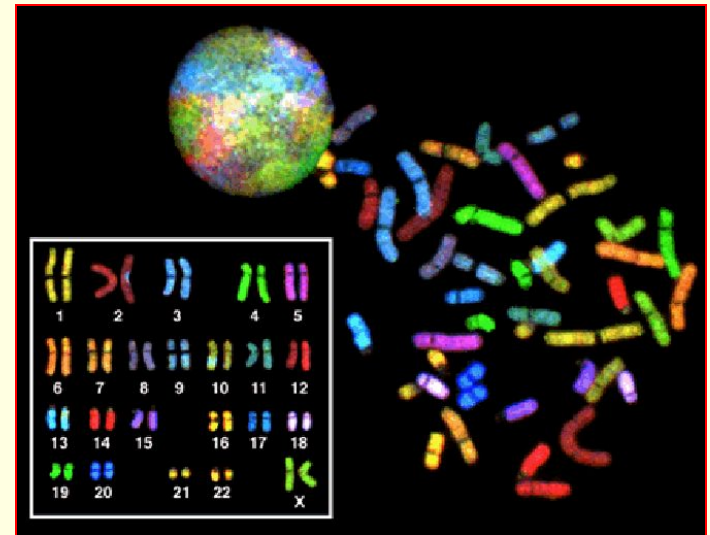
Speicher a kol., 1996 (M-FISH), Schröck a kol., 1996 (SKY)

Umožňuje odhalení balancovaných a nebalancovaných (i kryptických) přestaveb celého genomu v jednom kroku

Identifikace každého chromozómu pomocí jedinečné kombinace 5 fluorochromů

FITC
Rhodamin **TexasRed** **Cy5** **Cy5.5**

● referenční spektra - **pseudobarvy**, přiřazeny **každému chromozómovému páru** na základě měření vlnových délek



Nevýhody - potřeba kvalitních mitóz

- úspěšná hybridizace
- finančně nákladné

Color Image - sason1-600.raw
Zoom View
Band Image - SASON-1.tif

4 [4]

Information

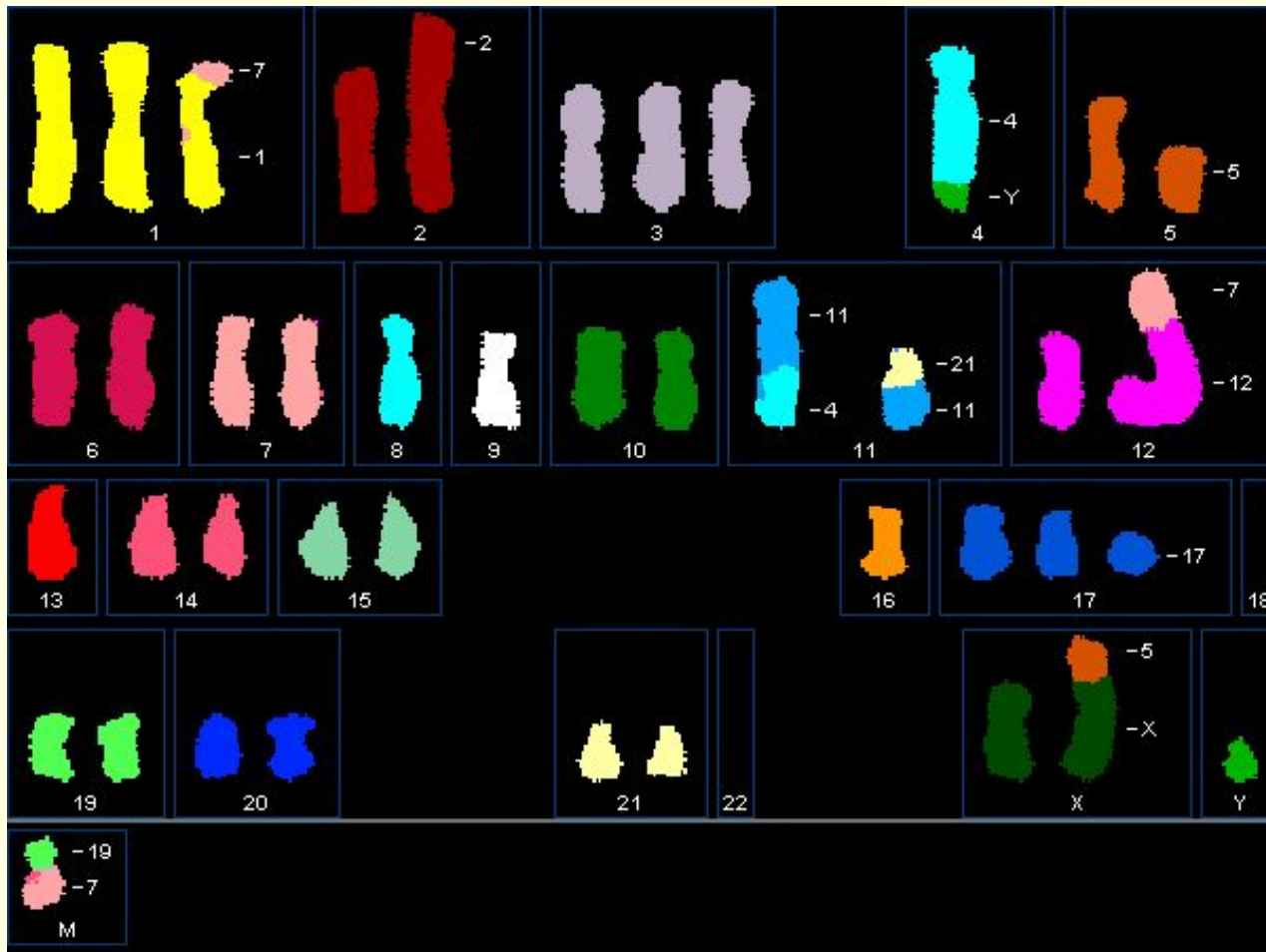
Spectrum
 556
 500 600 700
 Reference: A B C D E F
 Markers: a b c d e f g
 Under the Cursor Normalization

Karyotype Table

1 2 3 4 5
 6 7 8 9 10 11 12
 13 14 15 16 17 18
 19 20 21 22 X Y

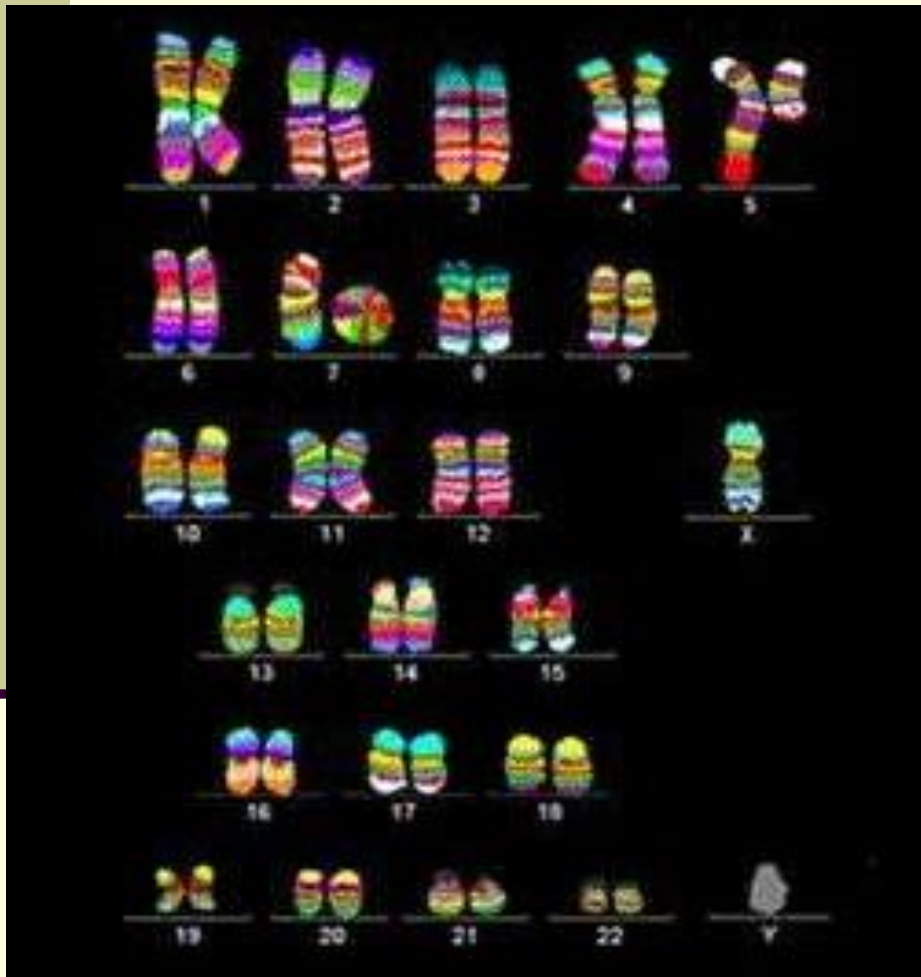
For Help, press F1
 0%
Chromosomes: 46 / Out of image 88%

