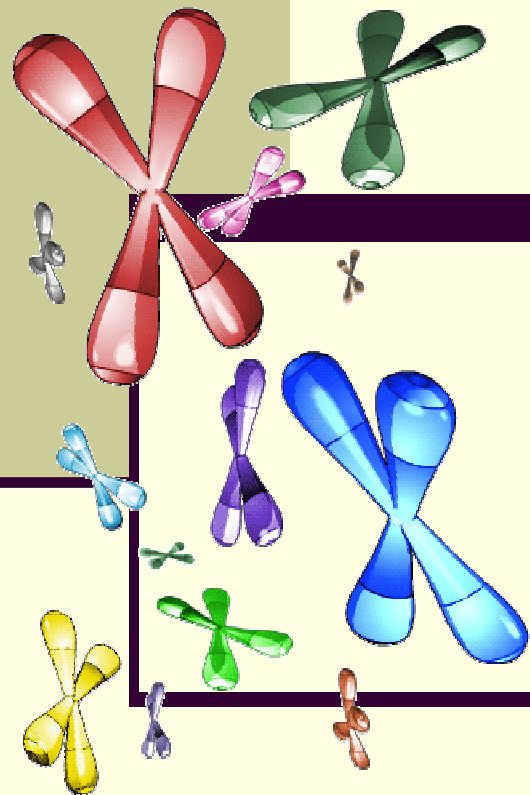


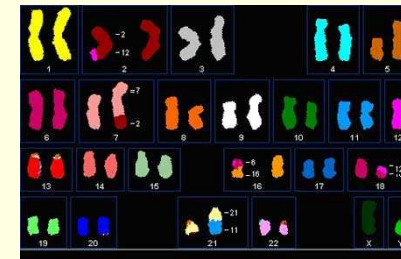
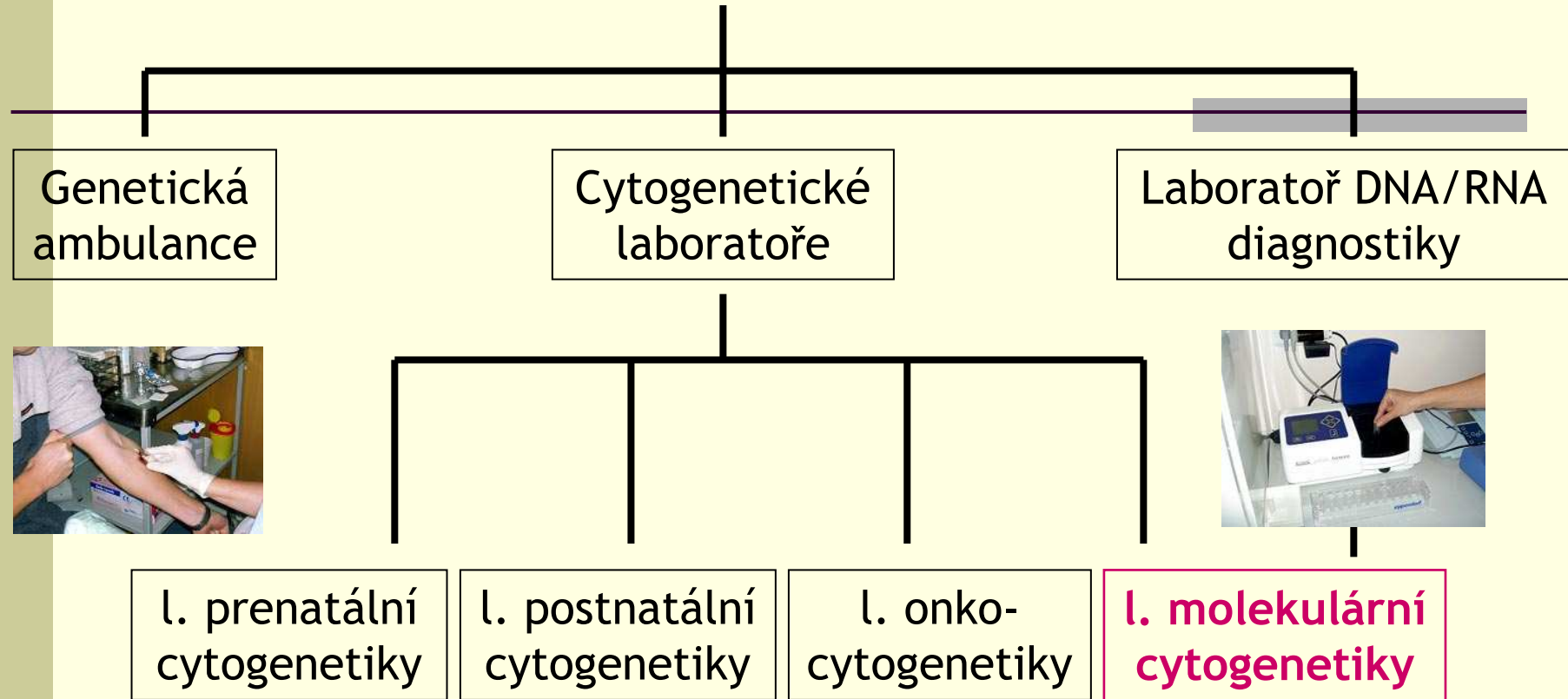
Využití molekulárně cytogenetických metod v klinické genetice a onkogenetice



Oddělení lékařské genetiky
FN Brno



Oddělení lékařské genetiky FN Brno



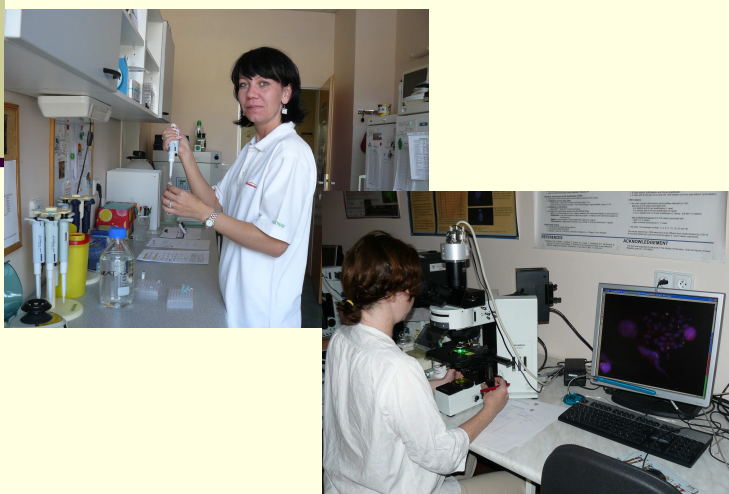
OLG FN Brno

Laboratoř molekulární cytogenetiky (1998)

Společné pracoviště Oddělení genetiky a molekulární biologie,
ÚEB PŘF MU a Oddělení lékařské genetiky FN Brno



- 1) specializované molekulárně cytogenetické vyšetření pacientů FN Brno
- 2) výzkumná činnost
- 3) vzdělávací činnost



PřF MU v Brně
DN FN Brno

Integrovaná laboratoř molekulární cytogenetiky

Zaměření | Pracovníci | Cytogenetická vyšetření | Výzkum a výuka | Služby | Technické zázemí | Kontakty

Laboratoř byla zřízena na základě Smlouvy o sdružení v roce 1998 jako společné pracoviště Přírodovědecké fakulty MU a FN Brno - pracoviště Dětská nemocnice.

Zúčastněná pracoviště:

 FN Brno, Dětská nemocnice	 Katedra genetiky a molekulární biologie Přírodovědecká fakulta MU v Brně Kotlářská 2, 611 37 Brno	 Oddělení lékařské genetiky Fakultní nemocnice Brno pracoviště Dětská nemocnice Černopolní 9, 662 63 Brno
---	--	--

Oddělení lékařské genetiky FN Brno, Černopolní 9, 662 63 Brno | tel. 545 122 551 | e-mail: olgfsh@seznam.cz

Vytvořilo Centrum biostatistiky a analýz, LF a PřF MU © Brno 2003

Samostatné webové stránky:
<http://www.cba.muni.cz/cytogenlab>

Materiál pro molekulární cytogenetické vyšetření

- periferní krev
- kostní dřeň
- vzorky různých tkání
- buňky plodové vody, choriových klků, placenty
- pupečnicková krev
- vzorky solidních nádorů

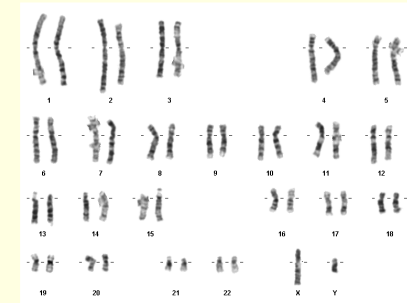


Kde všude nám molekulární cytogenetika může pomoci?

- klinická cytogenetika
- nádorová cytogenetika
- evoluční studie karyotypu
- studium architektury interfázního jádra
- mapování lidského genomu
- genetická toxikologie
- forenzní genetika
- analýza virových infekcí

Rozlišujeme tedy:

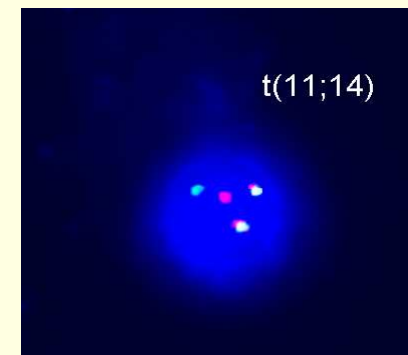
- Základní („klasická“) cytogenetická vyšetření
 - k identifikaci chromozómů a jejich změn je využito hlavně barvicích metod (Giemsa, Wright)
 - až na výjimky je nutné získat chromozómy z metafázních buněk



OLG FN Brno

- **Molekulárně cytogenetická vyšetření**

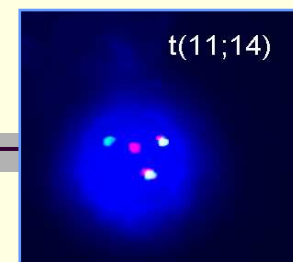
- identifikují změny chromozómů molekulárně biologickými metodami
- hybridizace *in situ*, SKY/mFISH, CGH, PRINS, PCR *in situ*, MLPA, MAPH
- k vyšetření většinou stačí jádra interfázních buněk



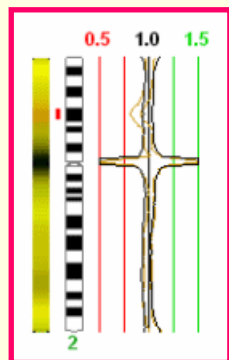
OLG FN Brno

Metody využívané na OLG FN Brno

FISH (fluorescenční in situ hybridizace) r. 1996
detekce balancovaných i nebalancovaných změn



OLG FN Brno



r. 2000

CGH/HR-CGH (komparativní genomová hybridizace)

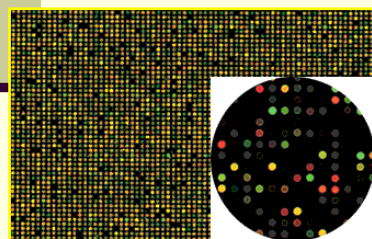
detekce nebalancovaných změn v celém genomu
CGH (5-10Mb), HR-CGH (do 3Mb)

Spektrální karyotypování (SKY) r.2002

detekce balancovaných i nebalancovaných změn v genomu
nutnost mitózy



OLG FN Brno

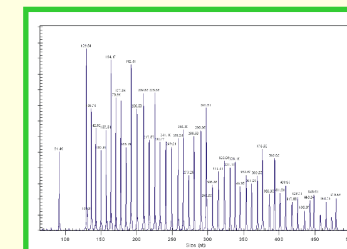


Array-CGH r.2008

Agilent's Human CGH Microarray Kit
Detekce nebalancovaných změn v celém genomu

MLPA (Multiple Ligation-dependent Probe Amplification)

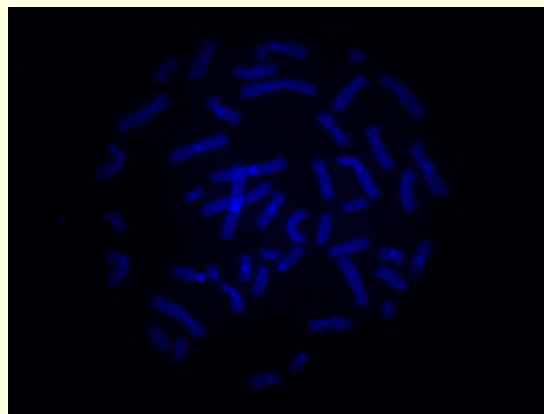
Screening subtelomerových oblastí
DiGeorge syndrom



OLG FN Brno

FISH = fluorescenční *in situ* hybridizace

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

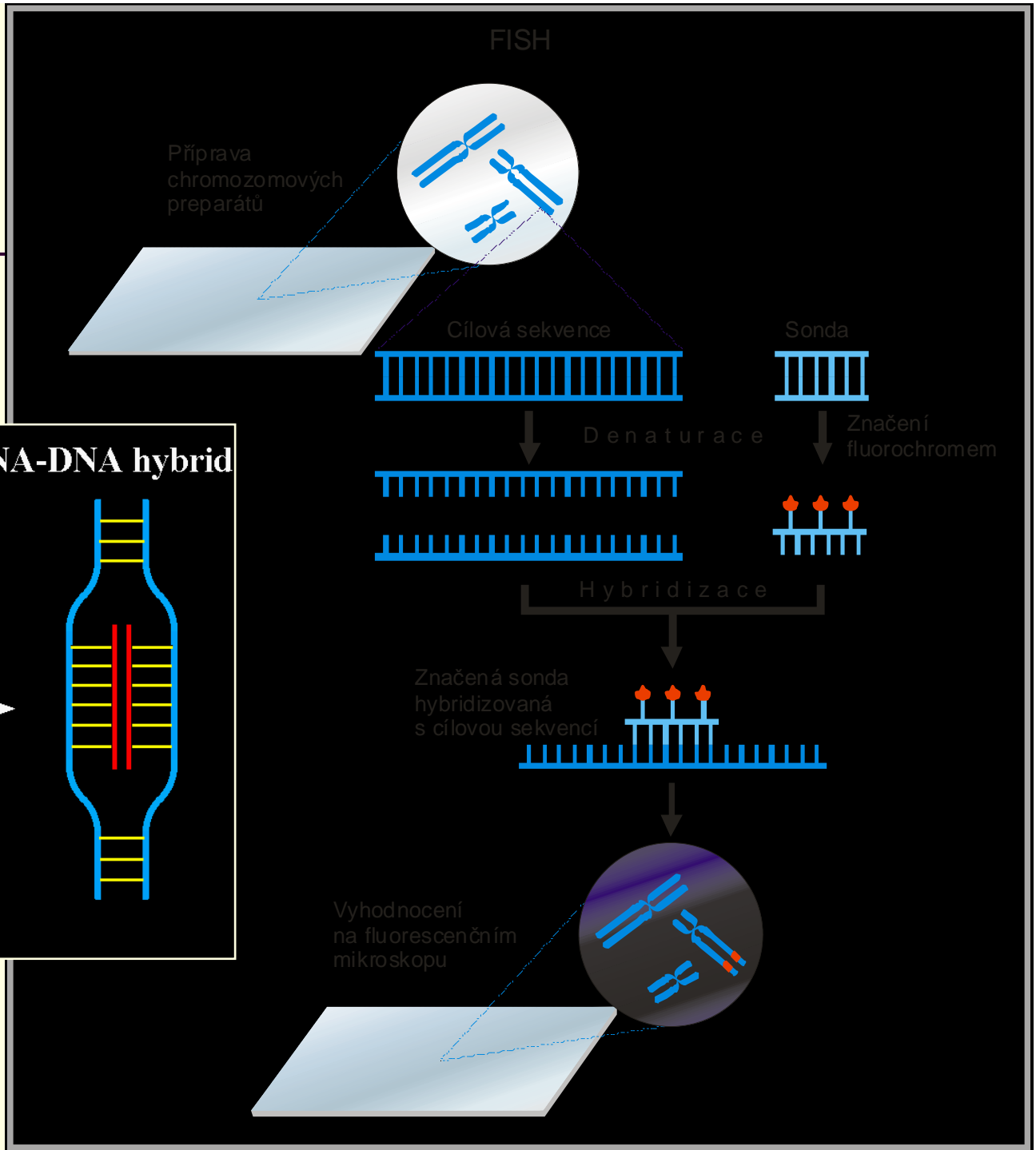
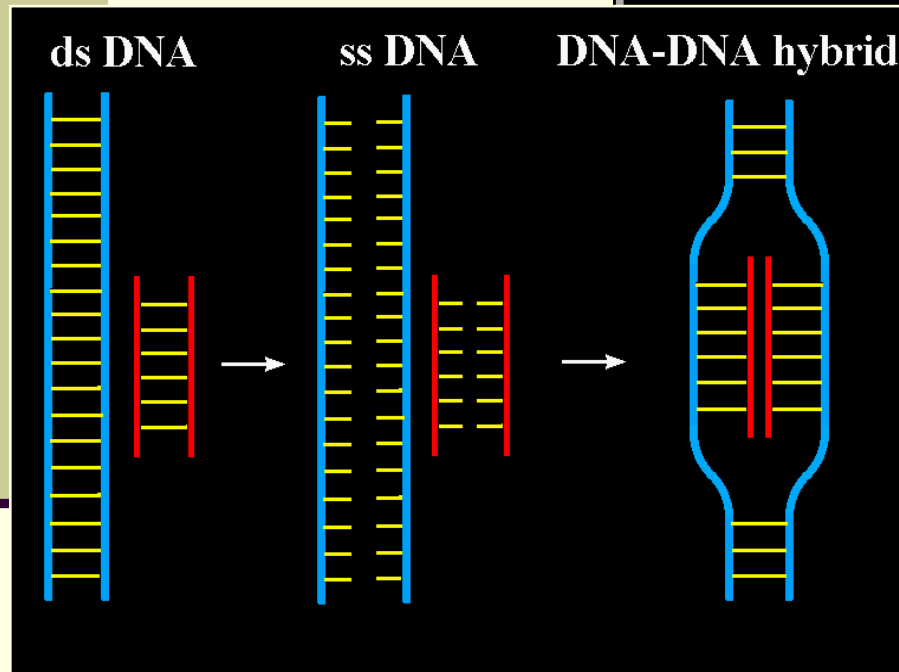


OLG FN Brno

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

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

FISH



FISH : Typy sond

- Celogenomové
- Celochromozomové
- Centromerické
- Sondy telomerické,
ramenově či pruhově specifické

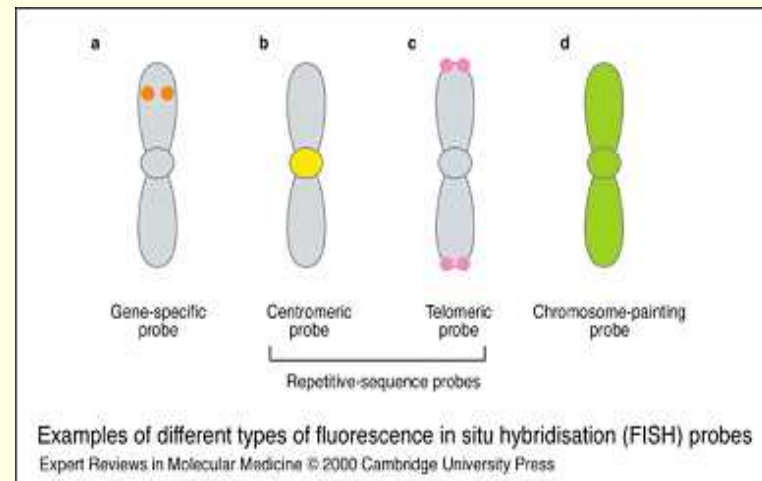
- Sondy pro jedinečné sekvence:

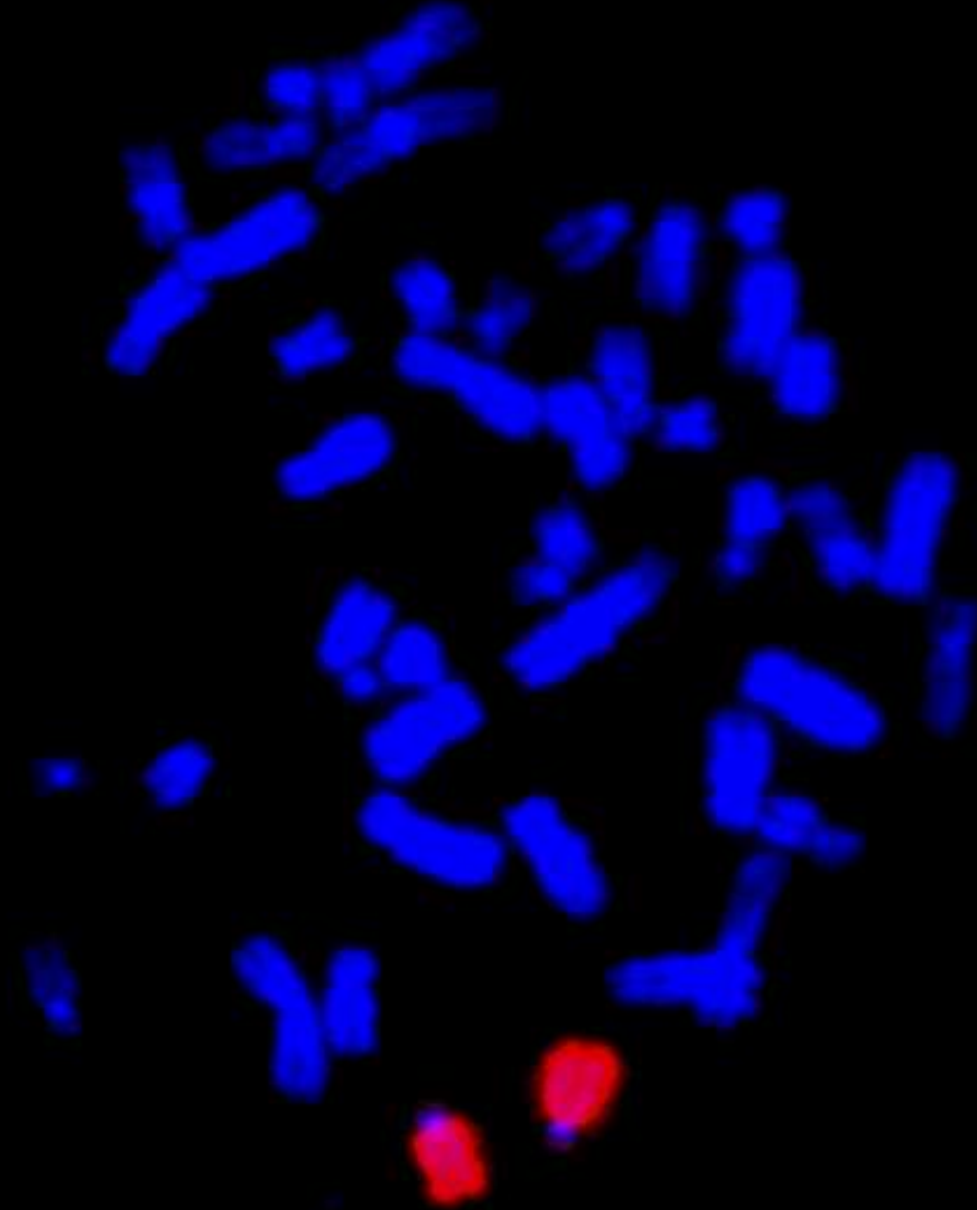
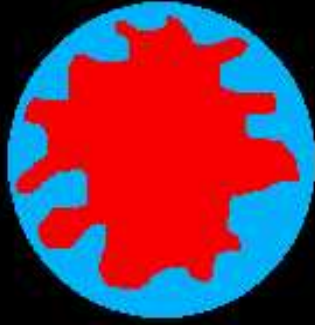
a) plazmidové (500pb-5 kb)