M FISH/SKY - komplexní karyotyp

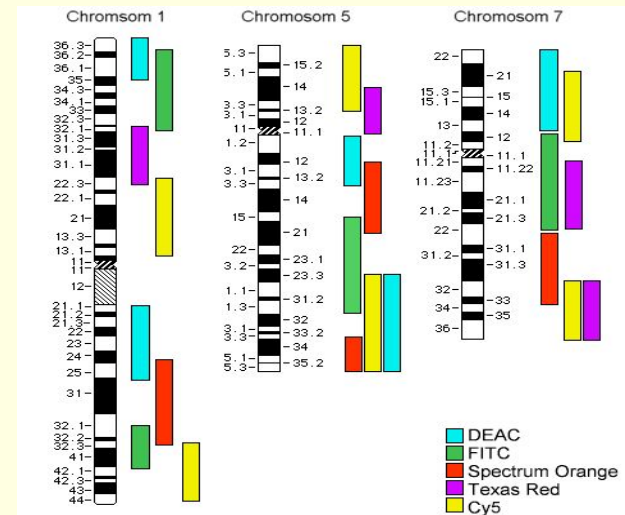


Obr. 10 (Dokumentace OLG FN Brno)

Mnohobarevné pruhování (M-banding)



- parciální malovací sondy ze specifických oblastí chromozomů
- fluorescenční signály jednotlivých sond se podél sledovaného chromozomu částečně překrývají a dochází k jejich kombinaci
- umožňuje rozlišení intrachromozomových přestaveb (inverzí)



Komparativní genomová hybridizace na čipech (array-CGH)

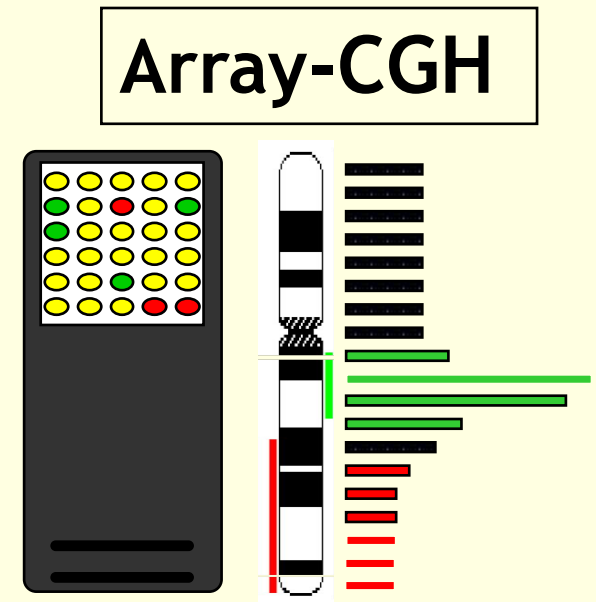
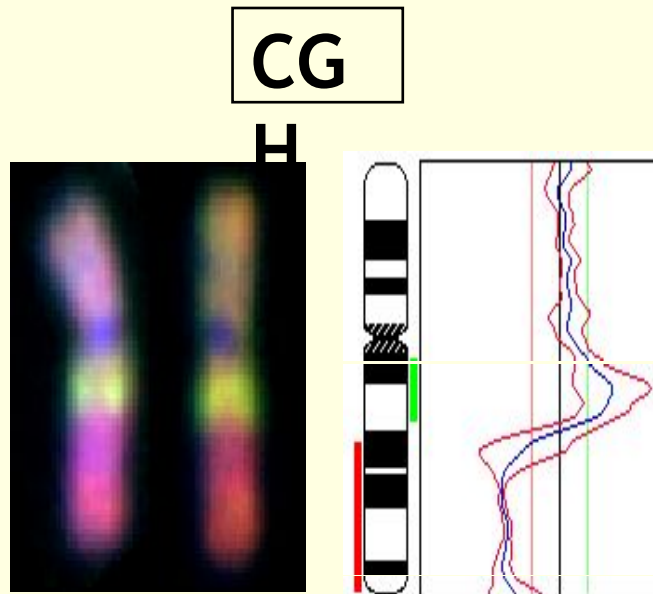
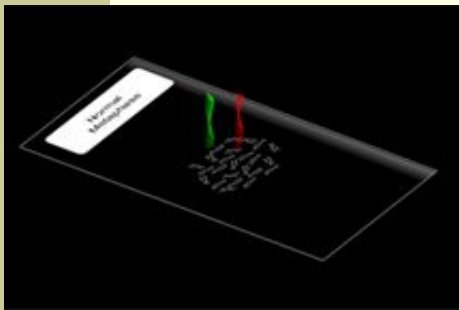
- **Efektivní metoda celogenomového screeningu nebalancovaných přestaveb chromosomů během 1 hybridizační reakce**
- Založena na společné hybridizaci různě značených vzorků DNA (testované DNA a referenční DNA) na DNA mikročip pokrytý fragmenty oligonukleotidů
 - Ztráta či zisk genetického materiálu v testované DNA je odečten ze spotů vykazující abnormální poměry intenzit signálů

Kdo je vhodným pacientem?

- Pacienti s intelektuálním postižením (neurovývojovými poruchami, vývojovými poruchami intelektu), poruchami autistického spektra, vrozenými vývojovými vadami, stigmatizací...
 - Prenatální indikace z důvodu abnormálního průběhu gravidity (abnormální prenatální screening)
 - Tkáň potracených plodů
 - Vzorky nádorové tkáně

Původ metody array-CGH

- *Solinas-Toldo a kol., 1997*
- vyhází z principu klasické (chromosomální) CGH
- nahrazení chromozomů separovanými klony (BAC, c-DNA klony, oligonukleotidy)

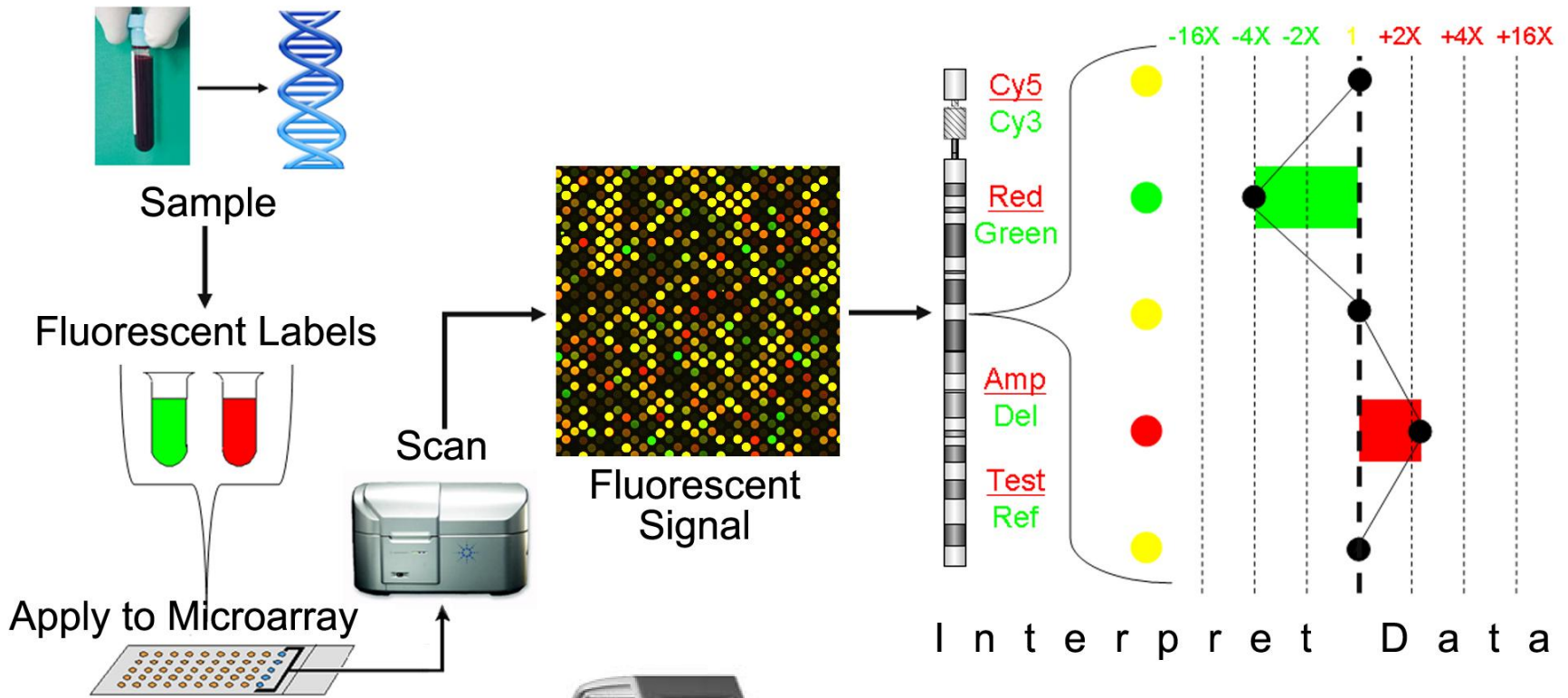


Array CGH

Materiál:

- **DNA izolovaná z biologického materiálu vyšetřovaného jedince**
 - **Prenatální** – amniocyty, buňky choriových klků, lymfocyty fetální krve, buňky z tkání potracených plodů (kůže)
 - **Postnatální** – lymfocyty periferní krve
 - **Onkologický materiál** – nádorové buňky (solidní nádory, hematologické malignity)
- **DNA referenční** (nejčastěji komerční příprava)
 - do reakce 500-1500 ng DNA dle typu platformy mikročipu
 - nutná přesná kvantifikace – do reakce shodná množství DNA reference a testované DNA
 - Kontrola kvality DNA (A260/280, A260/230, integrita DNA)

Princip array-CGH



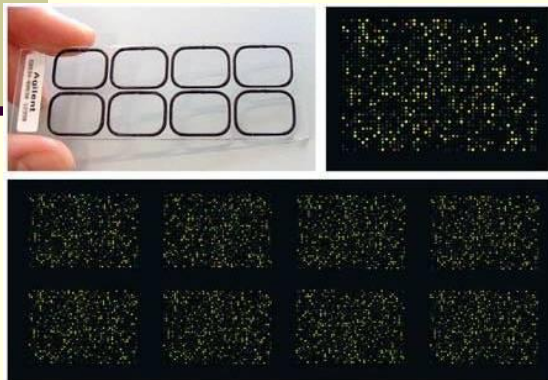
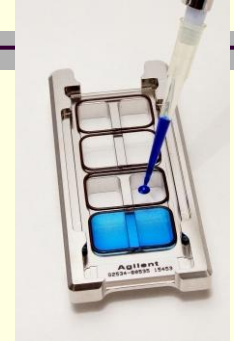
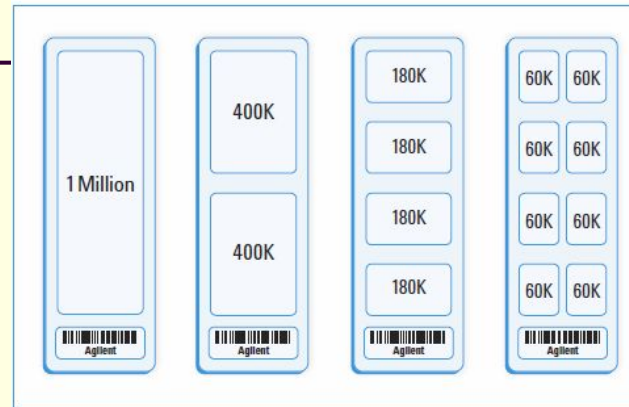
Agilent Human CGH Microarray

Oligo arrays

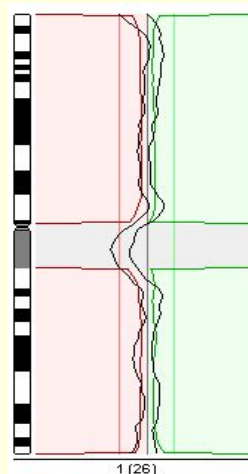
- 8x15K custom chip
- 4x44K 43 kb rozlišení
- 2x105K 21 kb rozlišení
- 1x244K 9 Kb rozlišení

Nové typy – Sure Print G3 Human

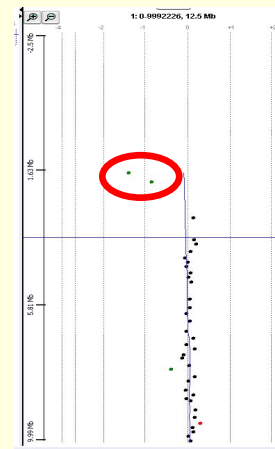
- 8x60K 41 Kb rozlišení
- 4x180K 13 Kb rozlišení
- 2x400K 5 Kb rozlišení
- 1x1M 2 Kb rozlišení



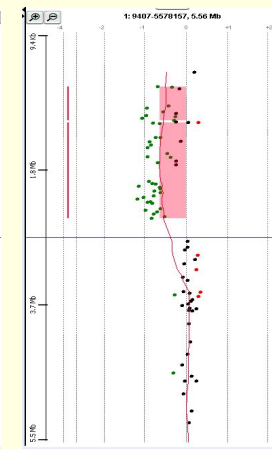
del(1)(p36), cca 3 Mb



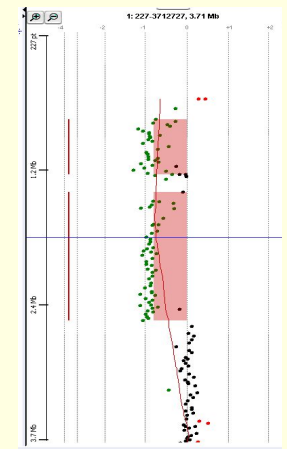
HRCGH
negativní



8x15K
negativní



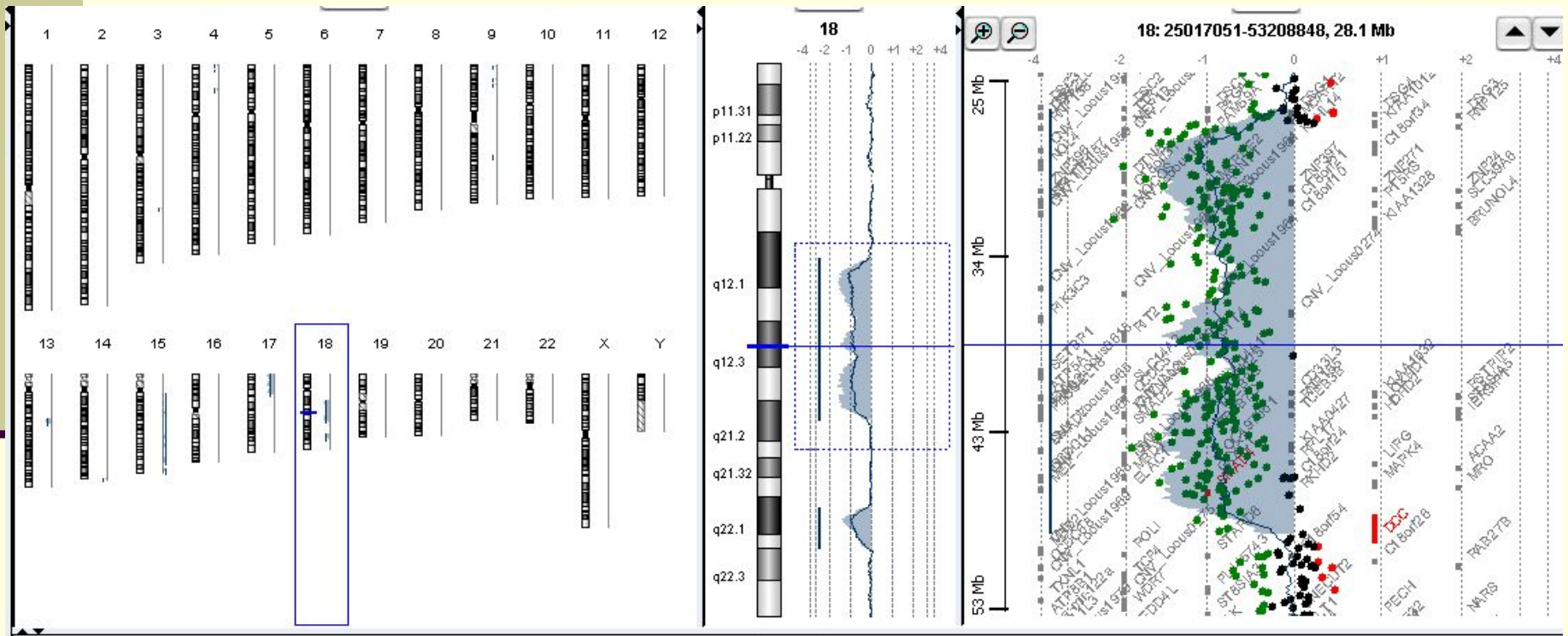
4x44K
del(1)(p36)



2x105K
del(1)(p36)