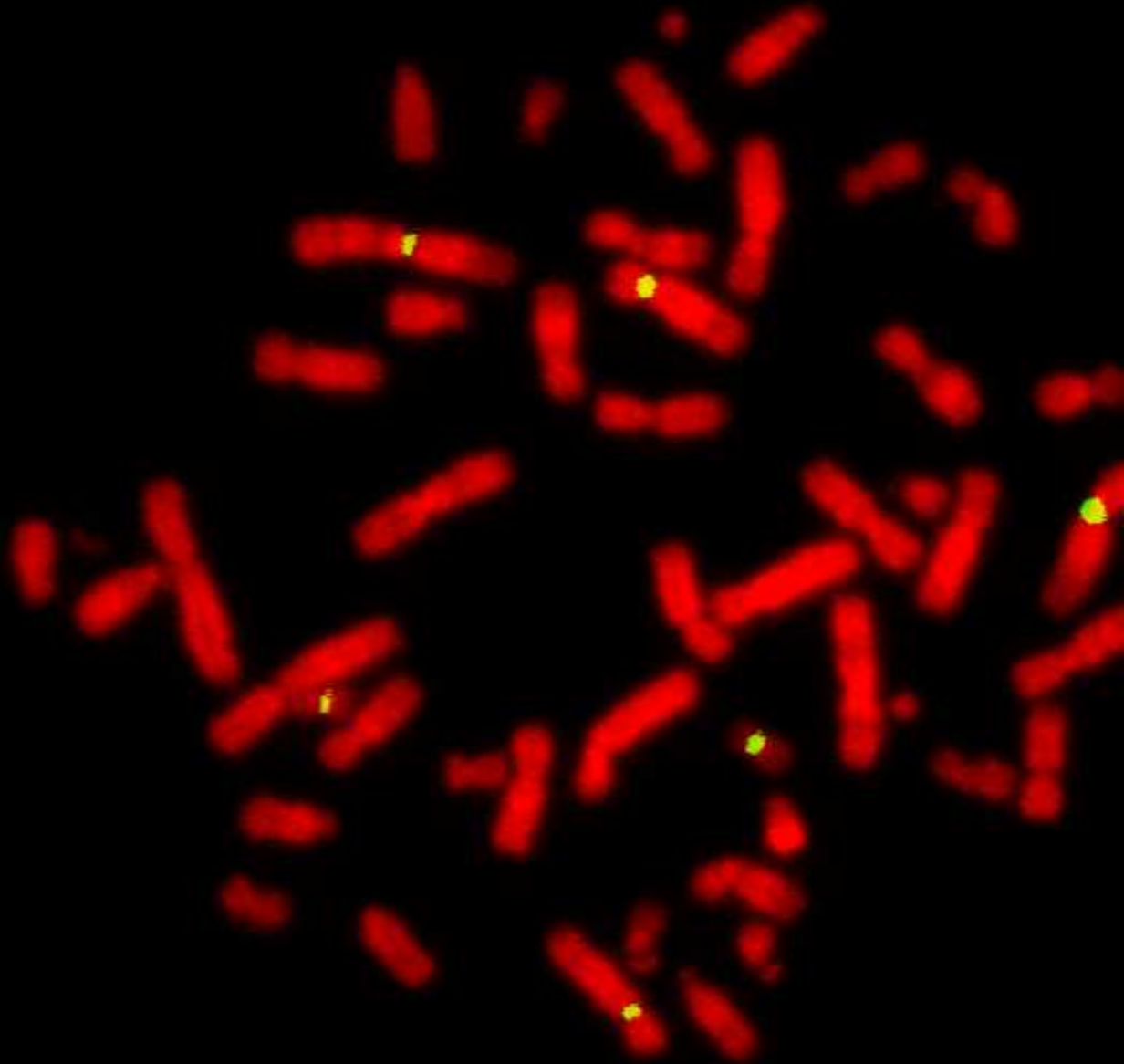
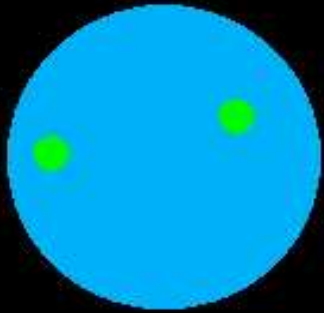
b) kosmidové (20-50 kb)

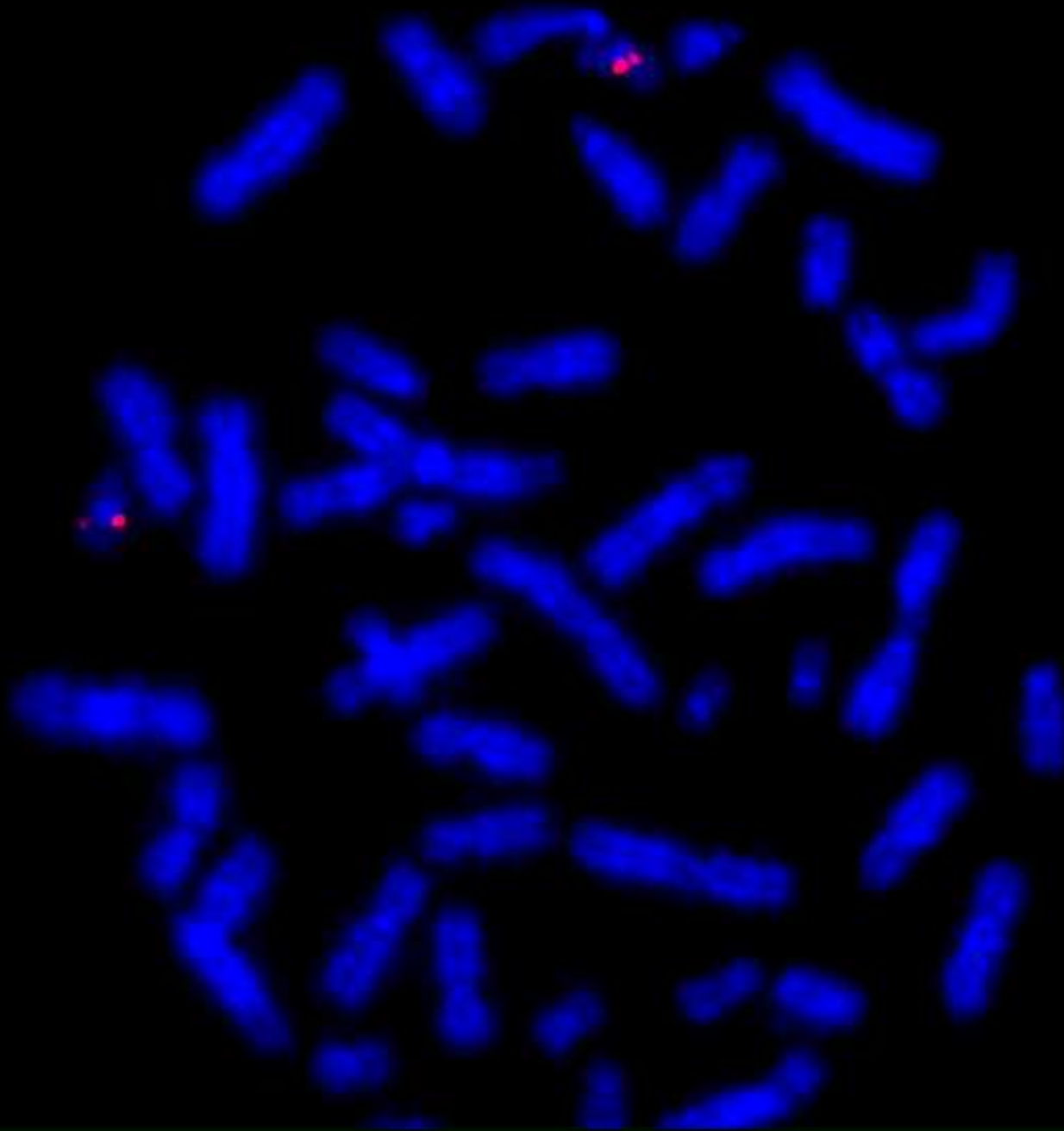
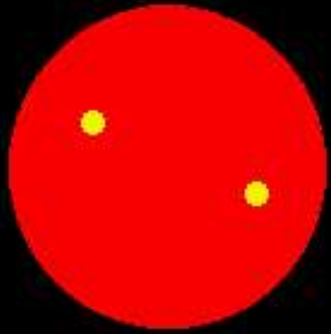
c) bakteriofág lambda (8-15 kb)

d) YAC klony (50-1000 kb)

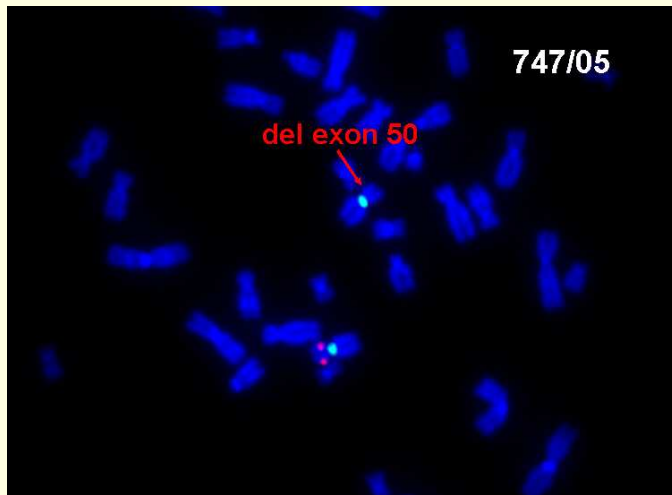




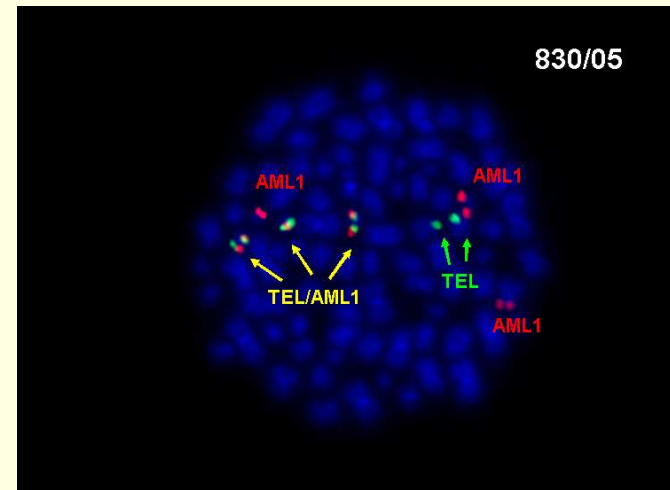




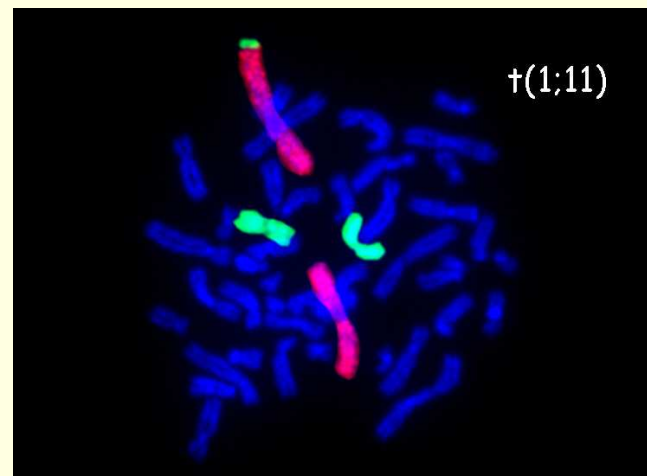
Přítomnost, počet a poloha signálů



OLG FN Brno



OLG FN Brno



OLG FN Brno

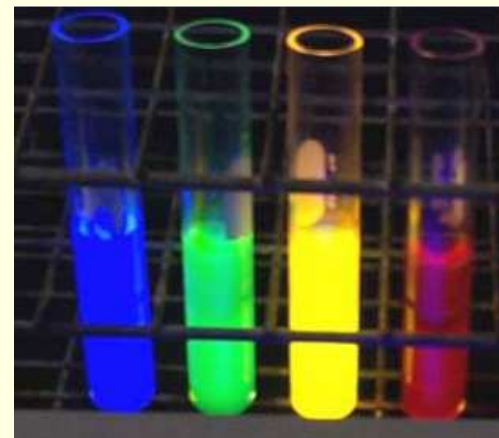
Výhody, nevýhody FISH

Výhody

- nevyžaduje přítomnost mitóz (ve většině případů)
- rychlé zhodnocení velkého počtu buněk

Nevýhody

- úspěšná hybridizace
- neposkytuje celogenomový pohled



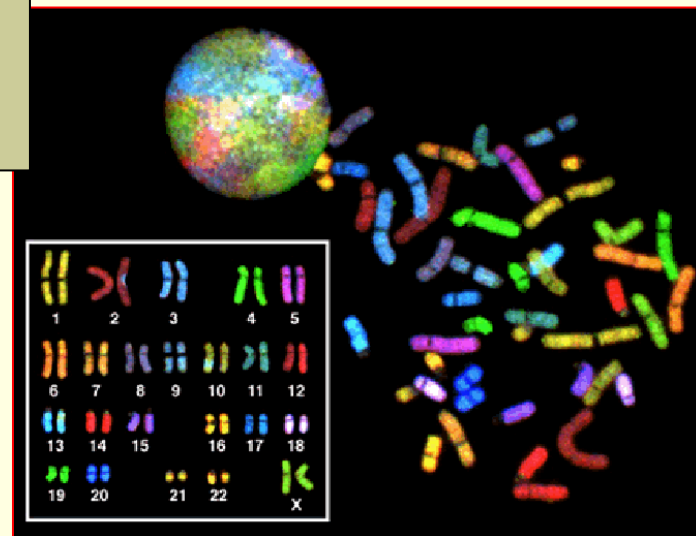
Spektrální karyotypování SKY

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

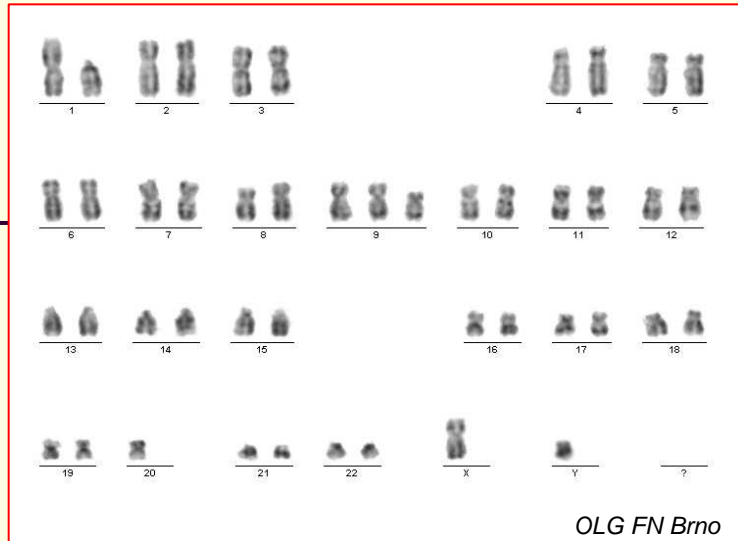
- vyvinuta v roce 1996
- identifikace každého chromozómu pomocí jedinečné kombinace 5 fluorochromů **FITC** **Rhodamin** **TexasRed** **Cy5** **Cy5.5**