Array CGH : vyhodnocení

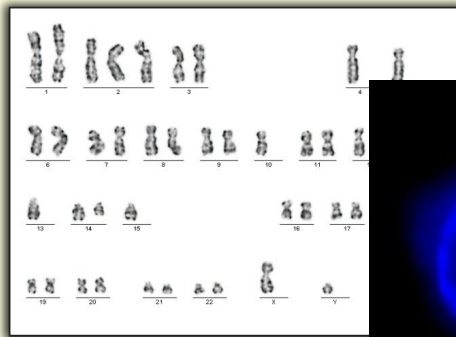
aCGH Analytics Software, Agilent Technologies



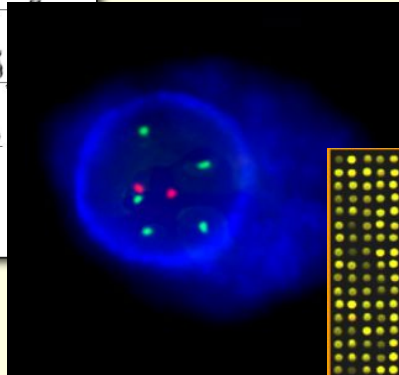
Interpretace nálezů CNVs musí probíhat vždy v kontextu s:

1. Fenotyp jedince
2. Vyšetření rodičů -> stanovení původu CNVs (de novo/zděděná CNV od rodiče s normálním/patologickým fenotypem)
3. Informace v databázích genetických variant (UCSC, DECIPHER, DGV...) a o genech v oblasti CNVs (databáze OMIM)
4. Informace v relevantní vědecké literatuře (Pubmed...)

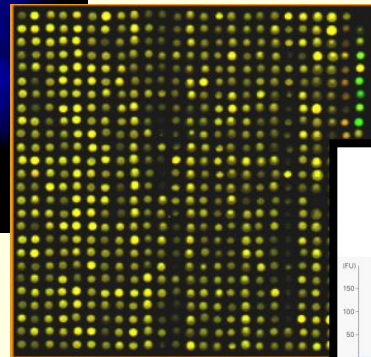
Vývoj nových cytogenetických technik pro detekci chromozomových změn



1971 G-pruhování (5 – 10 Mb)

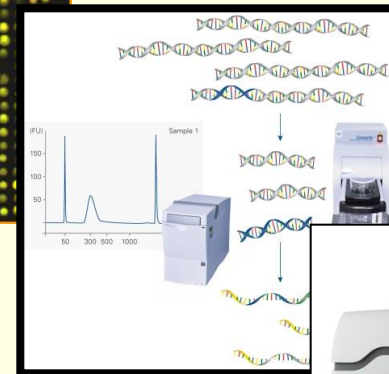


1986 Molekulární cytogenetika
FISH (100 kb)

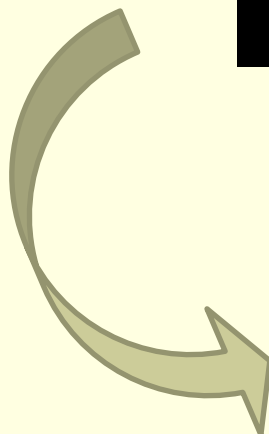


1997 array-CGH (oligo 0,06 kb)

2000 NGS



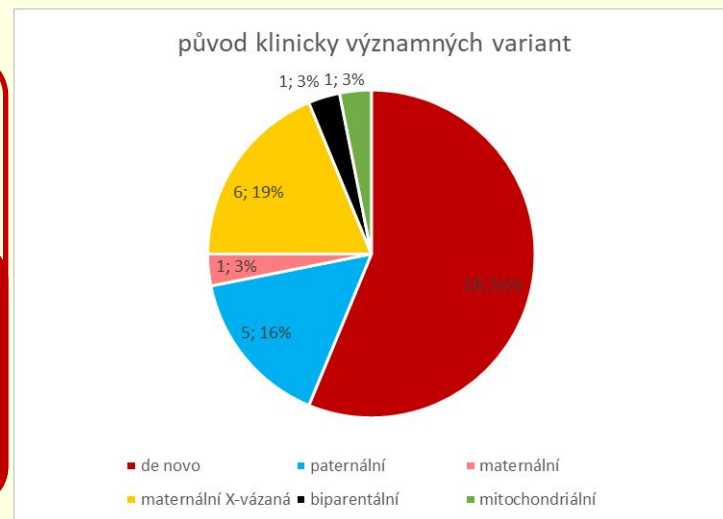
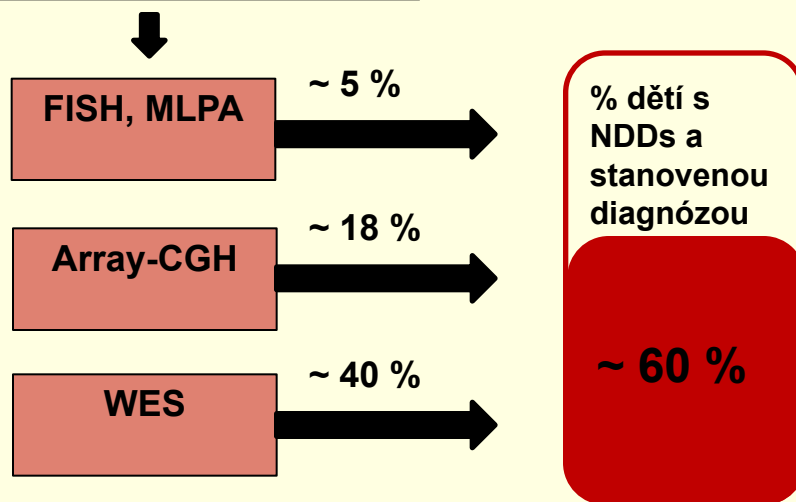
2010 Optical mapping



Od chromozomů
...k analýzám DNA

Děti s neurovývojovými onemocněními, ÚLGG, FN Brno

> 200 dětí s NDDs / rok 2007-2022 ~1500 dětí



WES

- Vyšetřeno 68 rodin (64 trií + 4 quatra) – 72 probandů
- 30 dívek, 42 chlapců
- diagnostický záchyt **44 % (32/72)** klinicky významných **sekvenčních variant (29) a CNVs (3)** (patogenní nebo pravděpodobně patogenní varianty)
- **delece exonu 2 v genu GRIN2A, exonů 3-5 v genu ZC4H2**

- Human Core Exome kit (Twist Biosciences) + Illumina NovaSeq 6000
- Bioinformatické zpracování dat dle *in-house* pipelines
- Verifikace variant - Sangerovo sekvenování, qPCR, MLPA

Existuje univerzální metoda, která by nahradila vše?

Cytogenetic Analysis

OPTICAL GENOME MAPPING

The illustration depicts two scientists in white lab coats and blue boots, wearing face masks. The scientist on the left is using a magnifying glass to examine a large blue DNA double helix. The scientist on the right is holding a test tube. Both have thought bubbles containing a thumbs-up icon. A large blue umbrella is positioned over the right side of the illustration, covering a karyotype, a genomic map, and a fluorescence image of chromosomes.

II. Využití metod molekulární cytogenetiky v klinické genetice dle typu aberací

Detekce numerických změn: **aneuploidie** (monozomie, trizomie,...)