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

Nevýhody - potřeba kvalitních mitóz
- úspěšná hybridizace
- finančně nákladné



Chlapec, 1 rok, neuroblastom



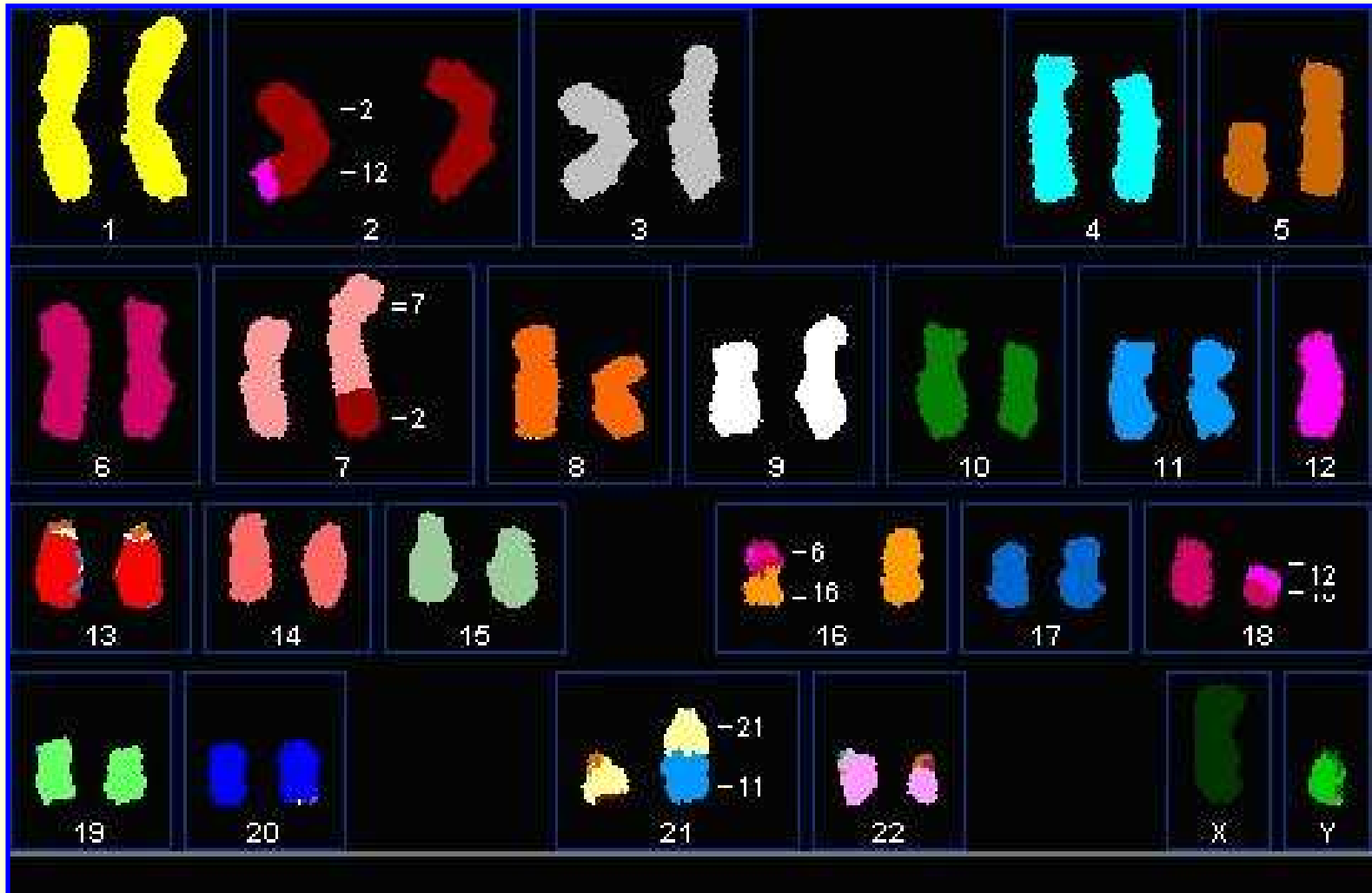
46,XY,del(1p),+del(9p),-20



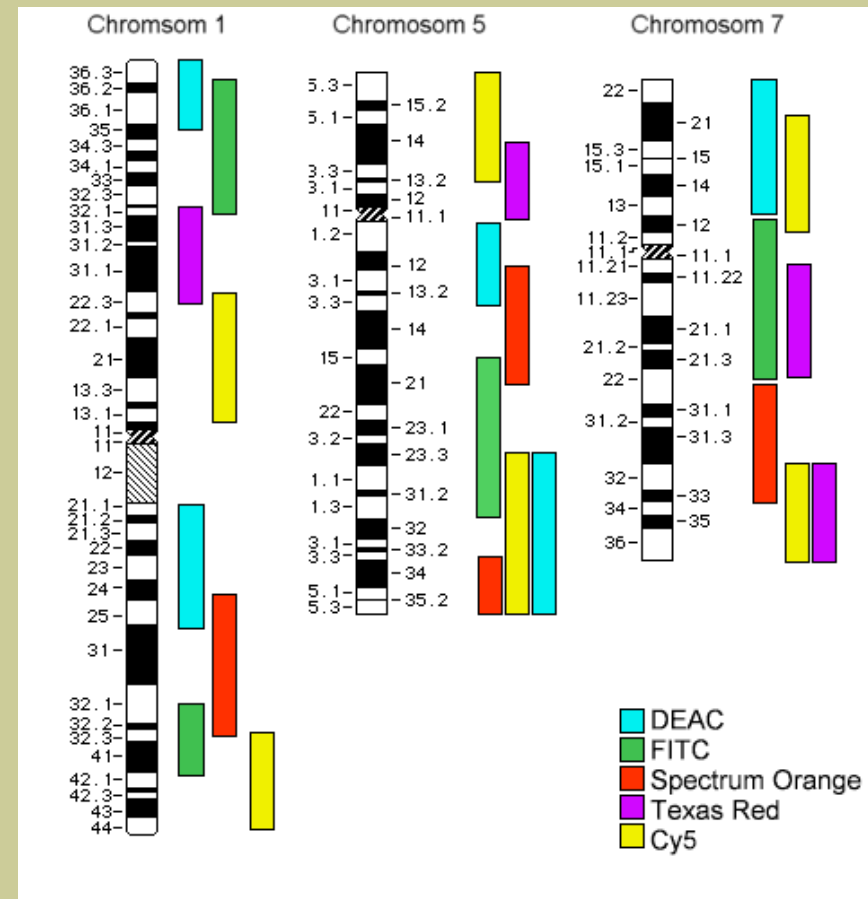
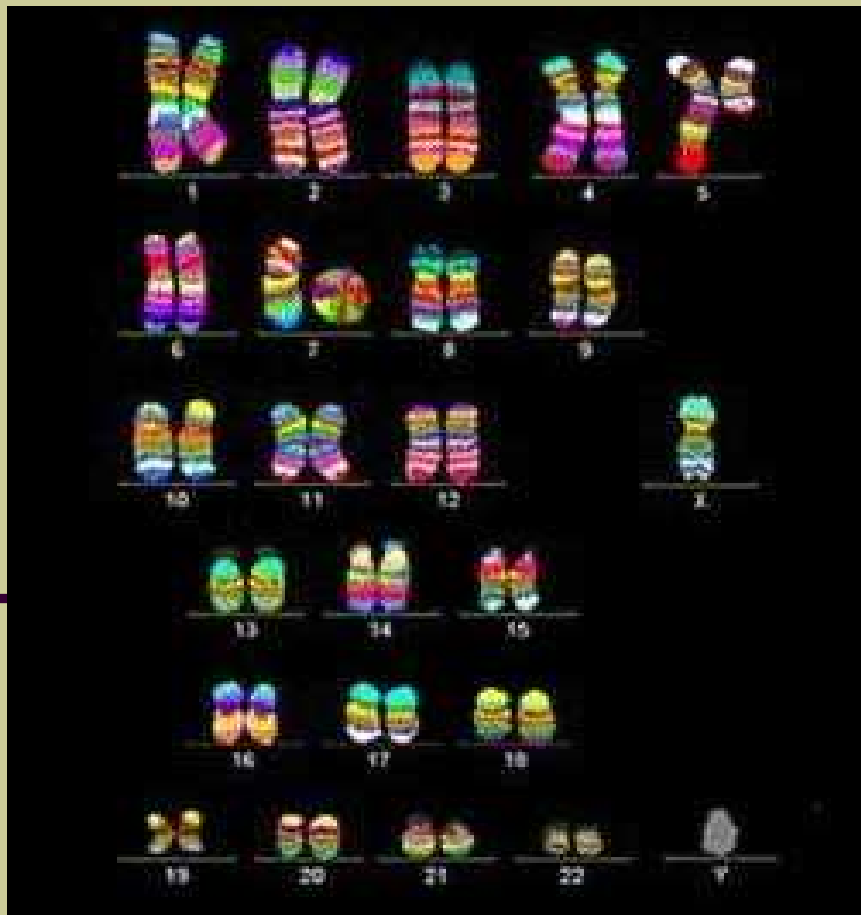
46,XY,del(1p),der(20)t(17;20)

OLG FN Brno

SKY



Mnohobarevné pruhování (M-banding)





Komparativní genomová hybridizace (CGH)

- umožňuje během jediné hybridizační reakce stanovit změny vedoucí ke ztrátám či získům sekvencí DNA v celém genomu **bez ohledu na mitotickou aktivitu buněk**

- Kallioniemi A., Kallioniemi O.-P. a kol., 1992

- potřebný materiál: **izolovaná DNA**

- rozlišovací schopnost - 10 Mb

- klonální zastoupení - 50 %



Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors

Anne Kallioniemi,* Olli-P. Kallioniemi, Damir Sudar, Denis Rutovitz, Joe W. Gray, Fred Waldman, Dan Pinkel

Comparative genomic hybridization produces a map of DNA sequence copy number as a function of chromosomal location throughout the entire genome. Differentially labeled test DNA and normal reference DNA are hybridized simultaneously to normal chromosome spreads. The hybridization is detected with two different fluorochromes. Regions of gain or loss of DNA sequences, such as deletions, duplications, or amplifications, are seen as changes in the ratio of the intensities of the two fluorochromes along the target chromosomes. Analysis of tumor cell lines and primary bladder tumors identified 16 different regions of amplification, many in loci not previously known to be amplified.

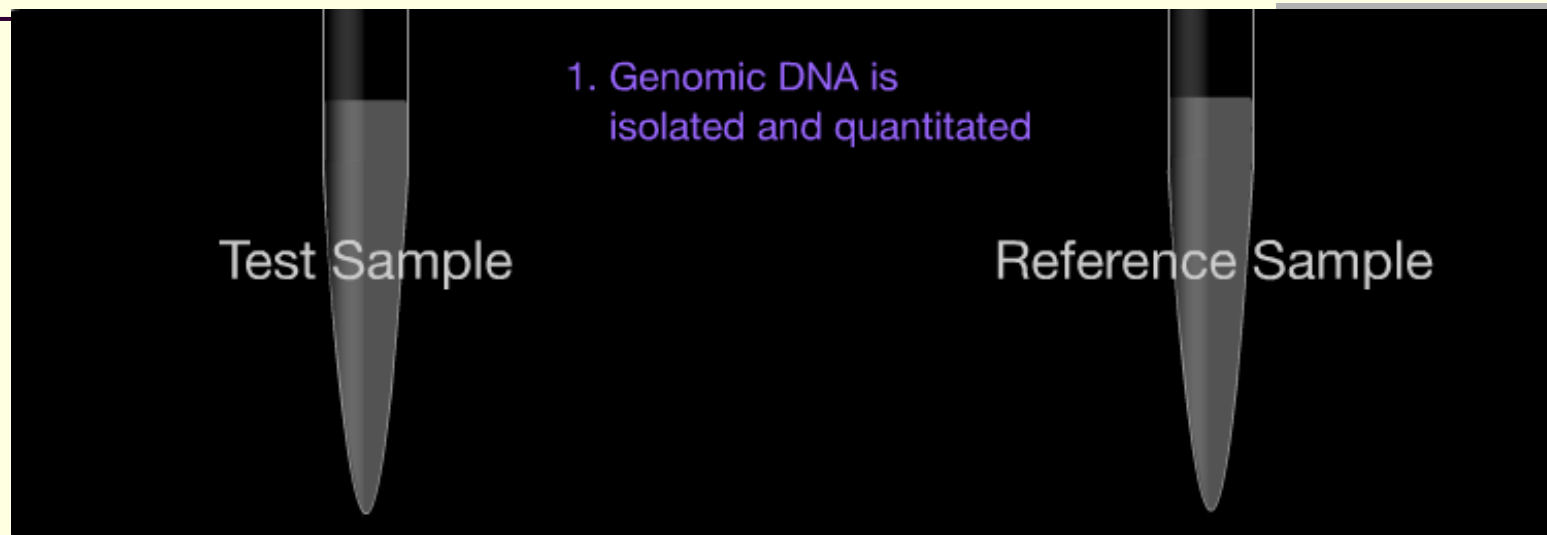
The discovery of genetic changes involved in the development of solid tumors has proven difficult. Karyotyping is impeded by the low number of high-quality metaphase spreads and the complex nature of chromosomal changes (1). Molecular genetic studies of isolated tumor DNA have been more successful and have been used to detect

common regions of allelic loss, mutation, or amplification (2, 3). However, such molecular methods are highly focused; they target one specific gene or chromosome region at a time and leave the majority of the genome unexamined.

We have developed a molecular cytogenetic method, comparative genomic hybridization (CGH), that is capable of detecting and mapping relative DNA se-

CGH

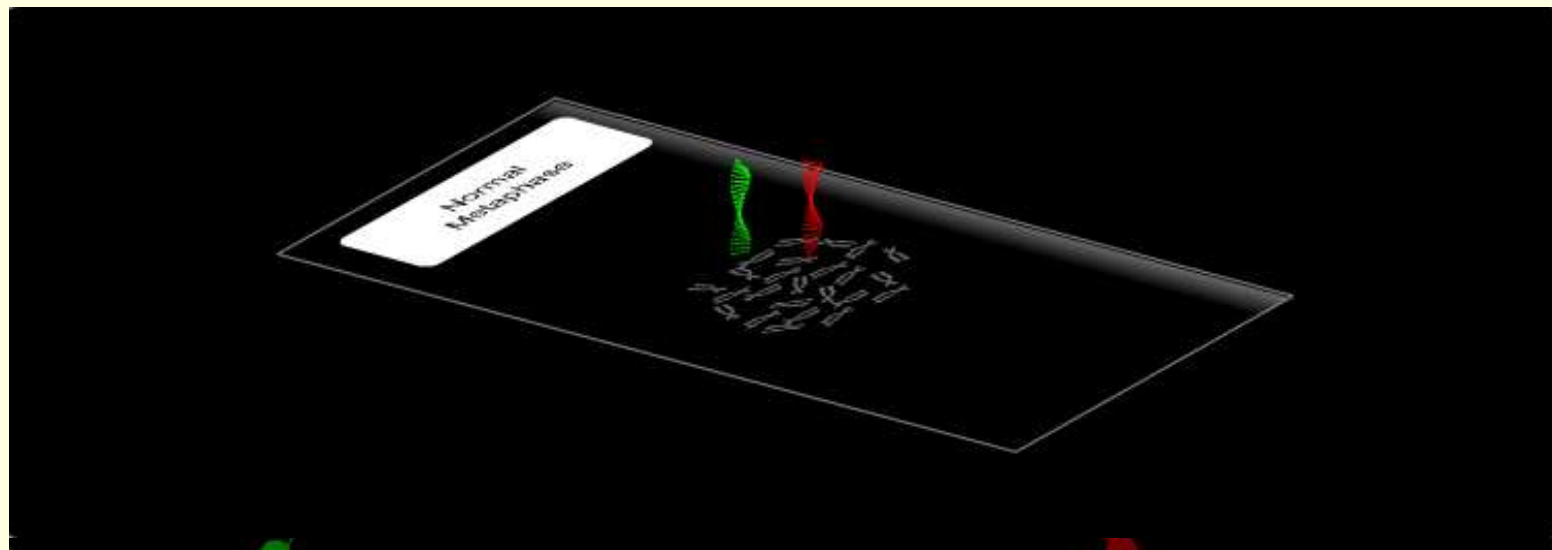
A takto to funguje...



CGH

A takto to funguje...

3. Labeled DNA is digested into smaller products that allow optimal hybridization



DNA extraction

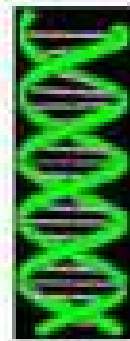
competitor



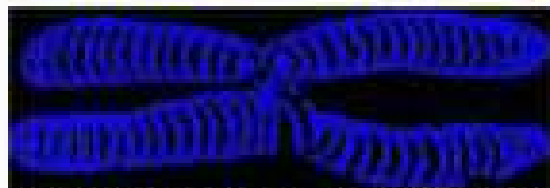
reference
(red dUTP)



test
(green dUTP)

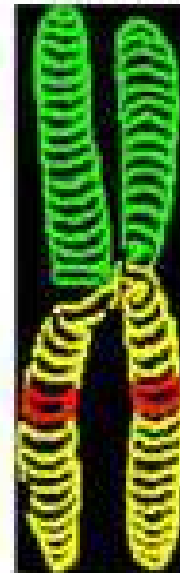


Hybridisation for
48-72 hours

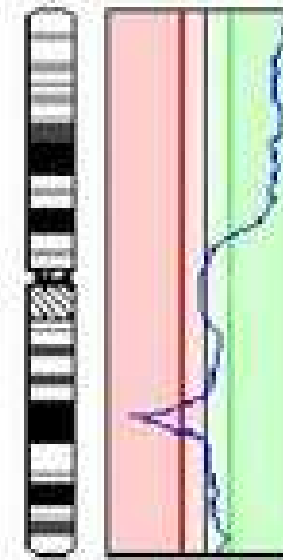


Normal metaphase chromosomes

metaphase
chromosome



Fluorescent
Image profile



calc(1p)

dim(1q31)

Image through a triple-band filter

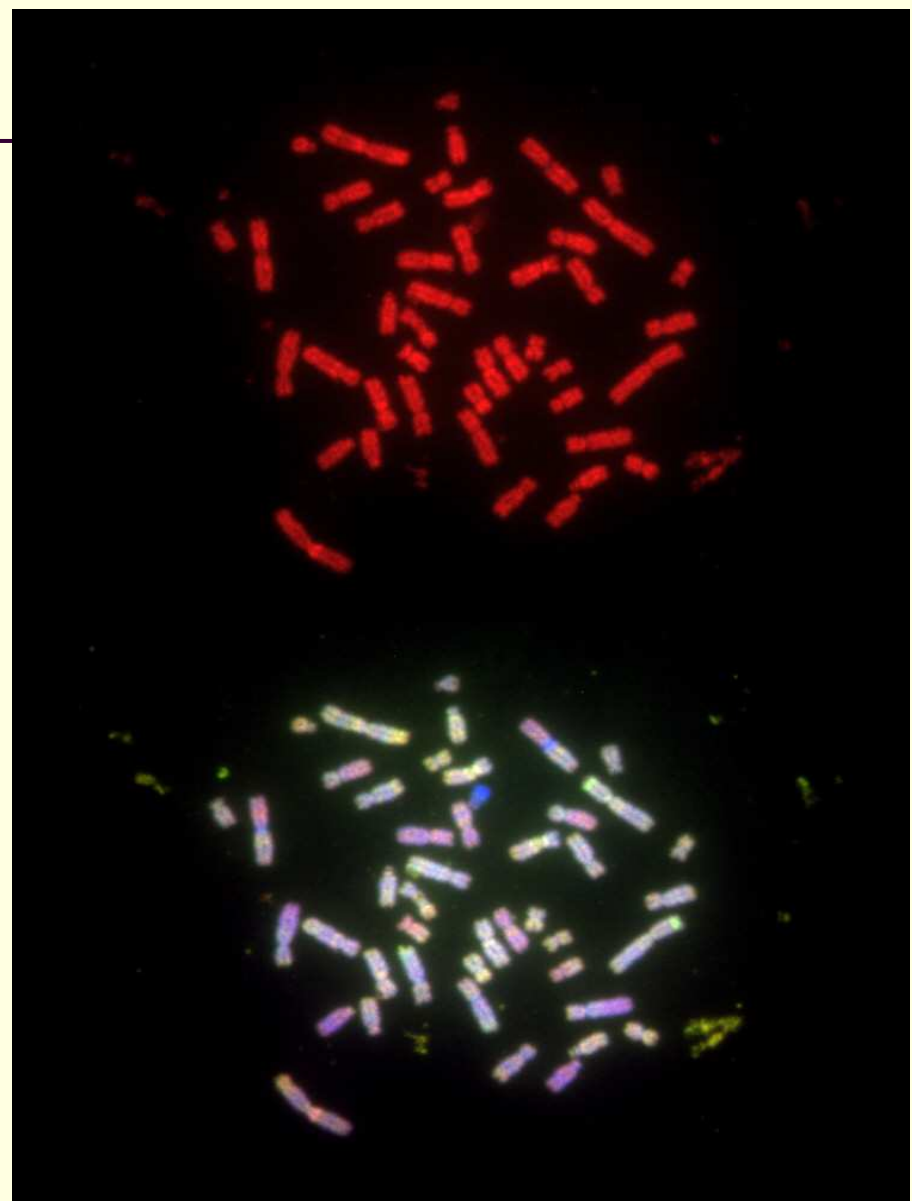
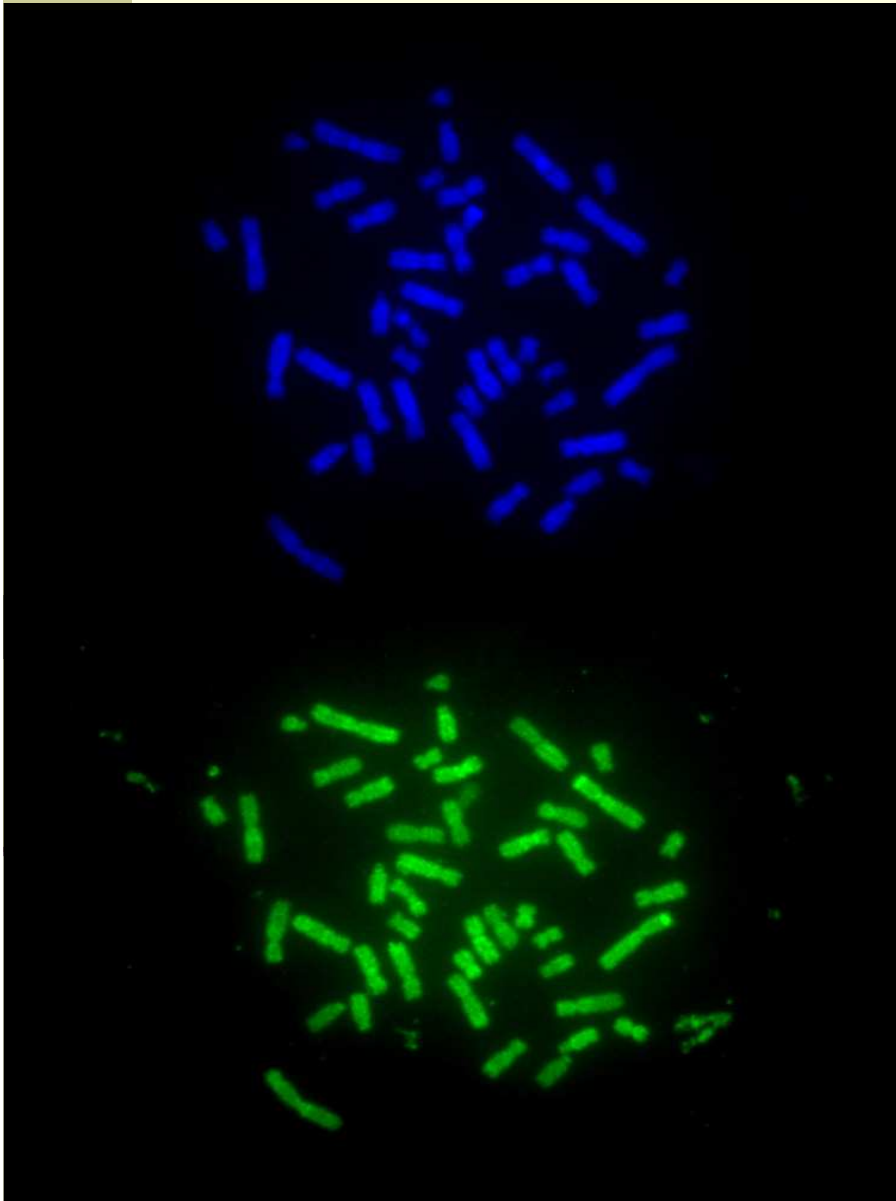
Green: increase in copy number
Red: decrease in copy number

Sample Preparation &
Hybridisation

Fluorescence microscopy &
Image Analysis

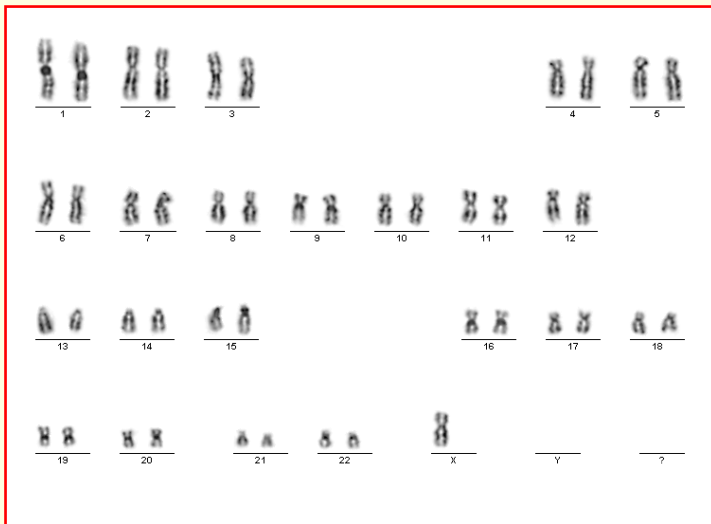
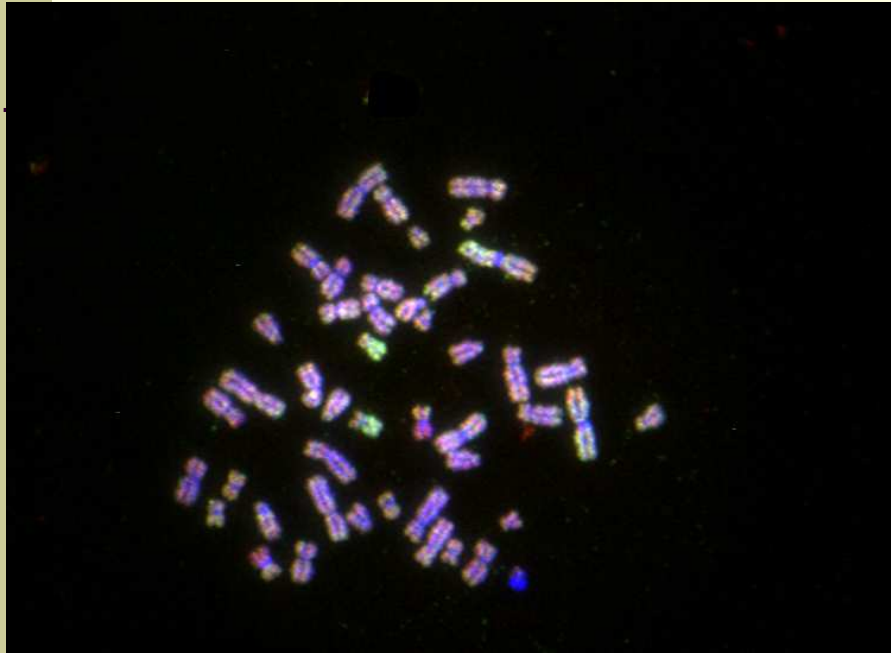
CGH

interpretace výsledků



CGH

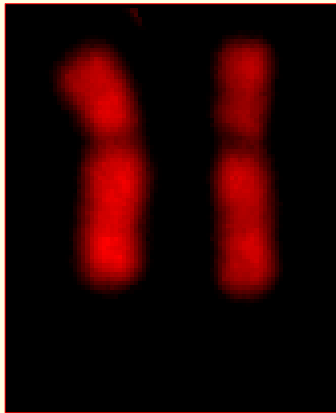
interpretace výsledků



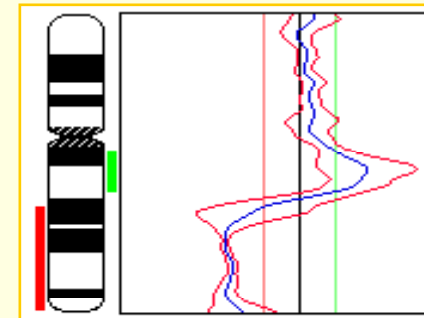
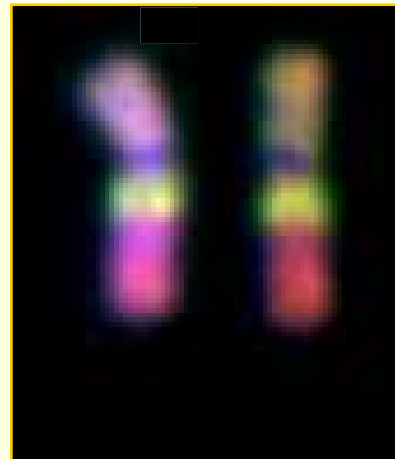
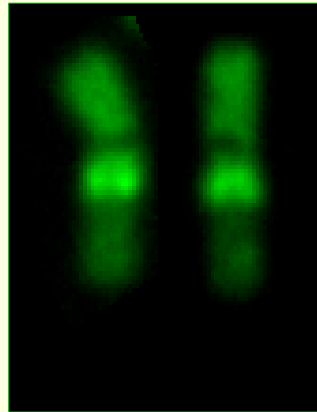
CGH

interpretace výsledků

Referenční DNA



Testovaná DNA



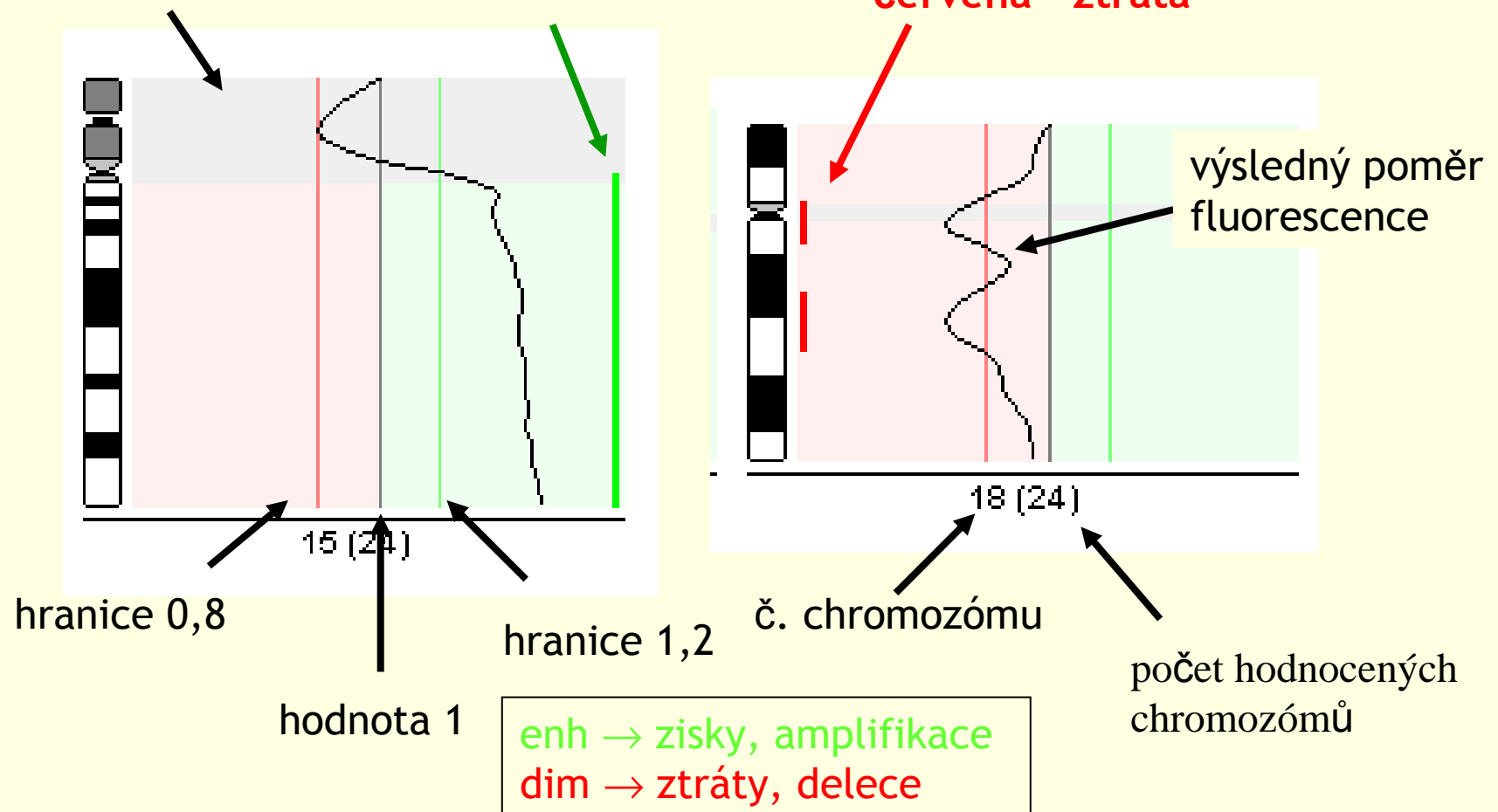
CGH

interpretace výsledků

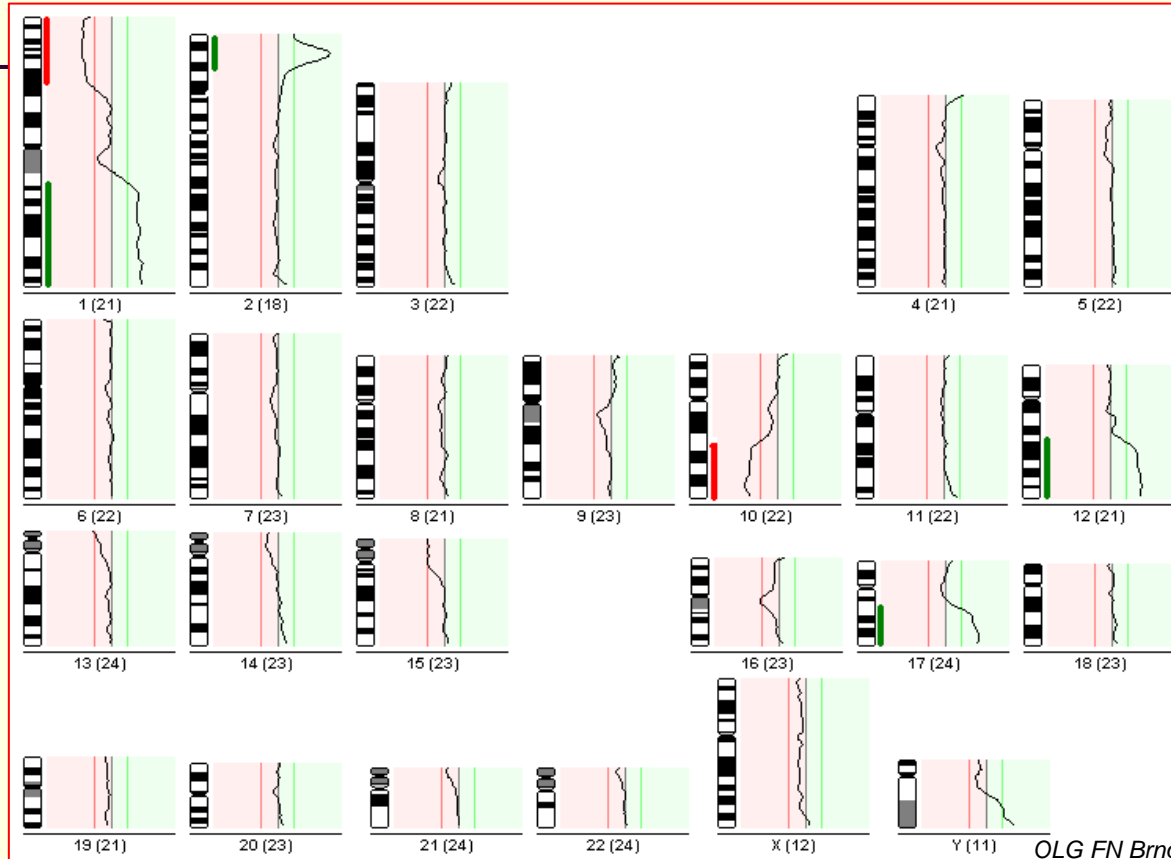
heterochromatin

zelená - zisk

červená - ztráta



Ukázka profilu CGH zpracovaného počítačovou analýzou obrazu u pacienta s neuroblastomem



rev ish enh (1q21-qter, 2p22-p24, 12q21-qter, 17q21-qter)
rev ish dim (1p31-pter, 10q22-qter)

enh → zisky, amplifikácie
dim → straty, delécie

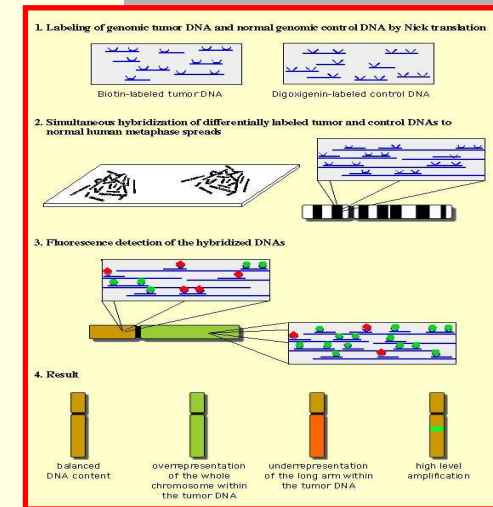
Výhody a nevýhody klasické CGH?

Výhody

- nevyžaduje mitózy
- poskytuje přehled numerických změn v celém genomu v jedné hybridizační reakci

Nevýhody

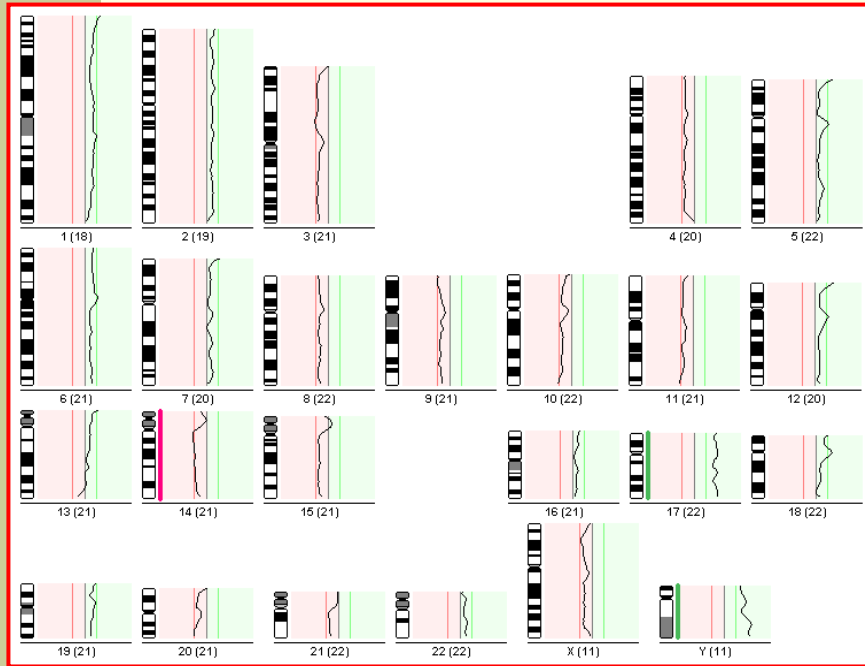
- nemožnost využití u změn, při kterých se nemění počet sekvencí (translokace, inverze)
- není vhodná k odlišení ploidie (normalizace)
- možnost identifikovat jen klony přítomné min. v 50 % buněk
- rozlišovací schopnost 10 Mb



CGH

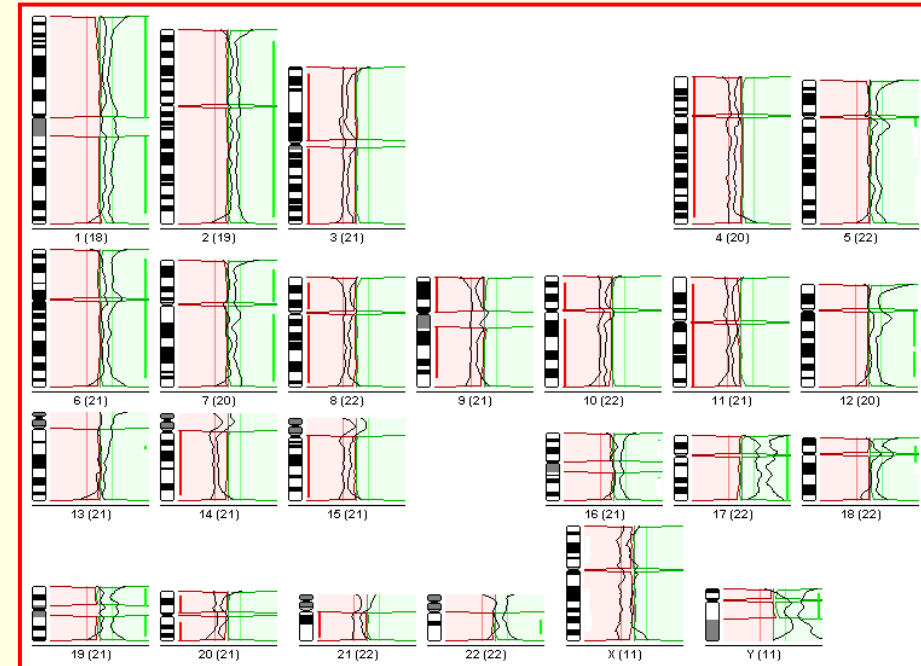
neuroblastom

HR-CGH



OLG FN Brno

rev ish enh (17,Y)
rev ish dim (14)



OLG FN Brno

rev ish enh (1,2,6,7,12q,17,19,22,Y)
rev ish dim (3,4,8,9,10,11,14,15,20,21)

Kazuistika .1

- děvče, rok narození 2002
- dg: stigmata - mongoloidní postavení očí, hyperplastická gingivální sliznice, soudkovitý hrudník, velké rozlité břicho
- matka 46,XX, inv(9), otec 46,XY,add(1)[87]/46,XY[13]

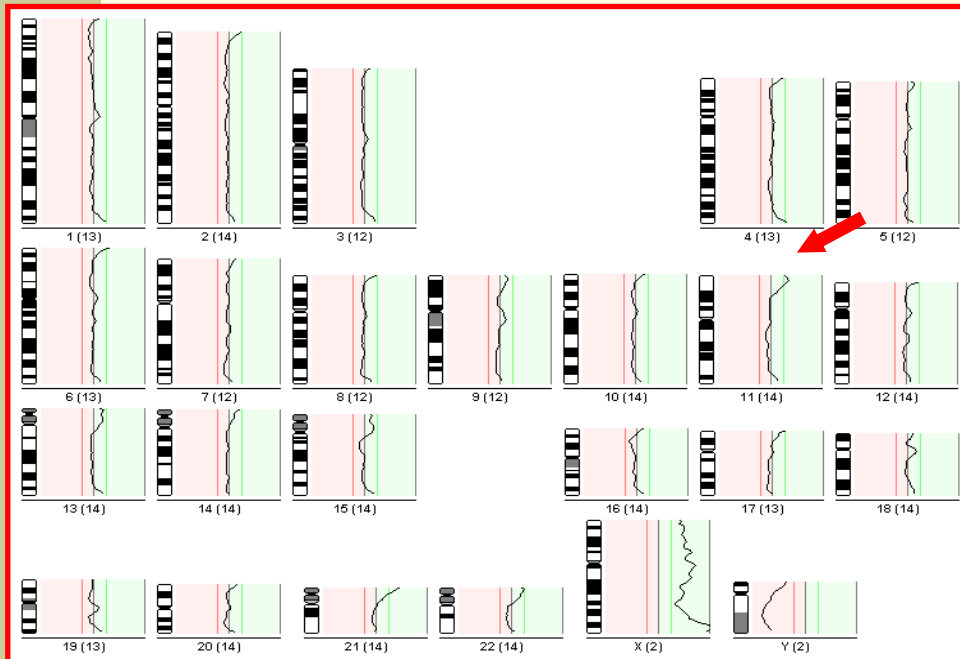


46,XX,add(1)

OLG FN Brno

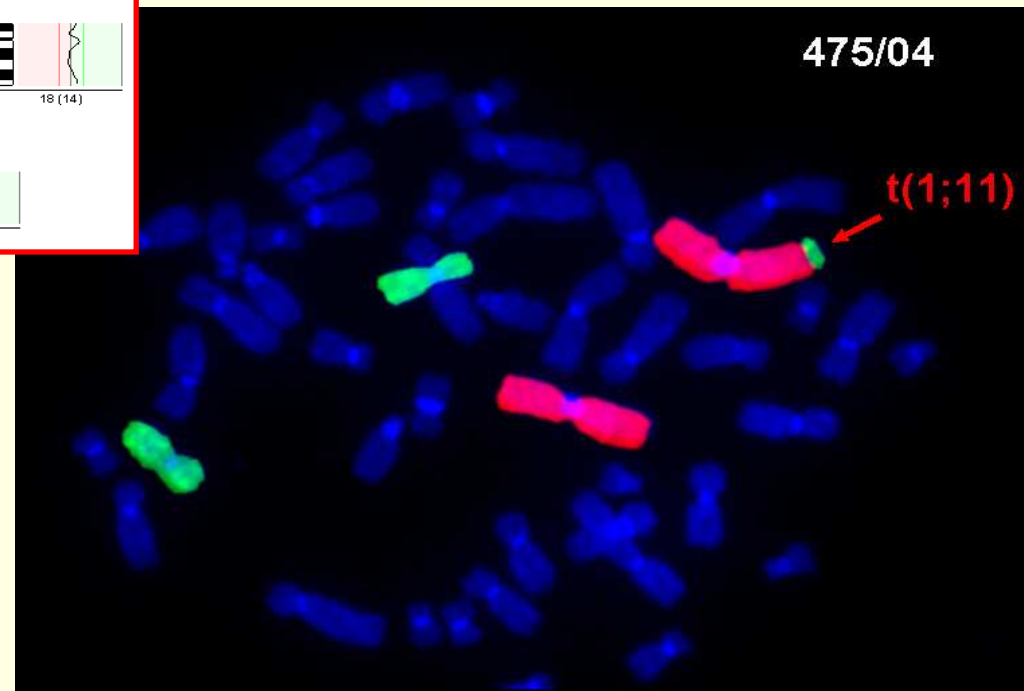
Kazuistika .1

CGH: rev ish enh (11p15-pter) - nebalancovaná translokace



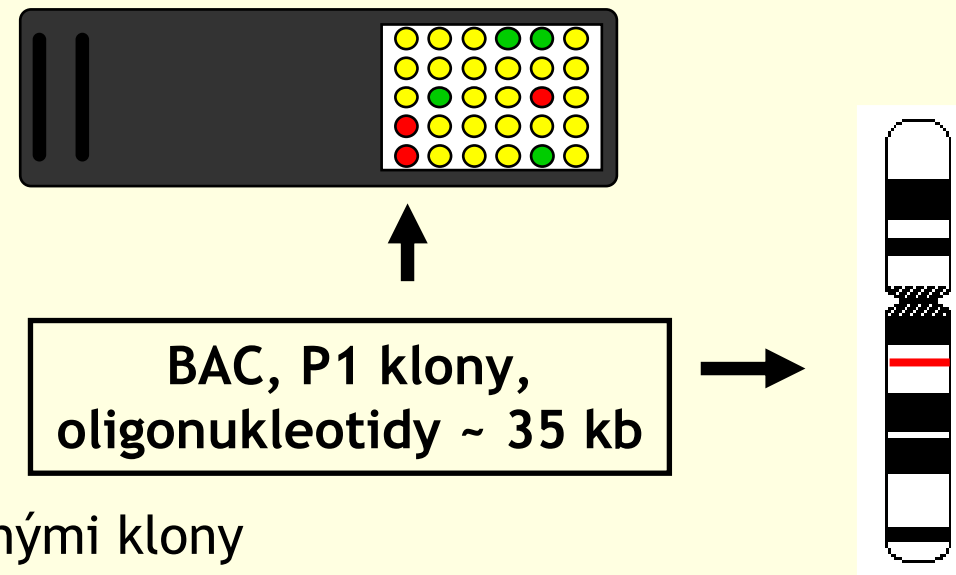
OLG FN Brno

FISH: der(1)t(1;11)



Array CGH : ještě větší rozlišení

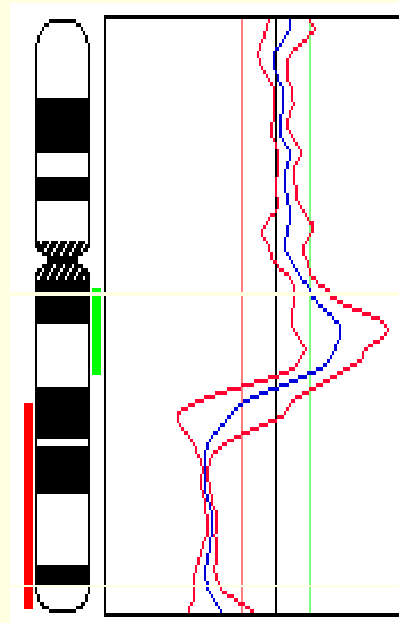
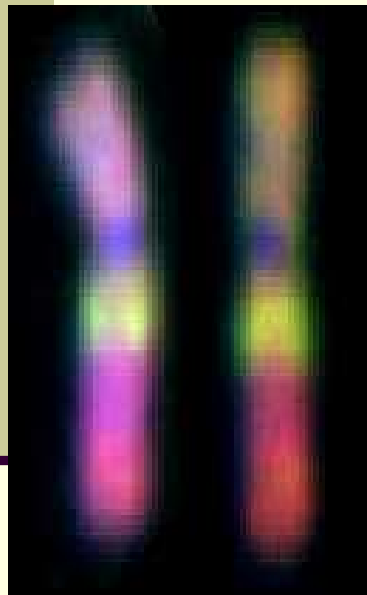
- detekce numerických změn v celém genomu v jedné reakci
- přesná lokalizace změn!