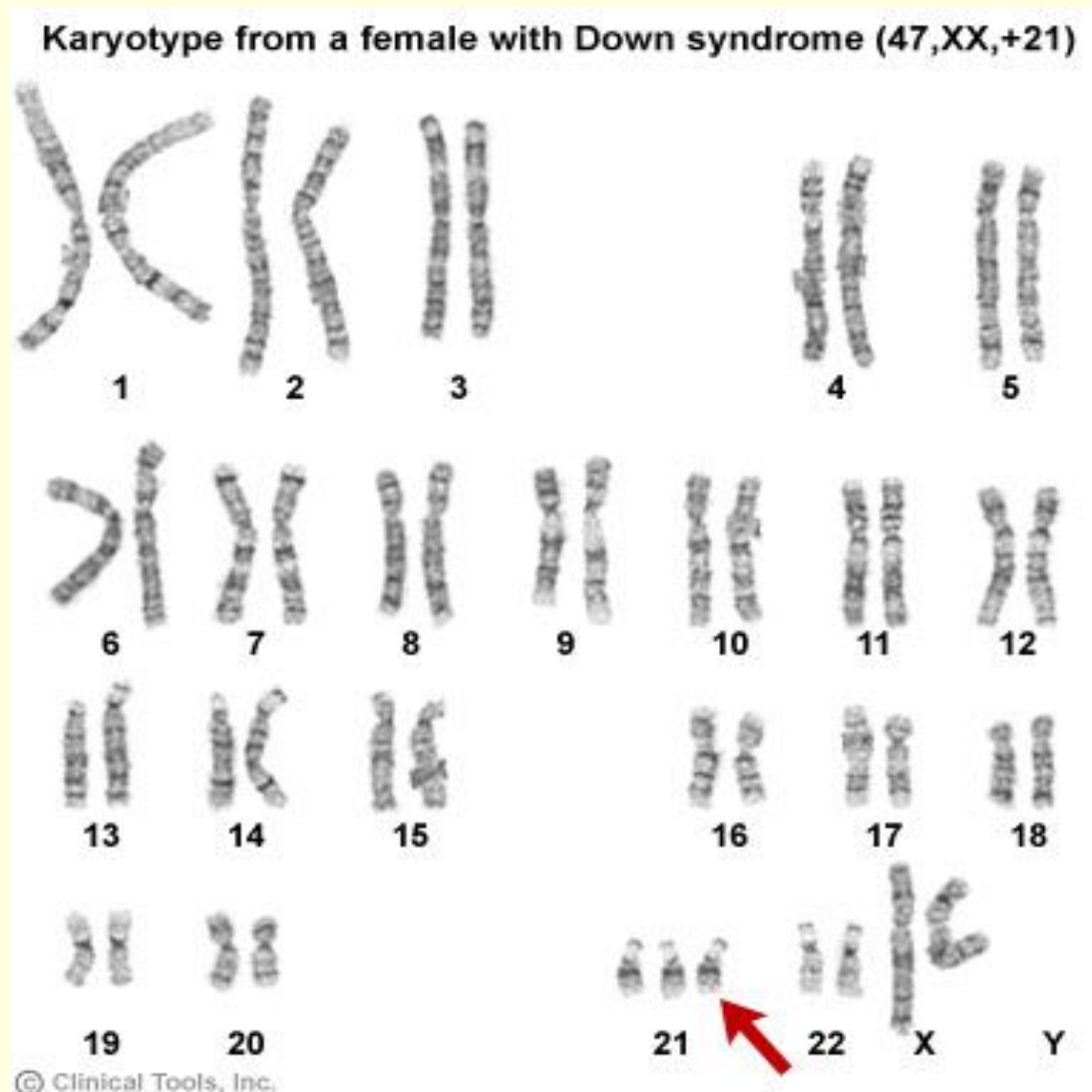
Detekce strukturních změn:

- **balancované**: inverze, reciproké translokace, robertson. translokace,...
- **nebalancované**:
 - Mikrodelece (mikrodeleční/mikroduplikační syndromy, CNV,..)
 - Subtelomerické přestavby
 - Nebalancované translokace
 - Marker chromozomy
 - Izochromozom; ring chromozomy,...

Detekce LOH, UPD

Využití metod molekulární cytogenetiky (příklady)

numerické změny: Downův syndrom 47,XX/XY,+21



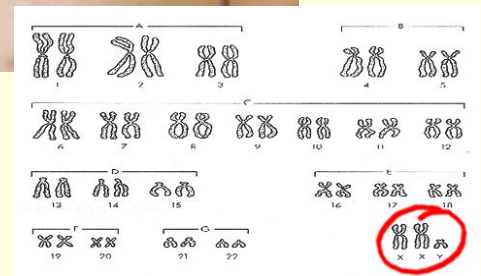
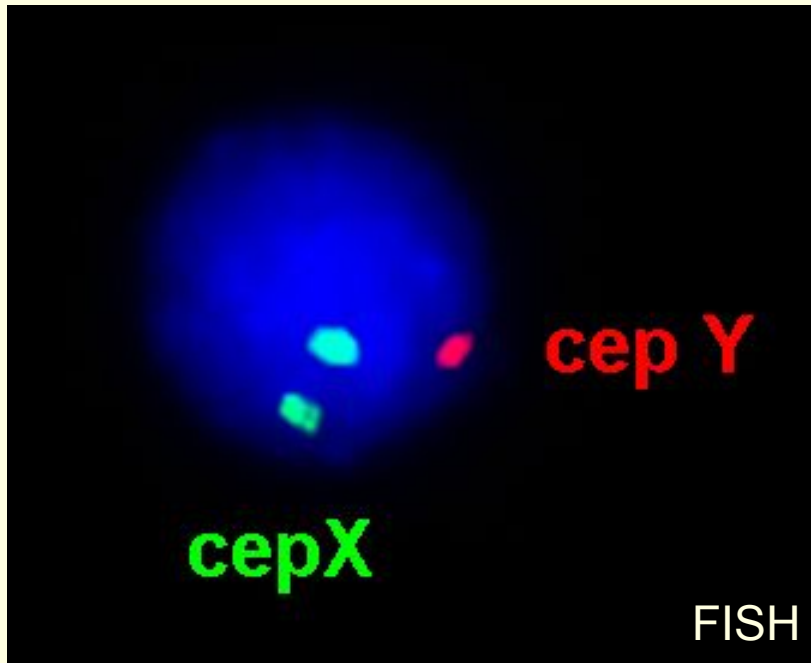


Využití metod molekulární cytogenetiky

(příklady)

numerické změny: Klinefelterův syndrom

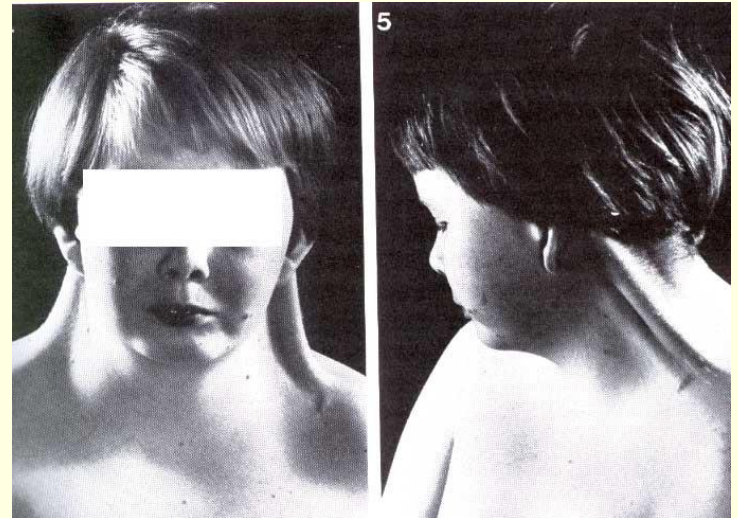
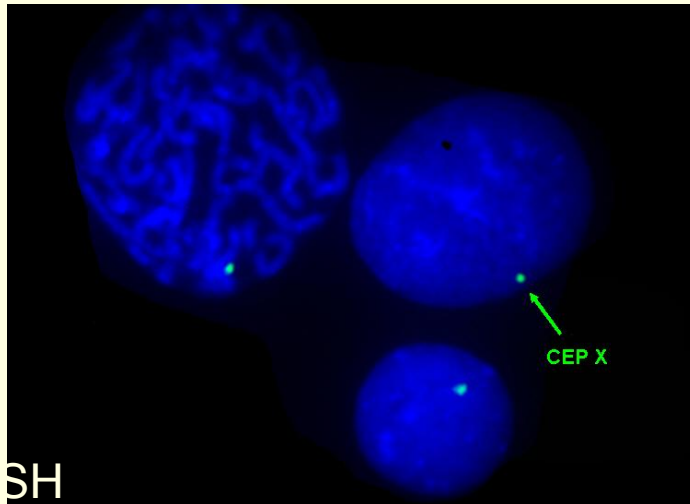
- **47,XXY**
- vysoká postava, porucha růstu vousů, ženská distribuce podkožního tuku, PMR



Využití metod molekulární cytogenetiky (příklady)

numerické změny: Turnerův syndrom

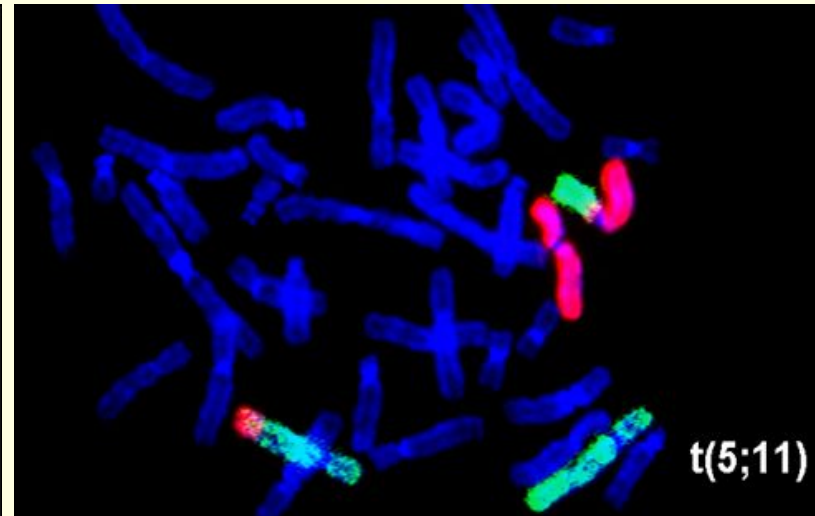
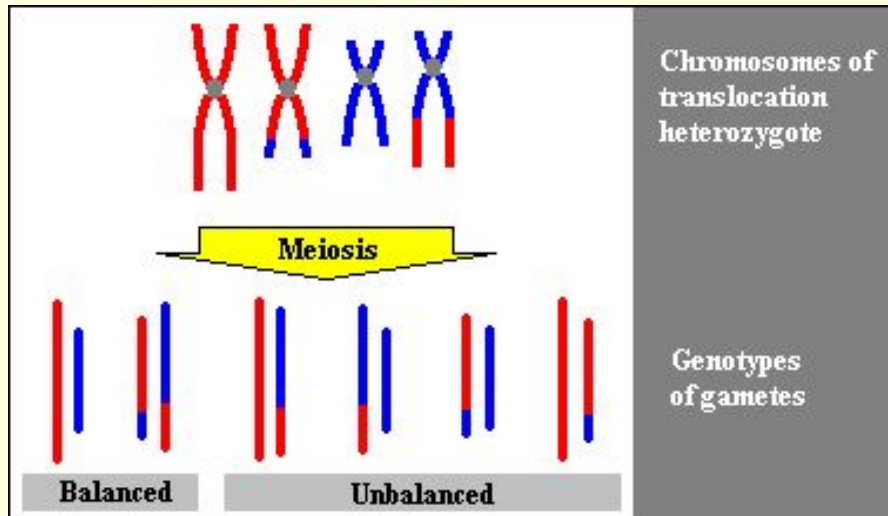
- **45,X**
- chybí jeden chromozom X
- 1/2500 dívek
- 95 % SA
- malá postava, chybí vaječníky až sterilita



Využití metod molekulární cytogenetiky

strukturní změny: balancované translokace

- výskyt v populaci s četností asi 1 : 500
- neovlivňují jednoznačně fenotyp nositele (5 x vyšší výskyt v populaci mentálně retardovaných pacientů)
- významná příčina sterilit u přenašečů
- v důsledku aberantní meiotické segregace vznik gamet s nebalancovanými přestavbami (duplikace, delece)
- **Metoda FISH, karyotyp**



Mikrodeleční syndromy

Jsou způsobeny mikrodelecí úseku chromozomu – většinou 2 – 4 Mb

Nejčastější rekurentní mikrodeleční syndromy:

DiGeorgeův/Velokardiofaciální syndrom


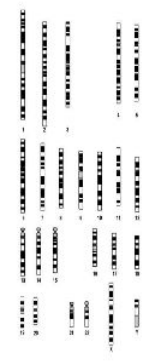
Prader-Williho a Angelmanův syndrom

Williamsův-Beurenův syndrom

Obecné příznaky:

- růstová retardace
- dysmorfismus
- stigmata
- mentální retardace
- malformace
- vrozené vady

Frequent **interstitial** microdeletion syndromes



Prader-Willi Angelman Williams velo-cardiofacial Langer-Giedeon

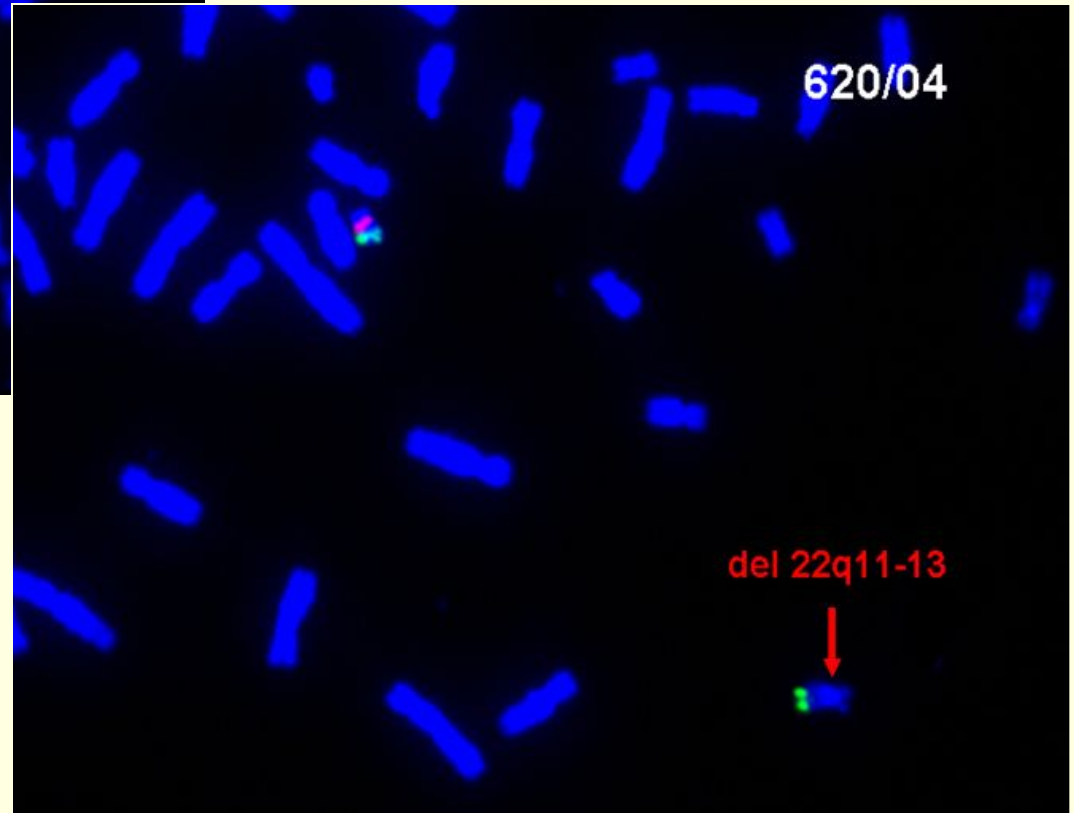
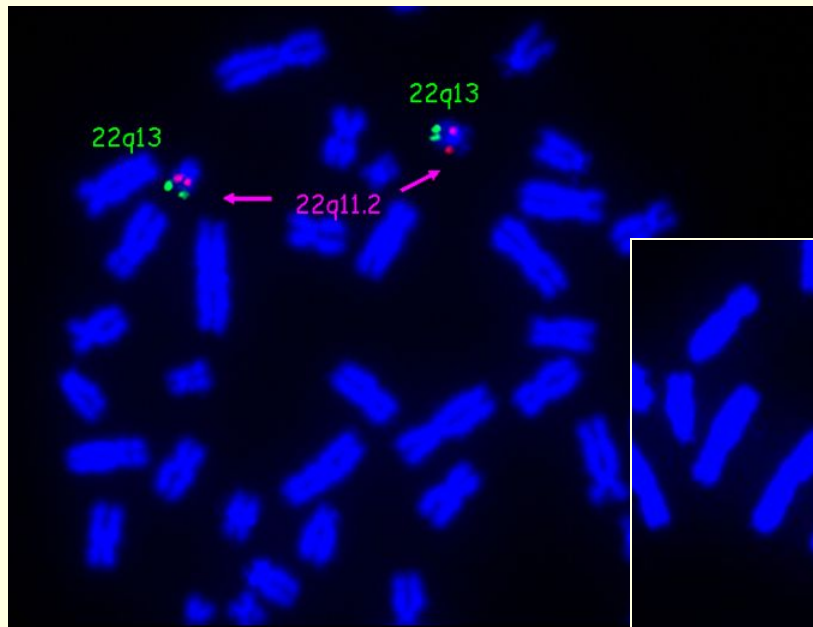
Diagnosis by FISH

| Mikrodeleční syndrom | Lokalizace | Nejčastější velikost přestavby [kb] | Četnost v populaci |
|---|------------|-------------------------------------|--------------------|
| DiGeorgeův syndrom/ Velokardiofaciální syndrom | 22q11 | 3 000 | 1:4 000 |
| Williamsův-Beurenův syndrom | 7p11.23 | 2 000 | 1:10 000 |
| Smith-Magenisův syndrom | 17p11.2 | 5 000 | 1:25 000 |
| Prader-Williho syndrom/ Angelmanův syndrom | 15q11-q13 | 4 000 | 1:25 000 |