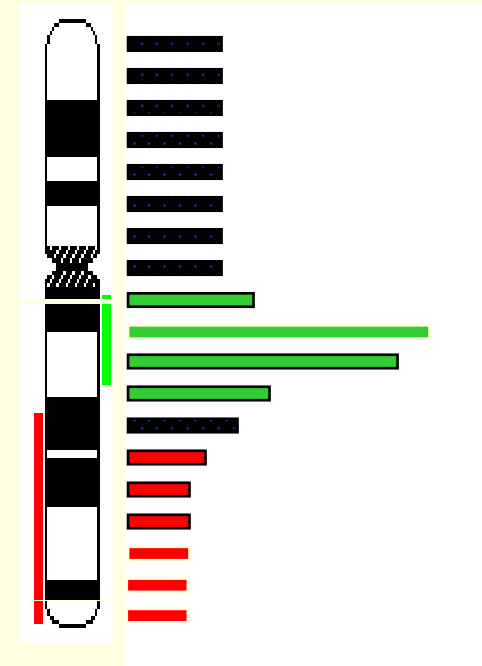
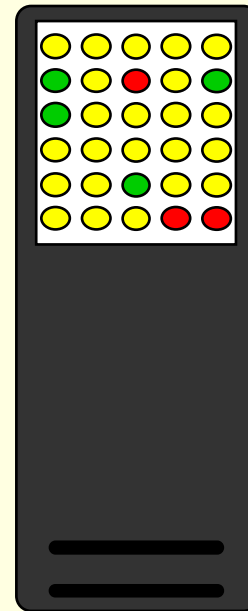
- Solinas-Toldo a kol., 1997
- nahrazení chromozómů separovanými klony
- BAC, PAC, c-DNA klony, oligonukleotidy ~ 35 kb
- princip DNA/DNA hybridizácie, sondy fluorescenčne značené

Array CGH : rozdíl je jen v podkadu

CGH



Array-CGH



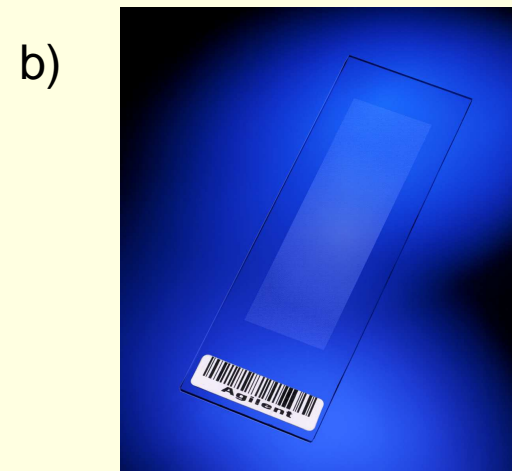
Takto to potom vyzerá...



www.abbottmoleculars.com



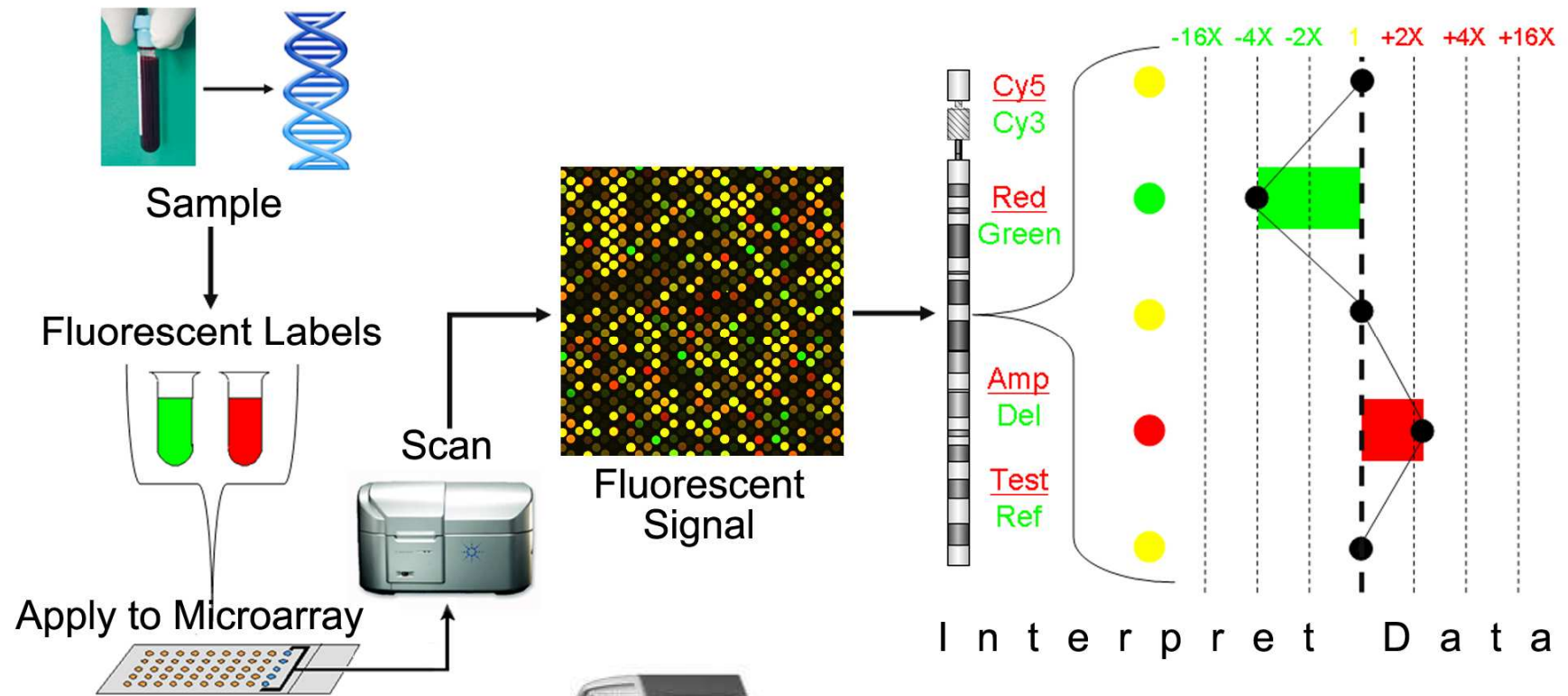
www.affymetrix.com



www.agilent.com

Ukážky CGH čipov firmy a) Affymetrix a b) Agilent.

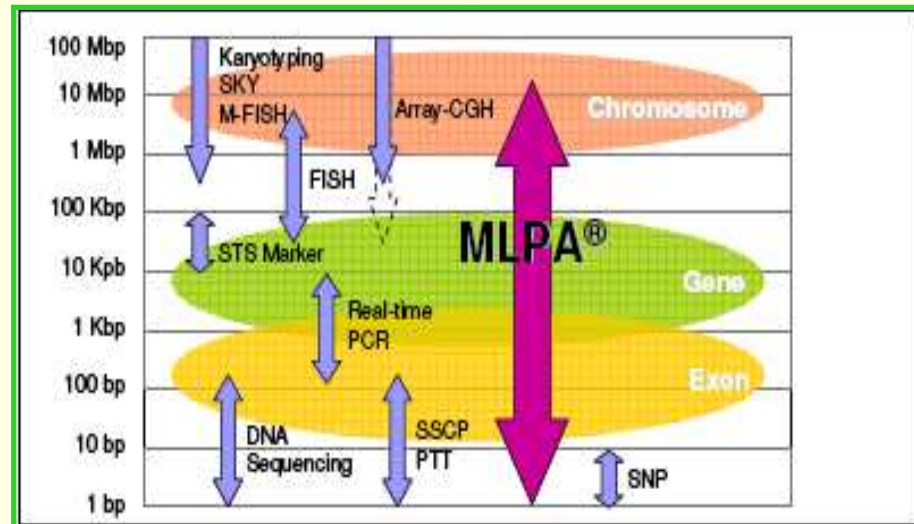
Array CGH : princip metody



Trošku viac molekulárnej biológie - MLPA

- Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
- Schouten a kol., 2002

(Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* Jun 15;30(12):57)



MLPA je:

Citlivá:

iba 20 ng DNA

Špecifická:

MLPA je schopná odlíšiť sekvencie líšiace sa v jedinom nukleotide

Multiplexná:

dokáže detekovať zmeny počtu kópií až 45 špecifických sekvencií v jednej reakcii

Jednoduchá:

MLPA reakciu je možné uskutočniť v jednej skúmavke

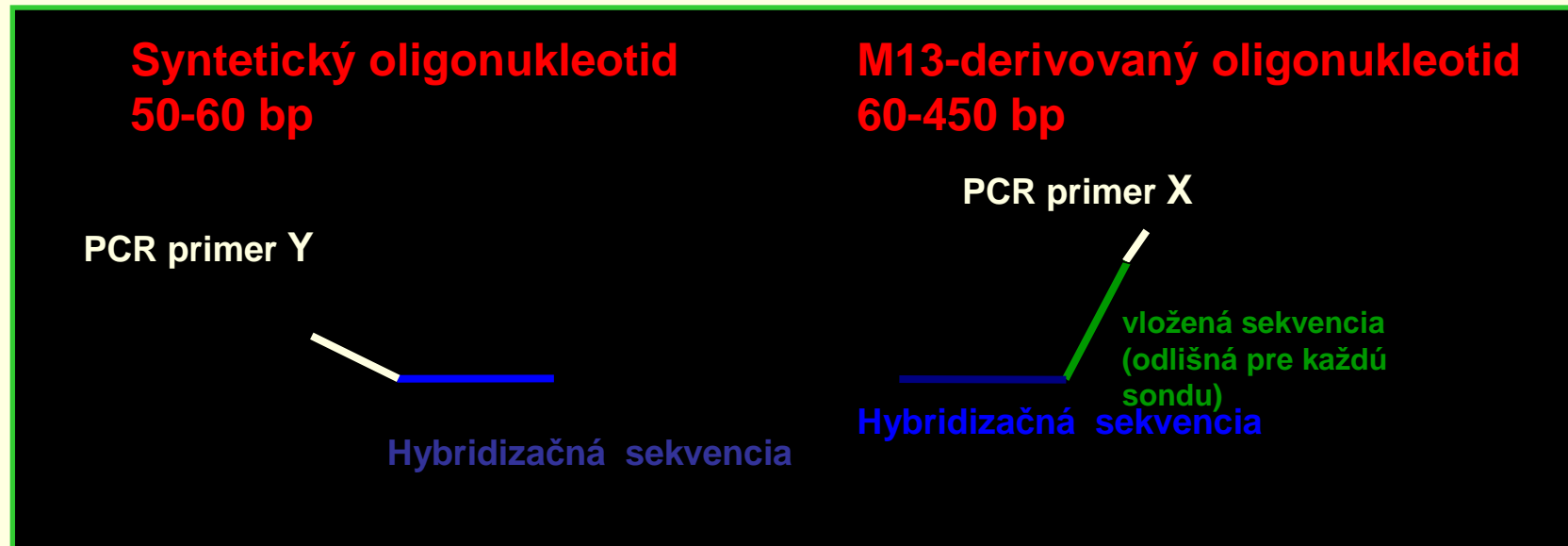
Relatívne lacná metóda:

Kit obsahuje všetky potrebné reagensie, nevyhnutné vybavenie je bežnou súčasťou všetkých molekulárne-biologických laboratórií

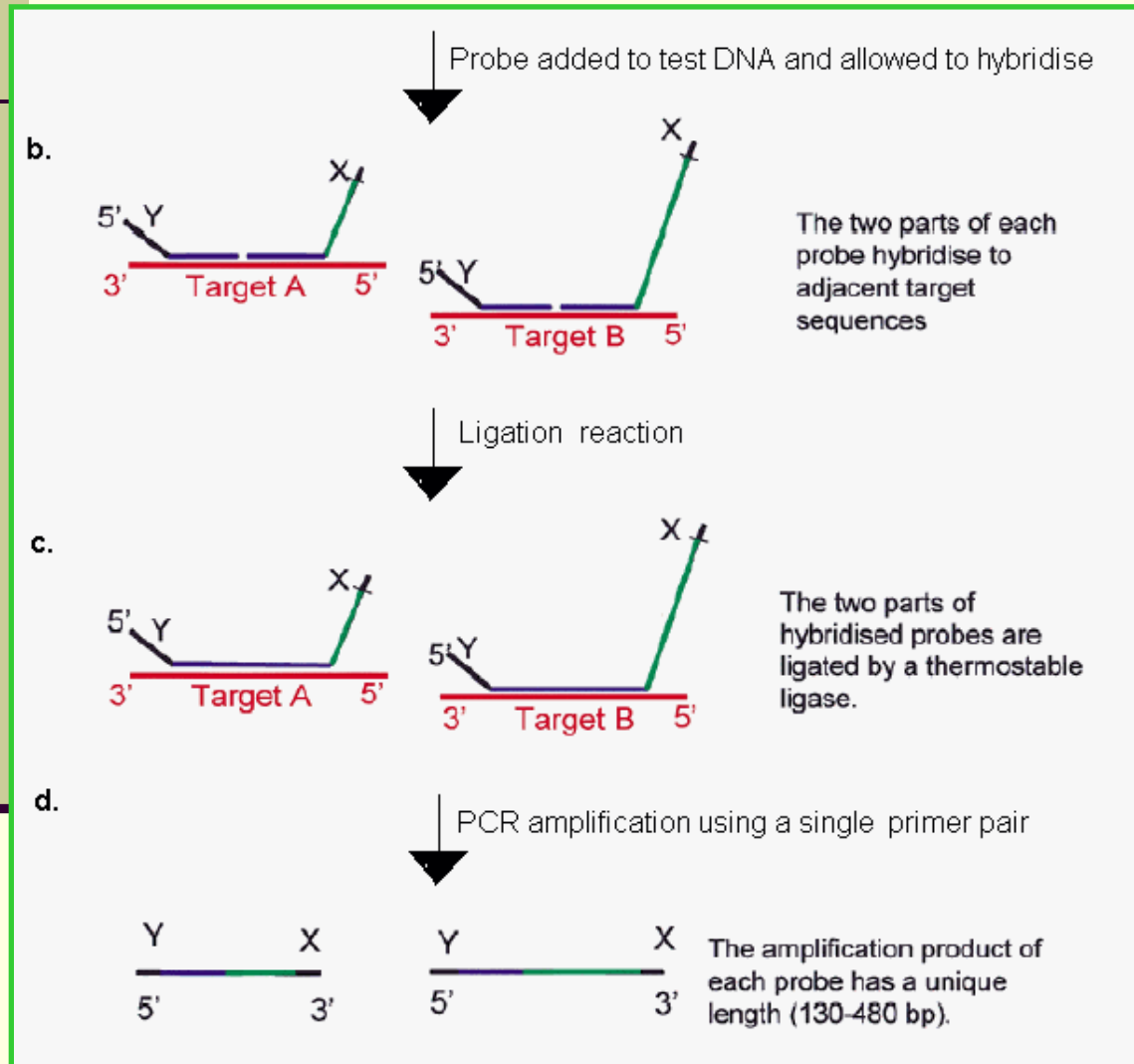
MLPA má aj svoje nevýhody:

- vysoká citlivosť na kontamináciu reakcie
- časovo náročná a obtiažna výroba vlastných sond
- minimálne 50% buniek nesúcich danú prestavbu
- bodové mutácie alebo polymorfizmus v mieste ligácie môžu viesť k falošným výsledkom

A takto MLPA funguje...



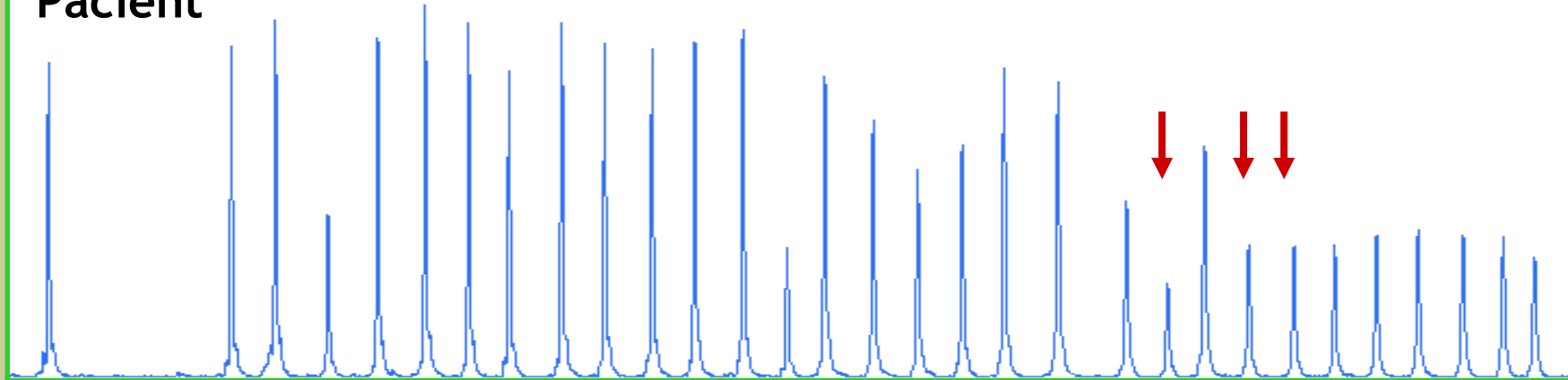
A takto MLPA funguje...



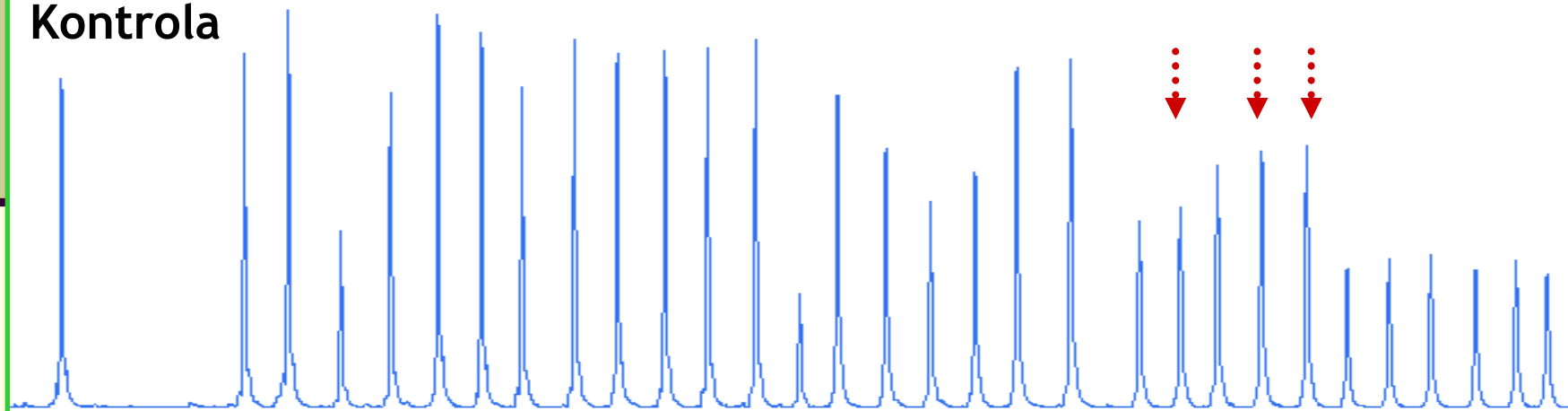
kapilárna elektroforéza

A takto MLPA funguje...

Pacient

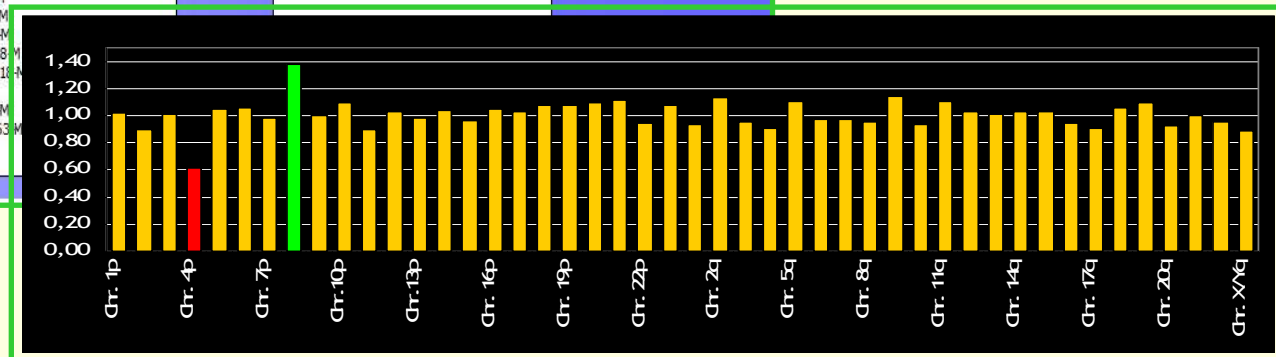


Kontrola



S hodnotením je to niekedy ťažšie

The screenshot shows the 'Coffalyser' web application interface. At the top, there is a navigation bar with tabs: 'MLPA-Mix', 'Import your Data', 'Data Analysis', 'Results Section', 'Statistical Analysis', 'Batch Analysis', and 'Help Page'. The 'MLPA-Mix' tab is active. The main content area is titled 'Mlpa - Mix configuration' and includes a 'Show List' section with a 'Gene Names' dropdown and buttons for 'remove Probe', 'Insert New', 'Rename Probe', 'Apply changes', and 'Save to file'. There are two columns of gene/probe identifiers: 'Probe list of active mix' and 'Control genes of active mix'. The 'Probe list of active mix' contains a long list of identifiers such as STK6-D01-136-M SLOW, FRG1-D02-151-M, BCL2L1-D01-160-M, etc. The 'Control genes of active mix' contains a shorter list including FRG1-D02-151-M, FLJ10474-D01-166-M = ODZ3, etc. A 'LOAD' button is visible next to the 'Currently active MIX' dropdown, which is set to 'Chr 20 MLPA MDX2'. The interface also features a 'Navigate' sidebar on the left with icons for 'MLPA-Mix', 'Import Data', 'Analysis', 'Results', 'Statistics', 'Batch', and 'Help'.



MLPA Kity fy MRC Holland

- aneuploídie celých chromozómov 13, 18, 21, X a Y
 - delécie a duplikácie chromozómových oblastí a celých génov (DiG, CMT1, subtelomerické oblasti)
 - delécie a duplikácie v jednom alebo viacerých exónoch (DMD)
 - metylácia DNA
- ⇒ **120 rôznych aplikácií**

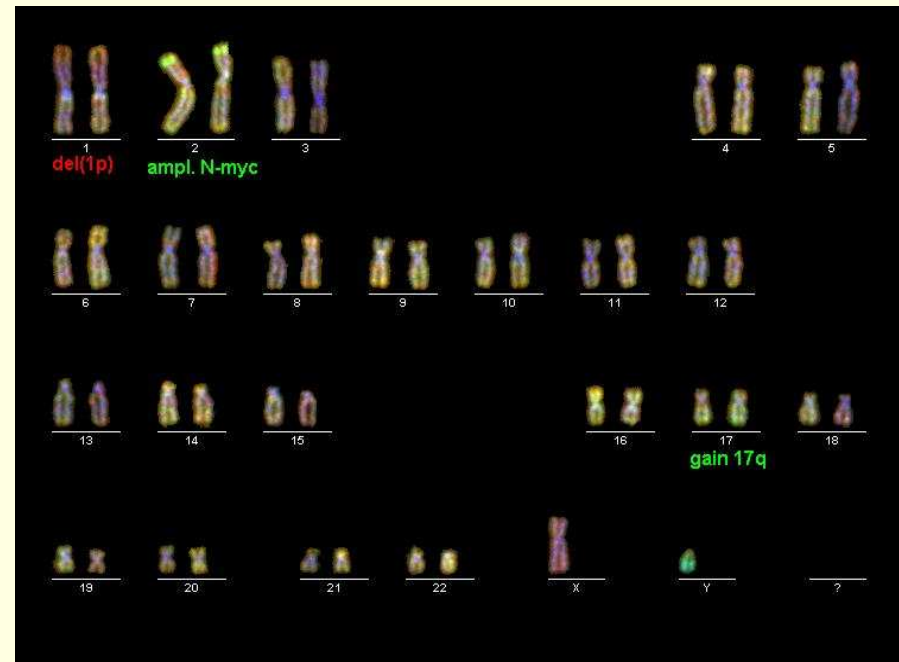


OLG FN Brno:

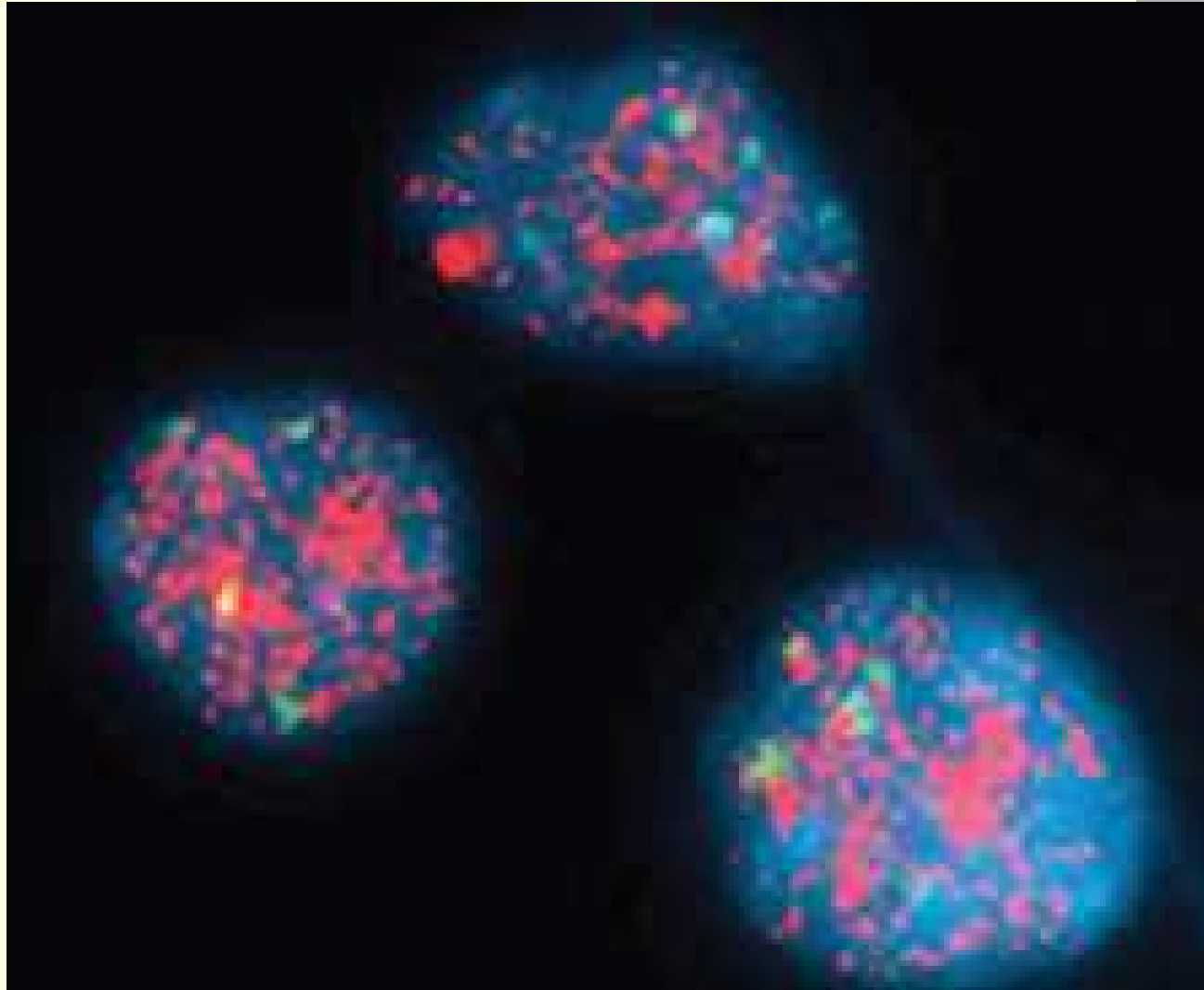
- subtelomerické prestavby u pacientov s MR
- DiGeorge syndróm
- delécia exónov u pacientov s DMD
- prestavby u pacientov s NF
- delécia RB1génu

Využití metod molekulární cytogenetiky u solidních nádorů : **Neuroblastom**_(mimo jiné..)

- **Cytogenetika:** kultivace tkáně tumoru; vyšetření karyotypu
- **Molekulární cytogenetika:**
 - I –FISH: amp.MYCN
del 1p36
gain 17q
 - CGH, HR-CGH
 - array-CGH
 - SKY, MLPA
- **Molekulární genetika:**
tyrozinhydroxyláza,
protein PGP 9.5

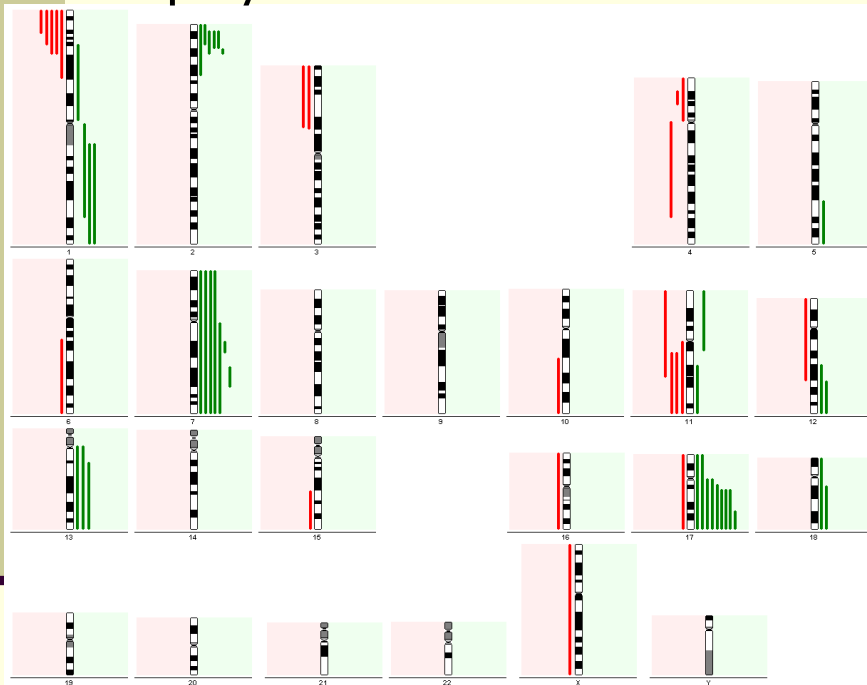


NB I-FISH amplifikace MYCN genu



NB CGH : profily pacientů

□ Souhrn CHA u pacientů ze skupiny **HR** NB



strukturní změny chromozomů:
zisk 2p a 17q, delece 1p, 3p, 9p, 11q

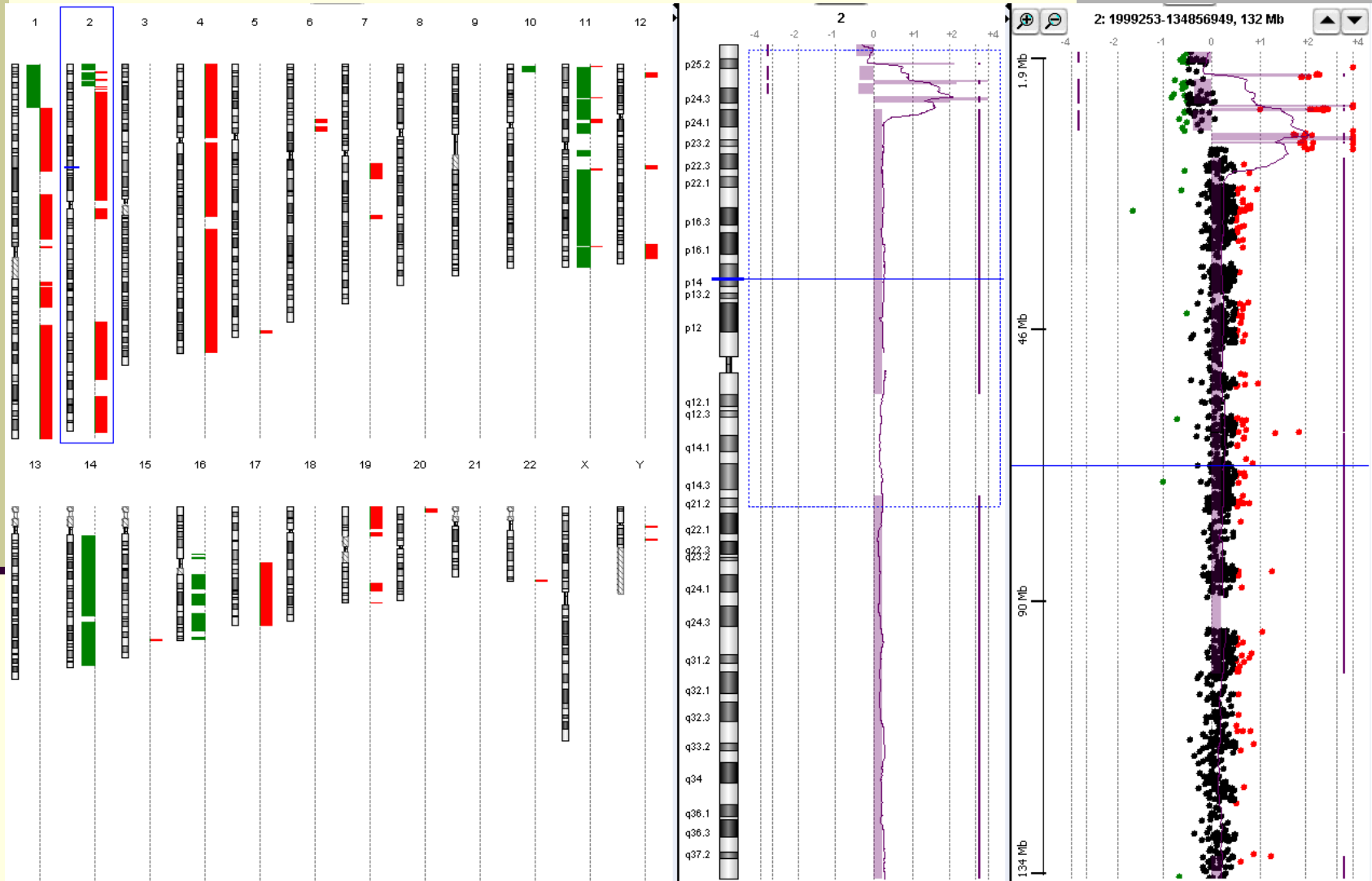
□ Souhrn CHA u pacientů ze skupiny **IMR** NB



numerické změny chromozomů:
-3,-4,-8,-9,-14,-15,-16,-19,-X
+2,+5,+6,+7,+17,+18

Ztráty genetického materiálu označeny **červeně** a zisky **zeleně**

NB array CGH amplifikace MYCN genu



Význam molekulárně cytogenetických vyšetření :

I-FISH, CGH

**komplexní analýza cytogenetických
změn**

array-CGH

upřesnění stratifikace pacientů



**individualizace léčebné
terapie**

Spektrum molekulárně cytogenetických vyšetření

- Prenatální genetická diagnostika
- Klinická (postnatální) cytogenetika
- Onkogenetika

Spektrum molekulárně cytogenetických vyšetření

Prenatální genetická diagnostika

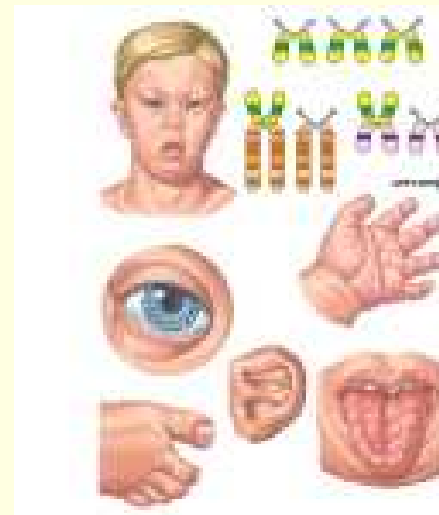
PV – kultivovaná, nekultivovaná, fetální krev, choriové klky

- trizomie chromozómů 13, 18, 21 (Patau, Edwards, Down sy)
- vyšetření sestavy a počtu gonozómů (XX, XY)
- mikrodeleční syndromy (DiGeorge, del(22)(q11.2),...)
- vyšetření suspektních CHA (balancované translokace,...)