Využití metod molekulární cytogenetiky

FISH: detekce mikrodelečních syndromů

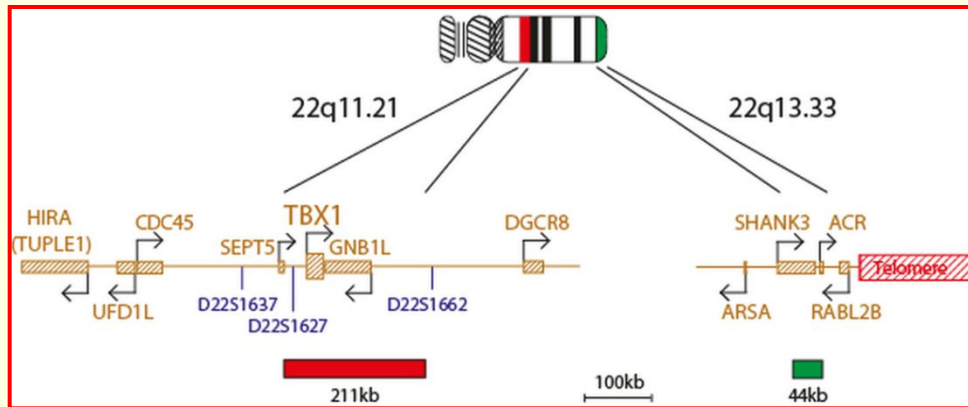
– např. del 22q11 **DiGeorge syndrom**



- **SRDEČNÍ VADY**
- **ANOMÁLIE TVÁŘE**
- **PORUCHY IMUNITY**

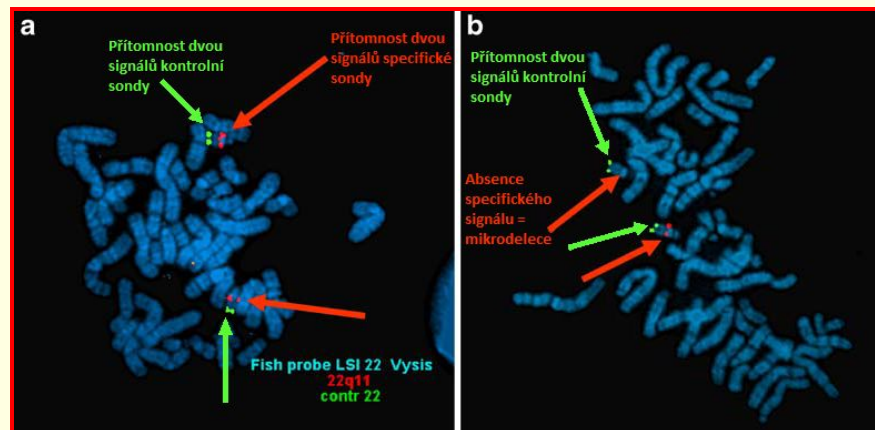
Využití metod molekulární cytogenetiky

FISH: DiGeorge syndrom del 22q11



Obrázek: Příklad komerčně dostupných sond pro detekci mikrolece 22q11 (www.cytocell.co.uk)

Dvoubarevná FISH



Obrázek: Ukázka normální mitózy a mitózy s mikrolecí 22q11 vyšetřená pomocí techniky FISH (de Ravel *et al.*, 2007; upraveno)

Využití metod molekulární cytogenetiky

MLPA: DiGeorge syndrom del 22q11.2

SALSA MLPA probemix P250-B2 DiGeorge contains **48 MLPA probes** with amplification products between 129 and 487 nt: 29 probes are located in the 22q11.2 region and can be used to distinguish the most common types of deletion. Nineteen probes are present for relevant regions of DiGeorge syndrome (DGS), DGS type II or disorders with phenotypic features of DGS on 22q13 and on chromosomes 4q, 8p, 9q, 10p and 17p.

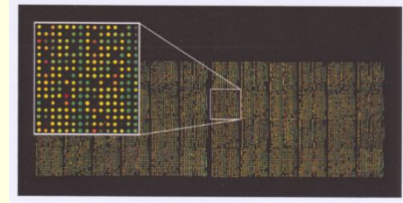
| Probe target info | | AllSamples | | | Reference... |
|-------------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| | | MLPA DG 12.. | MLPA DG 12.. | MLPA DG 17.. | MLPA DG kn... |
| FRSS (n=7) | | 100% | 100% | 100% | 100% |
| CAS (n=5) | FMRS | 70% | 45% | 60% | 85% |
| | PSLP - Relati... | OK | OK | OK | OK |
| | FSLP - Relati... | OK | OK | OK | OK |
| | RSQ - Referenc... | Bad | Bad | Bad | Bad |
| | RPO - Referenc... | OK | OK | OK | OK |
| 22q (n=29) | IL17RA-4 | 1.08 | 1.01 | 1.07 | 1 |
| | SLC25A18-1 | 0.86 | 0.86 | 0.88 | 1 |
| | BID-4 | 1.03 | 0.99 | 1.03 | 1 |
| | MICAL3-20 | 0.78 | 0.7 | 0.7 | 1 |
| | USP18-1 | 0.9 | 0.85 | 0.9 | 1 |
| | CLTCL1-3 | 0.72 | 0.38 | 0.37 | 1 |
| | HIRA-25 | 0.76 | 0.38 | 0.37 | 1 |
| | CDC45-1 | 1.06 | 0.63 | 0.5 | 1 |
| | CLDN5-1 | 0.86 | 0.45 | 0.44 | 1 |
| | GP1BB-2 | 0.82 | 0.4 | 0.41 | 1 |
| | TBX1-2 | 0.67 | 0.32 | 0.36 | 1 |
| | TBX1-7 | 0.9 | 0.49 | 0.51 | 1 |
| | TXNRD2-9 | 0.77 | 0.47 | 0.49 | 1 |
| | DGCR8-2 | 0.84 | 0.46 | 0.46 | 1 |
| | ZNF74-2 | 0.81 | 0.44 | 0.45 | 1 |
| | KLHL22-2 | 1.01 | 0.51 | 0.53 | 1 |
| | MED15-10 | 1.01 | 0.51 | 0.46 | 1 |
| | SNAP29-5 | 1.01 | 0.52 | 0.51 | 1 |
| | LZTR1-16 | 0.94 | 0.47 | 0.49 | 1 |
| | HIC2-2 | 0.96 | 1.01 | 0.89 | 1 |
| | PPIL2-20 | 0.91 | 0.97 | 0.93 | 1 |
| | TOP3B-7 | 0.10 | 0.99 | 1.06 | 1 |
| | RTDR1-6 | 0.98 | 0.98 | 1.02 | 1 |
| | GNAZ-3 | 0.86 | 0.83 | 0.83 | 1 |
| | RTDR1-2 | 1.03 | 1.04 | 0.97 | 1 |
| | RAB36-1 | 0.96 | 1.02 | 1.05 | 1 |
| | SMARCB1-1 | 0.85 | 0.84 | 0.94 | 1 |
| | SMARCB1-9 | 0.94 | 1.07 | 1.08 | 1 |
| | SNRPD3-2 | 0.9 | 0.86 | 0.93 | 1 |
| References... | SLC25A4-2* | 1.06 | 1.02 | 1.01 | 1 |
| | KLKB1-3* | 0.84 | 0.82 | 0.92 | 1 |
| | PPP1R3B-3* | 0.98 | 0.99 | 0.99 | 1 |
| | MSRA-4* | 1 | 0.97 | 0.96 | 1 |
| | GATA4-7* | 1.13 | 1.03 | 1.18 | 1 |
| | EHMT1-3* | 0.85 | 0.84 | 0.78 | 1 |
| | EHMT1-17* | 0.82 | 0.83 | 0.84 | 1 |
| | GATA3-3* | 0.97 | 1.01 | 1 | 1 |
| | GATA3-6* | 1.03 | 0.96 | 1.09 | 1 |
| | TCEB1P3 RE... | 1.08 | 0.98 | 1.06 | 1 |
| | CELF2-2-regio... | 1.12 | 1.05 | 1.06 | 1 |
| | CELF2-4* | 1.11 | 1.01 | 1.08 | 1 |
| | NEBL-5* | 1.09 | 1.07 | 1 | 1 |
| | RPH3AL-5* | 0.91 | 1 | 0.96 | 1 |
| | RPH3AL-2* | 0.96 | 1.07 | 0.98 | 1 |
| | GEMIN4-2* | 1.03 | 1.07 | 1.1 | 1 |
| | YWHAE-5* | 1 | 0.99 | 1.06 | 1 |
| | ARSA-1* | 0.98 | 1.08 | 0.95 | 1 |
| | SHANK3-21* | 0.91 | 0.93 | 0.98 | 1 |