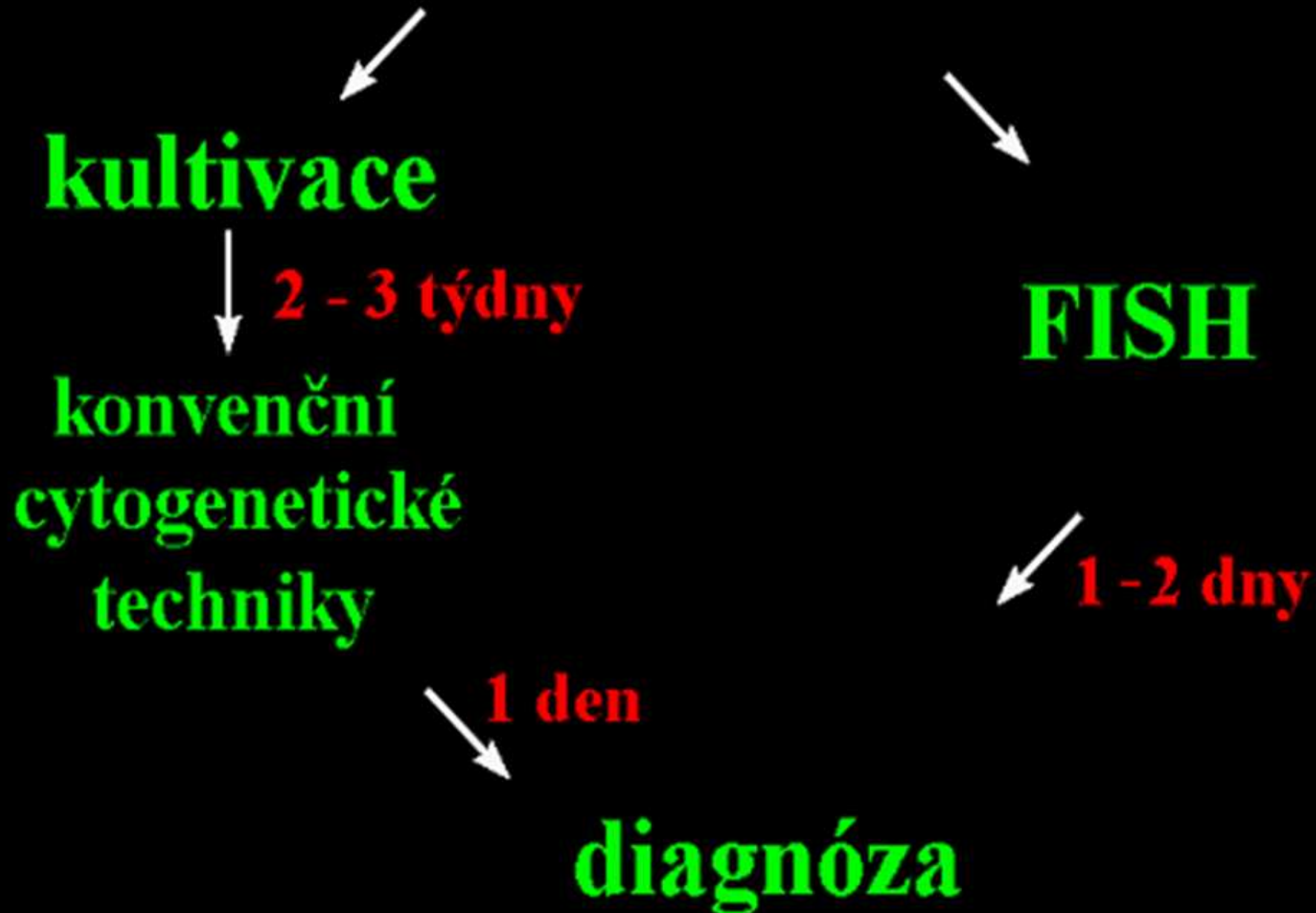
OLG FN Brno

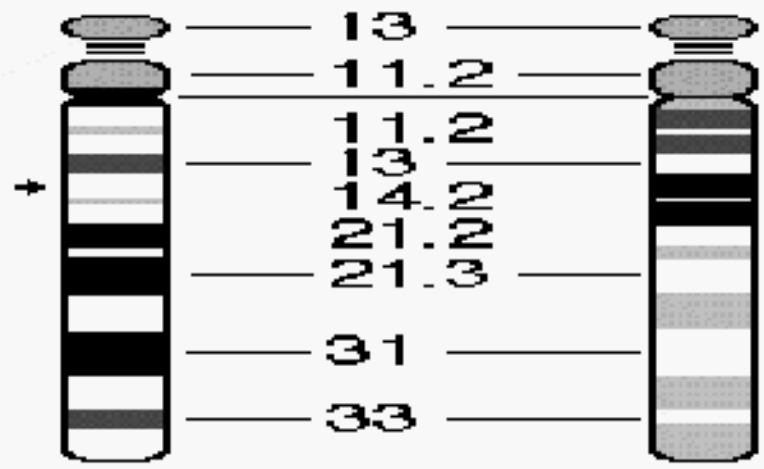
FISH: + 21



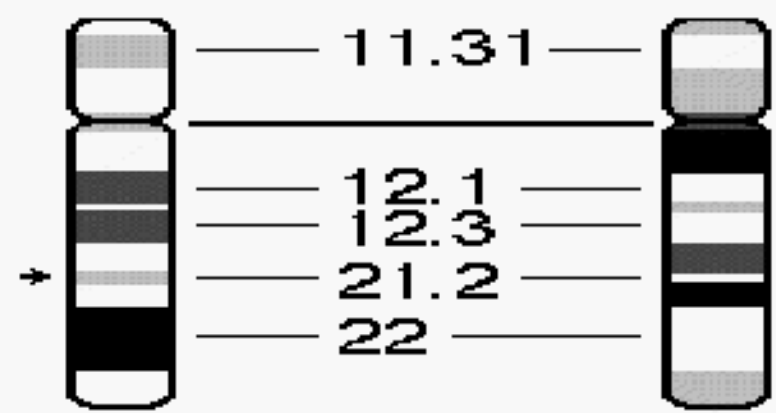
Downův syndrom

Amniocentéza

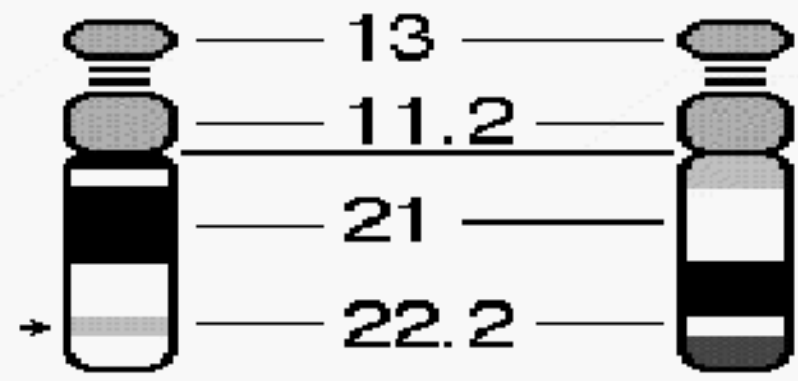




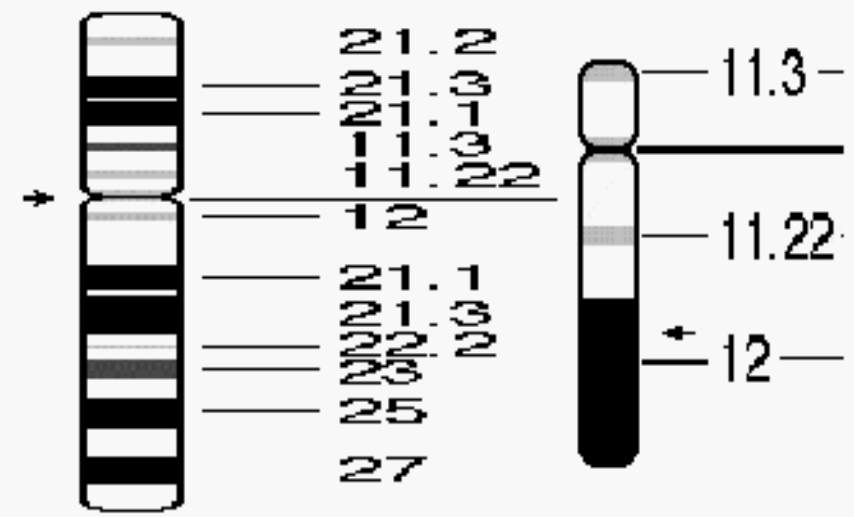
13



18



21



X

Y

Prenatální genetická diagnostika

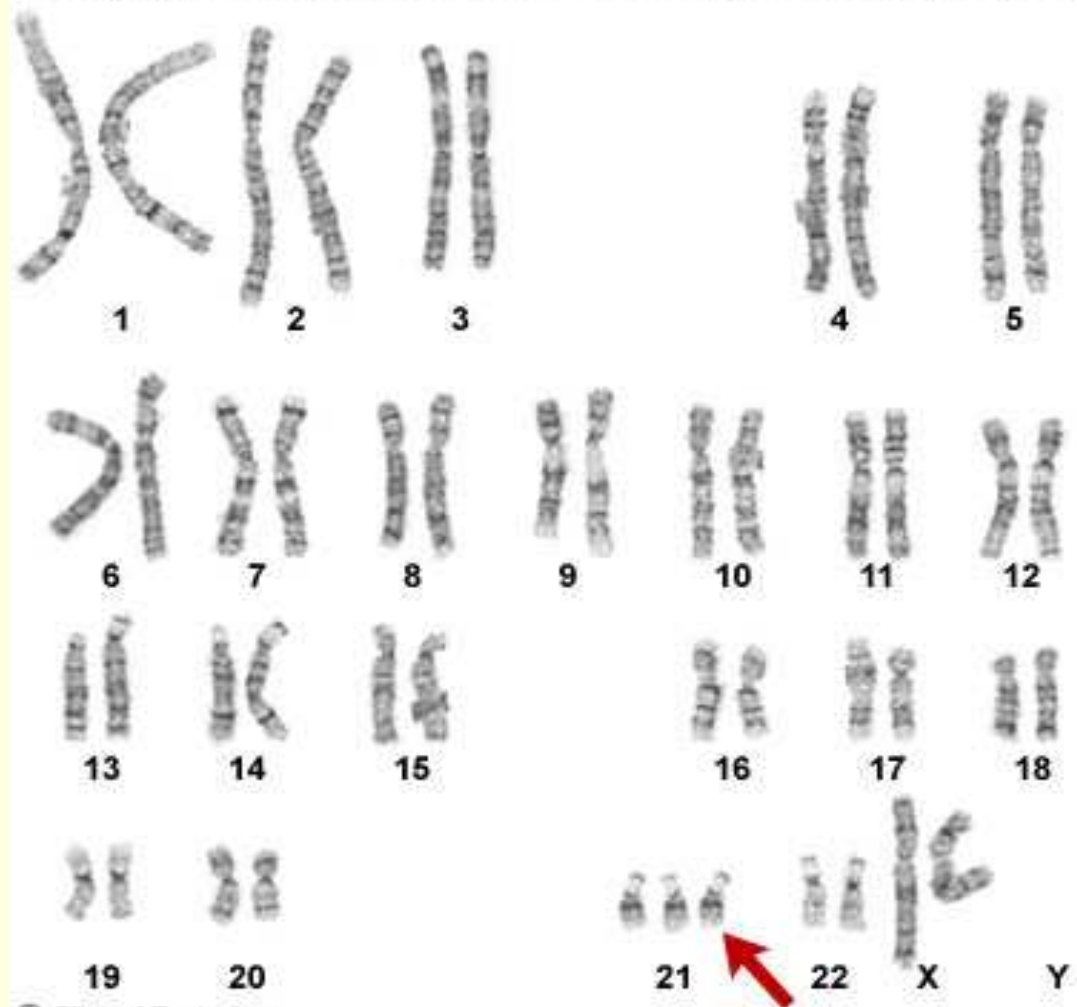
Downův syndrom



OLG FN Brno



Karyotype from a female with Down syndrome (47,XX,+21)



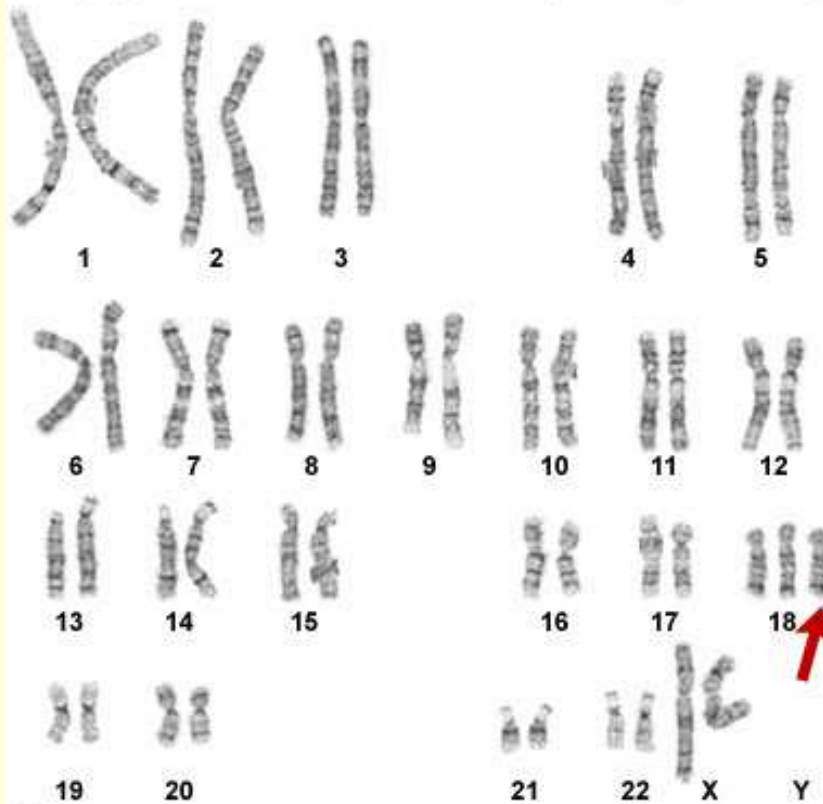
© Clinical Tools, Inc.

Prenatální genetická diagnostika

Edwardsův syndrom

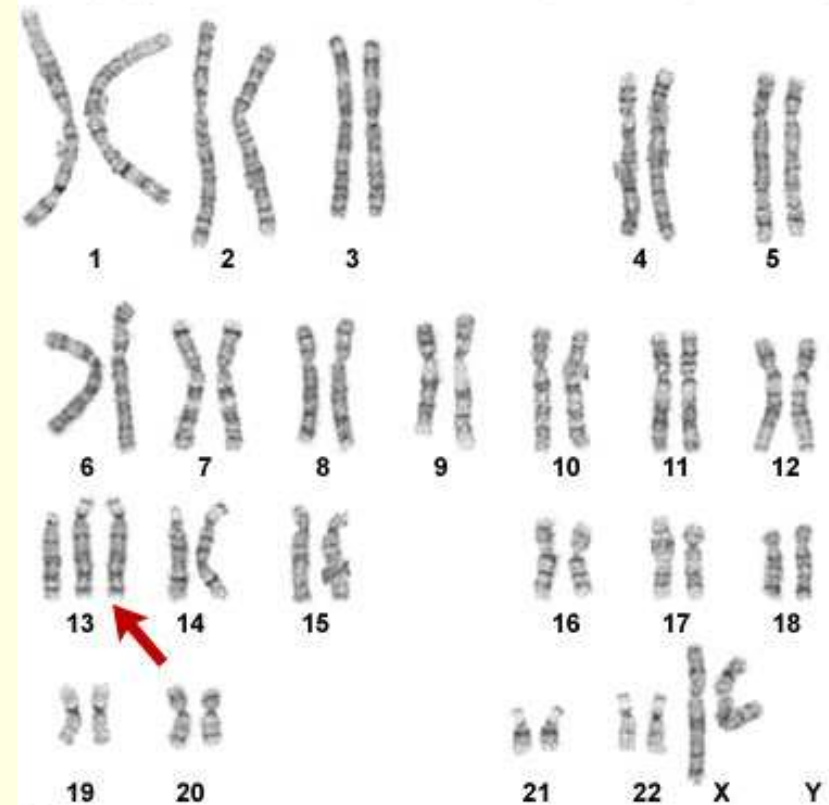
Patauův syndrom

Karyotype from a female with Edwards syndrome (47,XX,+18)



© Clinical Tools, Inc.

Karyotype from a female with Patau syndrome (47,XX,+13)

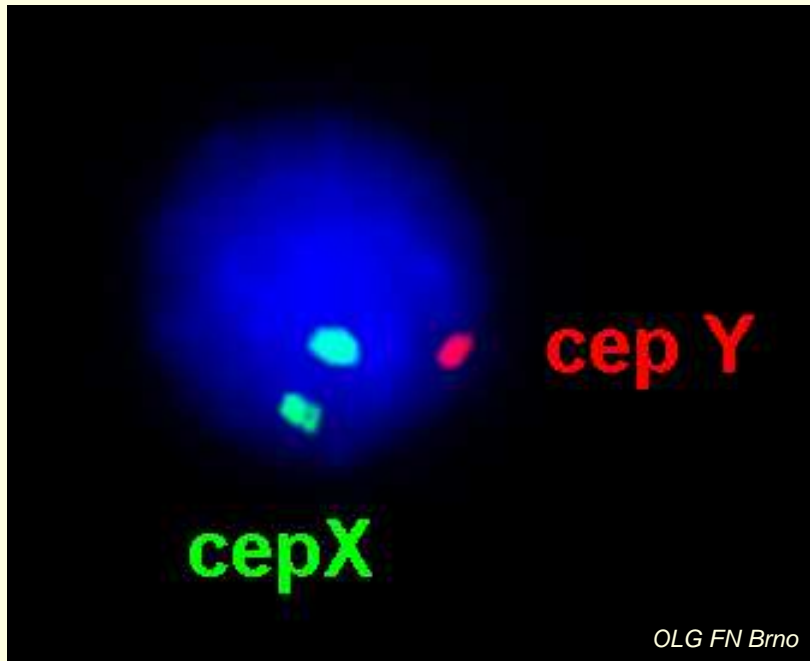
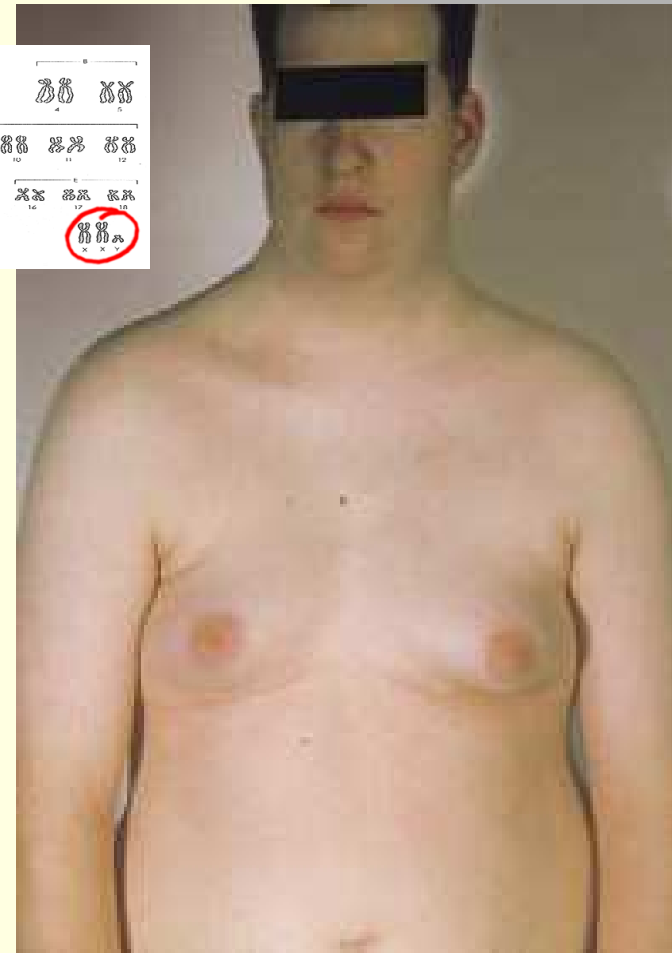
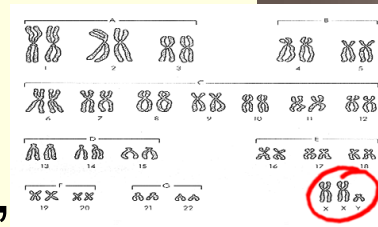


© Clinical Tools, Inc.

Prenatální genetická diagnostika

Klinefelterův syndrom

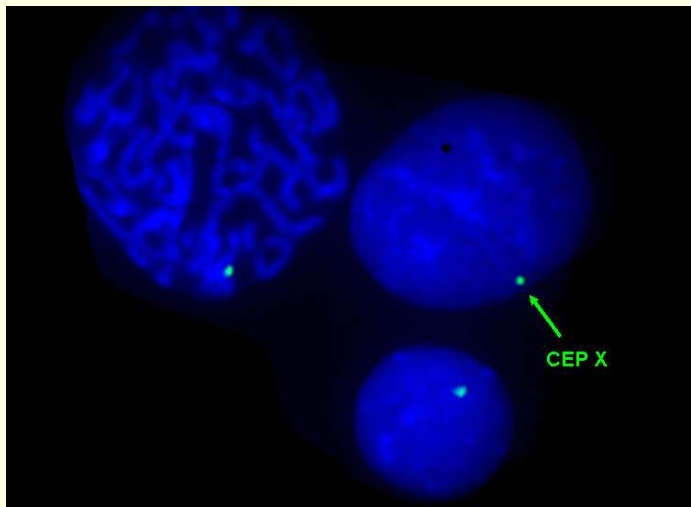
- **47,XXY**
- vysoká postava,
porucha růstu vousů,
ženská distribuce
podkožního tuku, PMR



Prenatální genetická diagnostika

Turnerův syndrom

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



OLG FN Brno

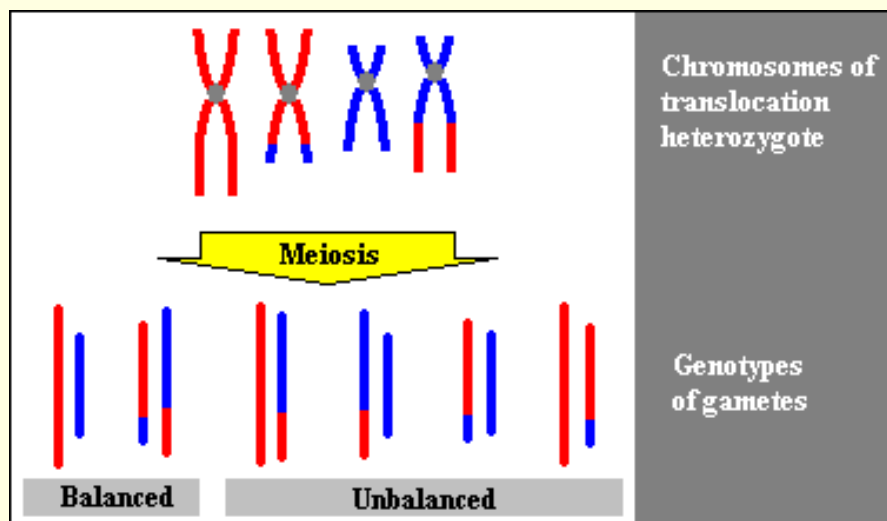


medgen.genetics.utah.edu

Prenatální genetická diagnostika

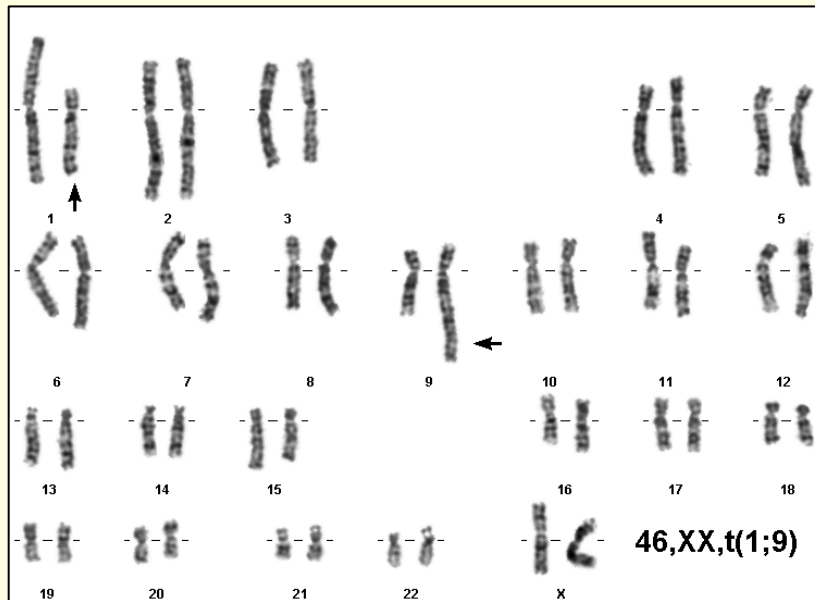
Balancované translokace - důsledky

- 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)

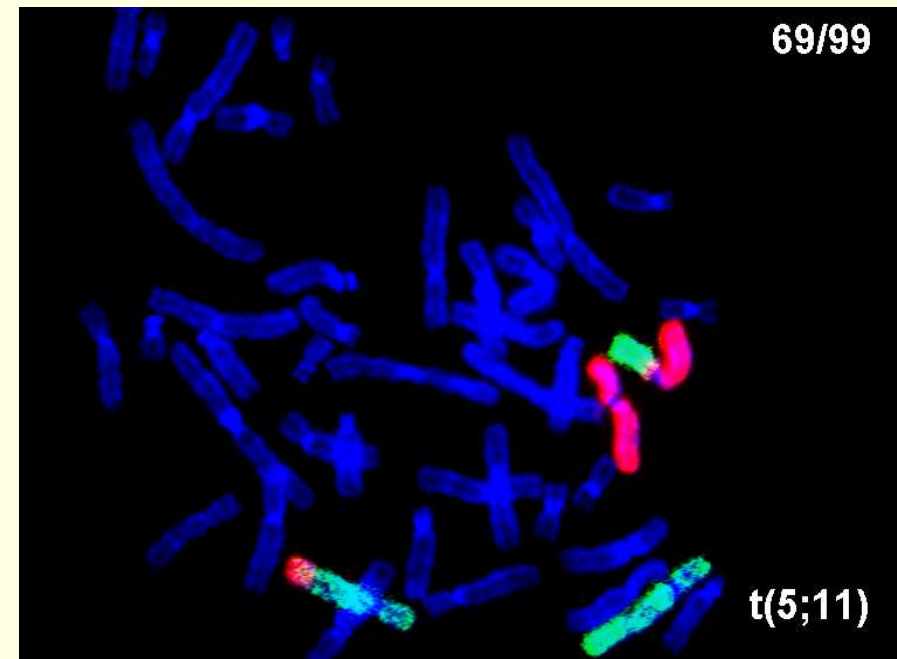


Prenatální genetická diagnostika

Ukázka karyotypu s translokací



OLG FN Brno



OLG FN Brno

Klinická cytogenetika

Preimplantační genetická diagnostika (PGD)