Table 1. SALSA® MLPA® probemix P250-B2 DiGeorge probemix

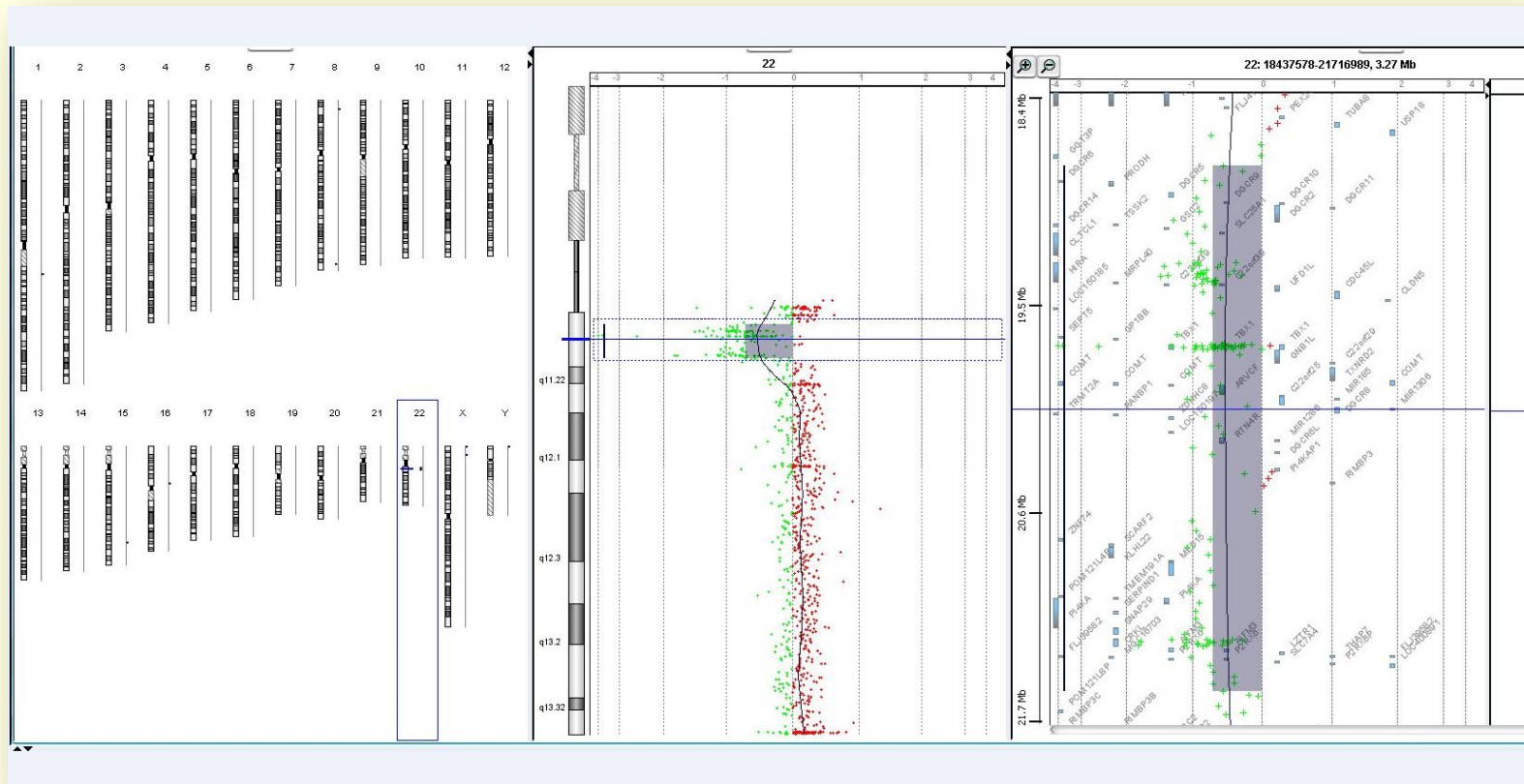
| Length (nt) | SALSA MLPA probe | Chromosomal position other | 22q11 |
|-------------|---|-------------------------------|--------------------|
| 64-70-76-82 | Q-fragments (Only visible with <100 ng sample DNA) | | |
| 88-92-96 | D-fragments (Low signal of 88 or 96 fragment indicates incomplete denaturation) | | |
| 100 | X-fragment (X chromosome specific) | | |
| 105 | Y-fragment (Y chromosome specific) | | |
| 129 | PPIL2 probe 07529-L04870 | | 22q11.2 D-E |
| 136 | Reference probe 05059-L07380 | EHMT1, 9q34.3 | |
| 142 | SLC25A18 probe 05457-L07613 | | 22q11.2 CES |
| 148 ± | DGCR8 probe 08475-L08486 | | 22q11.2 A-B |
| 154 | Reference probe 05058-L07382 | EHMT1, 9q34.3 | |
| 160 ± | HIRA probe 01214-L02328 | | 22q11.2 A-B |
| 166 | SNRPD3 probe 08481-L08492 | | 22q11.2 G-H |
| 172 ± | TBX1 probe 05408-L07614 | | 22q11.2 A-B |
| 178 | MICAL3 probe 05458-L04861 | | 22q11.2 CES |
| 184 | Reference probe 01217-L00694 | KLKB1, 4q35.2 | |
| 191 ± | CLTCL1 probe 05462-L05809 | | 22q11.2 A-B |
| 196 ± | CLDN5 probe 01218-L06270 | | 22q11.2 A-B |
| 202 ± | ZNF74 probe 05927-L07395 | | 22q11.2 B-C |
| 208 ± | GP1BB probe 05464-L10114 | | 22q11.2 A-B |
| 214 | GNAZ probe 08478-L08489 | | 22q11.2 E-F |
| 220 ± | SMARCB1 probe 05928-L07969 | | 22q11.2 F-G |
| 226 | USP18 probe 07528-L04863 | | 22q11.2 CES |
| 232 ± | Reference probe 06787-L07383 | SHANK3, 22q13 | |
| 238 ± | TXNRD2 probe 01223-L05814 | | 22q11.2 A-B |
| 245 ± | TBX1 probe 10810-L14347 | | 22q11.2 A-B |

Využití metod molekulární cytogenetiky

Array CGH: DiGeorge syndrom del 22q11



Pomocí DNA čipů zjistíme i velikost mikrodelece



Array-CGH profil DNA pacienta s mikrodeleci 22q11 o velikosti 2,72 Mb

ISCN: arr[GRCh37] 22q11.21(18818376_21540347)x1

Využití metod molekulární cytogenetiky

strukturní změny: Mikrodeleční syndromy

- skupina geneticky podmíněných chorob, jejichž příčinou jsou drobné mikrotelece DNA segmentů (2-4 Mb), které nejsou detekovatelné klasickými cytogenetickými metodami
- pacienti mají *specifické klinické příznaky* ...dříve popis dle fenotypu („*phenotype first*“ ...)
- nyní přístup „*genotype first*“ ...nejprve nález, srovnání velikosti, genů – vliv na fenotyp
- **rekurentní** - vznikají opakovaně ve stejném místě na chromozomu ...např. del 22q11
- **nerekurentní** - mohou vzniknout kdekoliv v genomu ...

Využití metod molekulární cytogenetiky

mikrodeleční syndromy : **Prader Willi a Angelman syndrom**

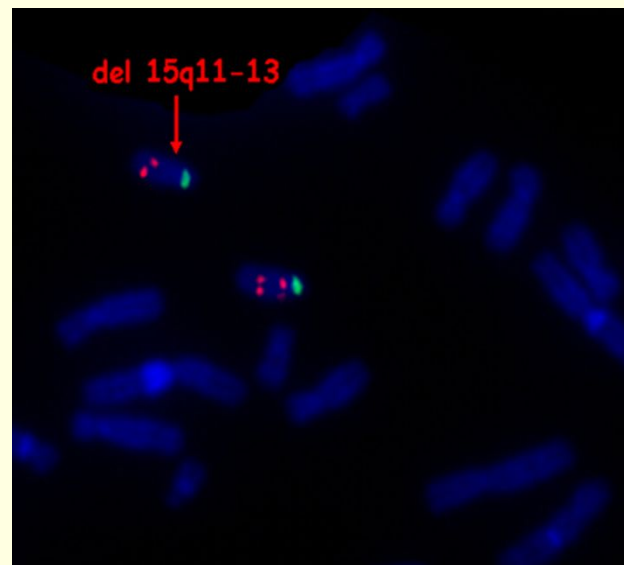
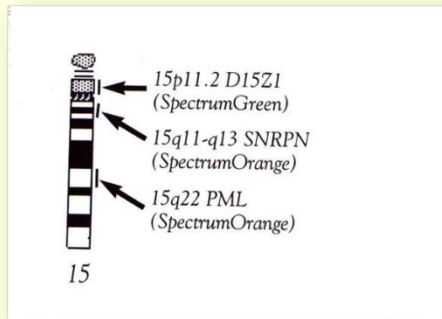
del 15q11-13

Metody pro stanovení diagnózy PWS a AS

Cytogenetické : karyotyp - translokace

Molekulárně cytogenetické : FISH - mikrodelece

15q11-13 DNA sonda



MLPA, array-CGH

Molekulárně genetické:

PCR - uniparentální disomie, Metylační analýza