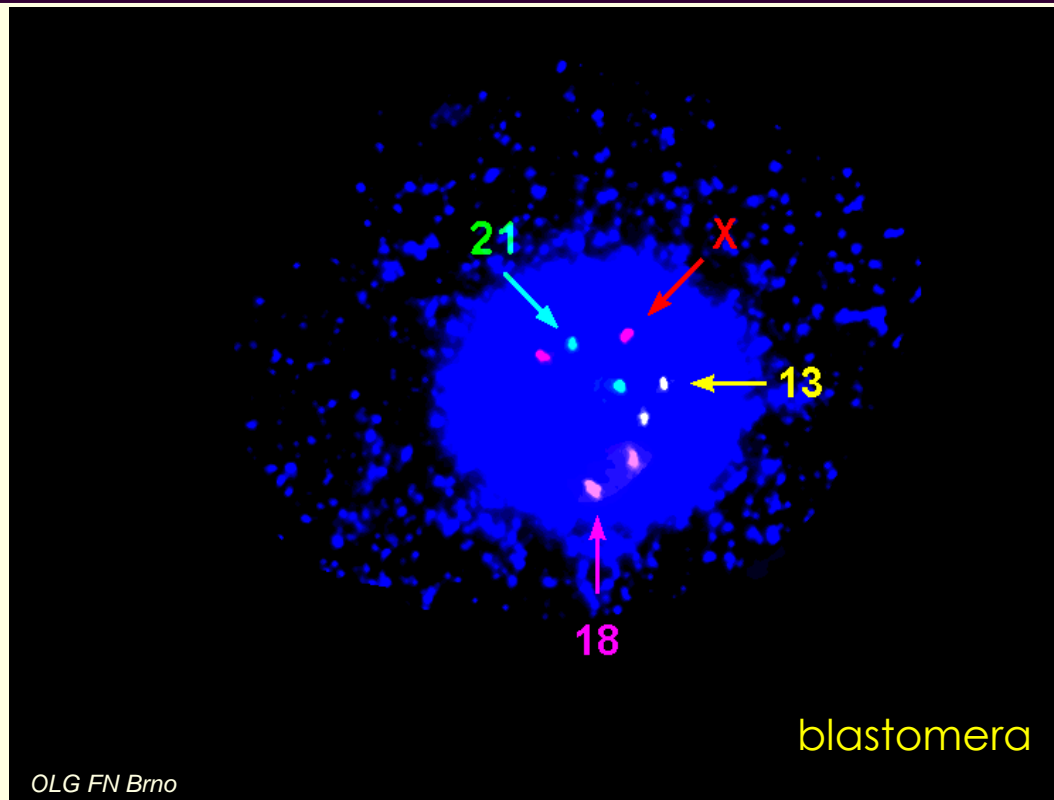
- **Nutné postupy asistované reprodukce – IVF**

- **Vyšetření 1-2 buněk třídenního embrya
in vitro pomocí FISH metody,**
- **možnost detekce genetické abnormality budoucího plodu**
- **vyřazení patologických embryí z programu IVF**
- **transfer embrya bez genetické zátěže do dělohy matky**

cílem je zvýšit úspěšnost metod asistované reprodukce a snížit riziko SA, především pak narození zdravého potomka

Klinická cytogenetika

Preimplantační genetická diagnostika (PGD)



- limitovaný počet buněk dostupných genetické analýze
- možné riziko narušení vývoje vyšetřovaného embrya
- není vyloučená jiná genetická vada
- doplnění PGD amniocentézou

1. Spektrum molekulárně cytogenetických vyšetření

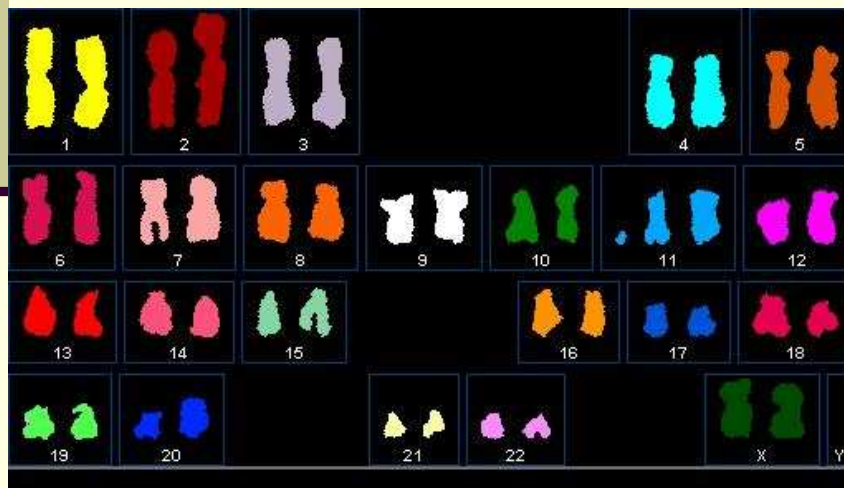
- Prenatální genetická diagnostika
- Klinická (postnantální) cytogenetika
- Onkogenetika

1. Spektrum molekulárních cytogenetických vyšetření

Klinická cytogenetika

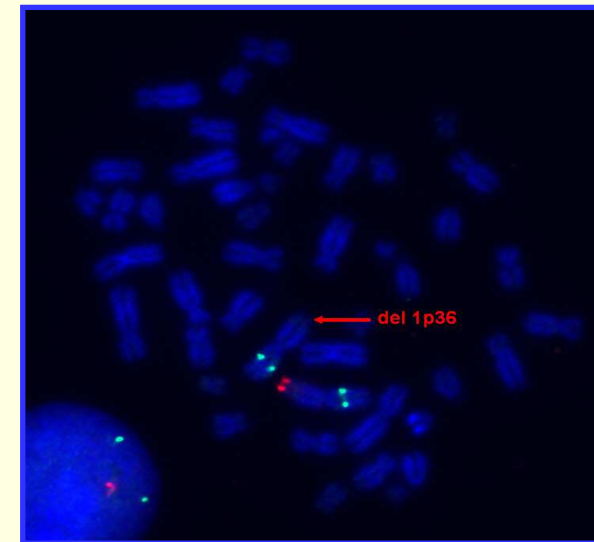
lymfocyty periferní krve, bukální stěry

- detekce mikrodelečních syndromů – FISH, MLPA
- detekce mikrodelecí v subtelomerických oblastech – FISH, MLPA
- analýza původu marker chromozómů – CGH, SKY
- identifikace a upřesnění strukturních chromozomových přestaveb
- detekce malých numerických mozaik - FISH



OLG FN Brno

SKY: identifikace marker chromozómu pocházejícího z chr. 11



OLG FN Brno

FISH: delecce 1p36

Mikrodeleční syndromy

(nezachytitelné pomocí klasické cytogenetiky)

del 22q11 (DiGeorge syndrom)

■ SRDEČNÍ VADY:

- přerušení oblouku aorty
- Fallotova tetralogie: neúplné mezikomorové septum
stenóza plicnice
hypertofie levé komory
posun aortálního oblouku nad pravou komoru

■ ANOMÁLIE TVÁŘE:

- nízko položené uši s abnormálním ohybem ušního boltce
- úzká oční štěrbina
- malá ústa a malá dolní čelist
- bulbózní nos s čtvercovou špičkou
- submukózní nebo viditelný rozštěp patra

■ PORUCHY IMUNITY:

- nedostatek T-lymfocytů , hypokalcémie

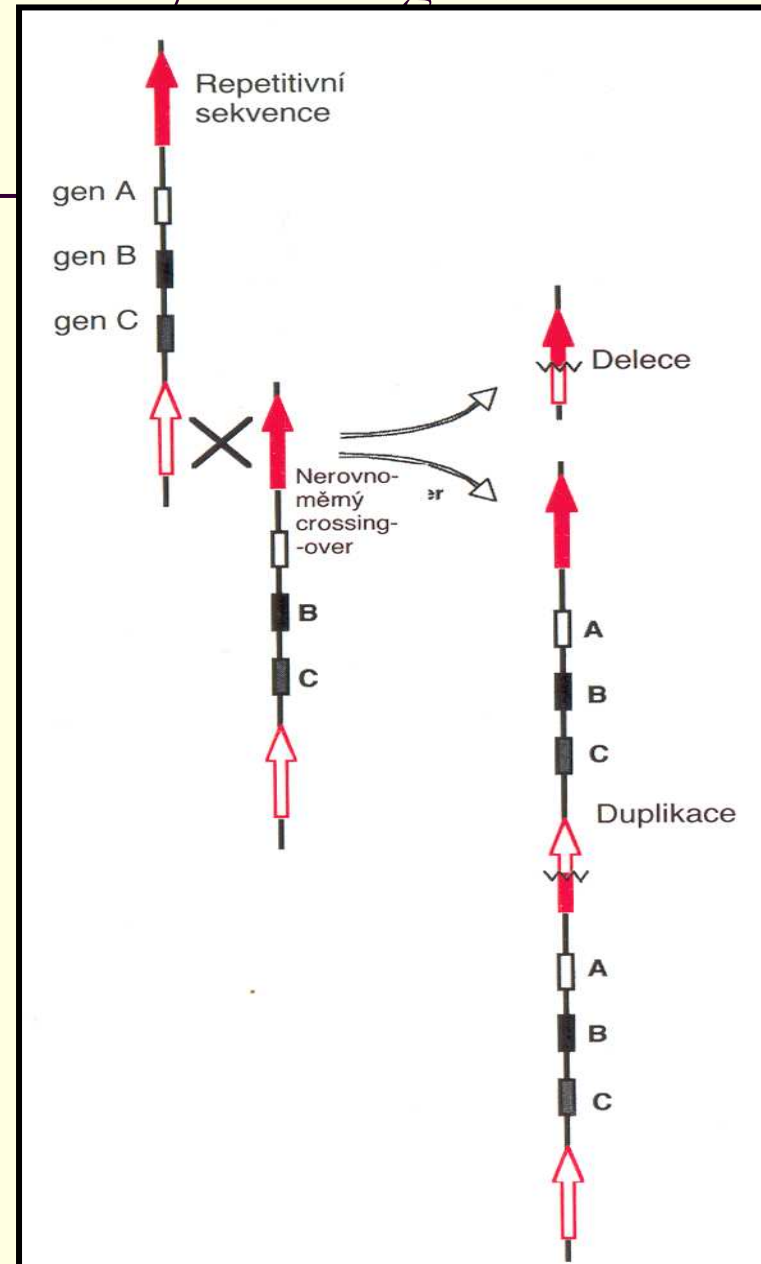
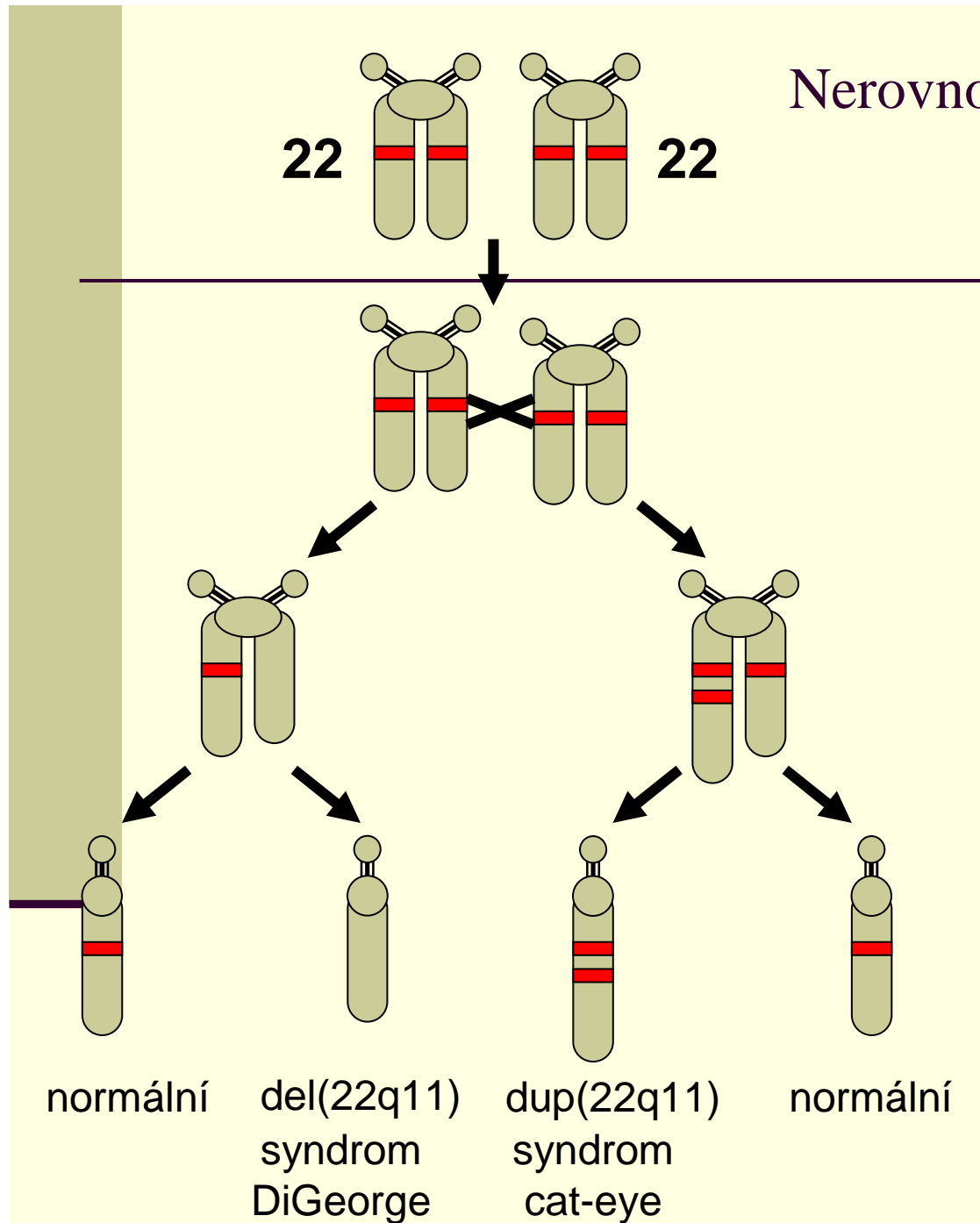
Klinická cytogenetika

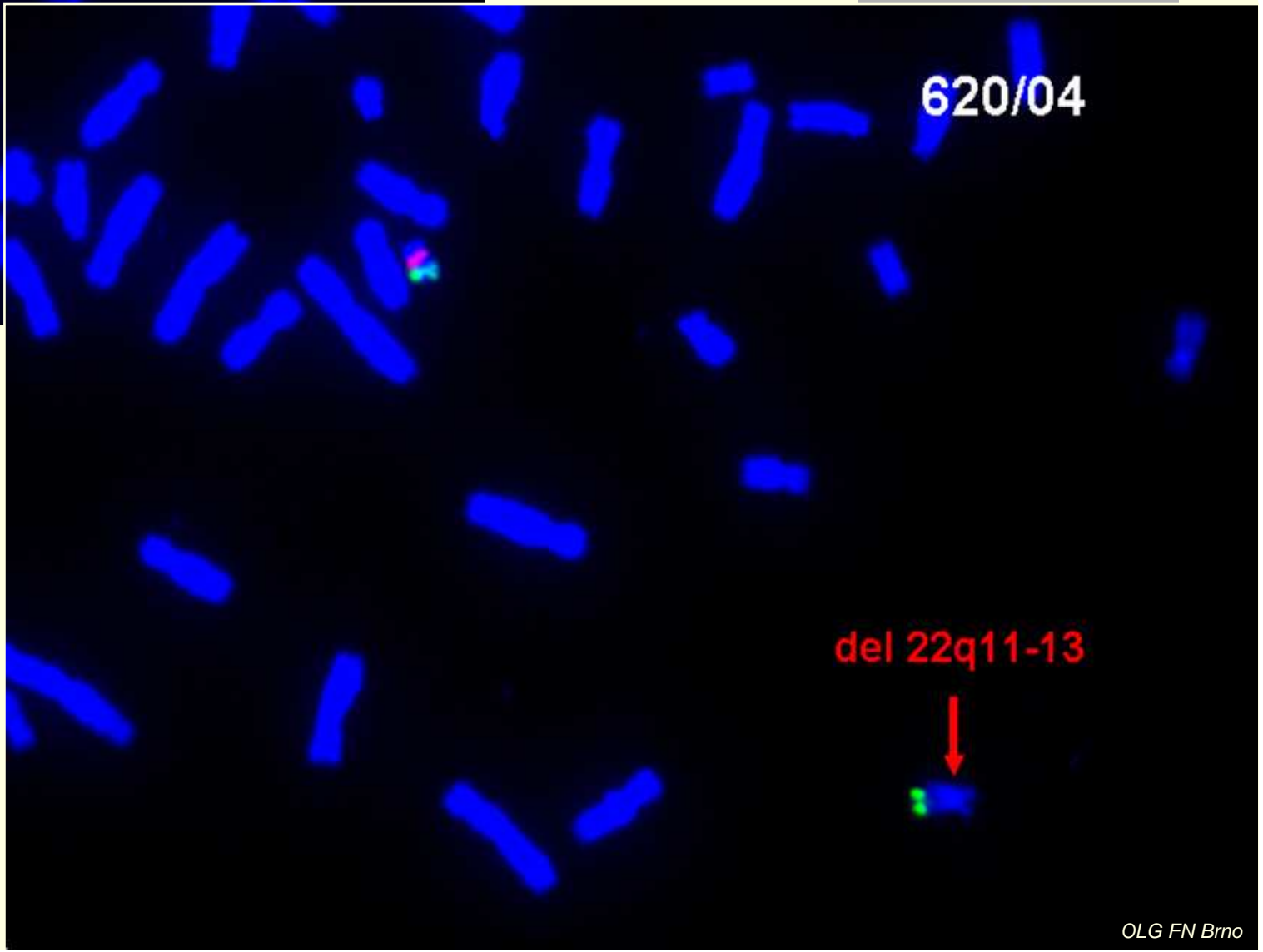
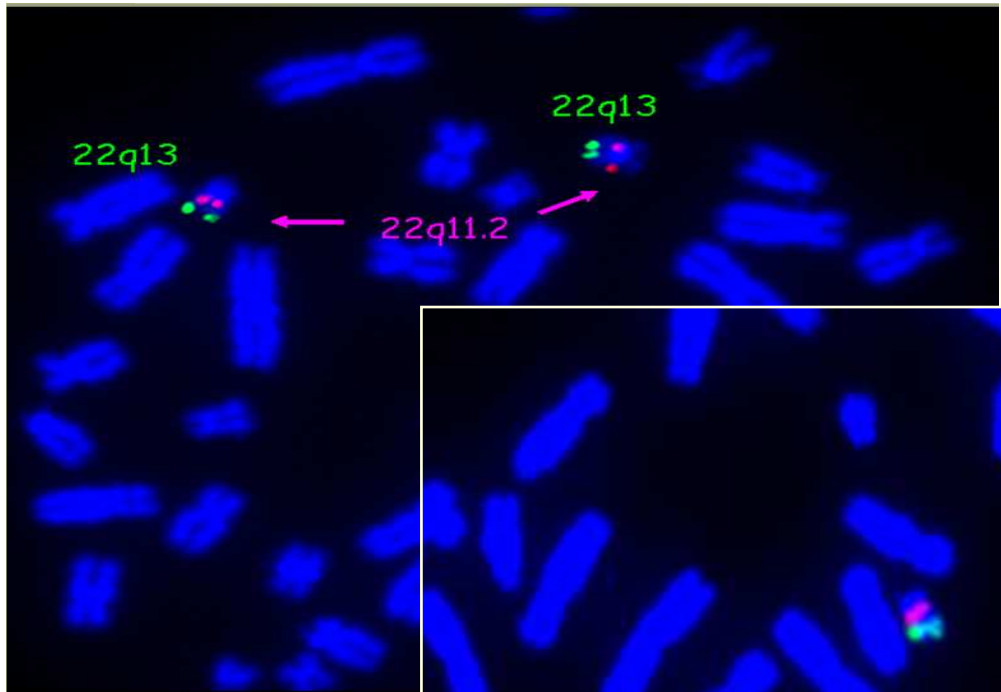
Mikrodelece 22q11

DiGeorgeův/VCFS syndrom

- mikrodelece na chromozomu 22 v oblasti q11.2 patří mezi nejčastější konstituční aberace u člověka
- pacienti s mikrodeleci se vyskytují v populaci s četností 1: 4000 až 1: 6000 živě narozených dětí
- přibližně 90 % probandů má de novo delecii 22q11, asi u 6% se jedná o familiární přenos

Nerovnoměrný crossing-over



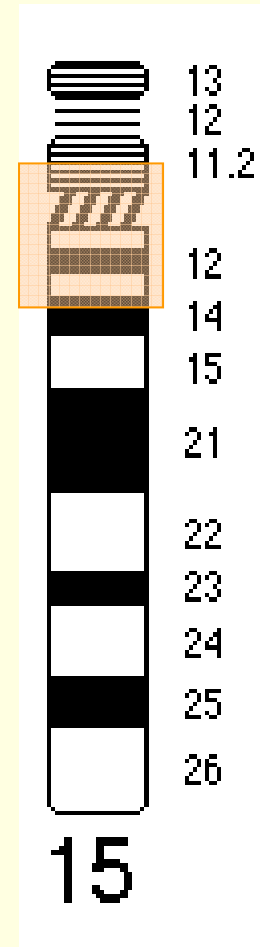


Mikrodeleční syndromy

Syndromy Prader-Willy a Angelman

abnormality na
chromozomu 15
v oblasti **15q11-q13**

klinicky naprosto
odlišné syndromy!!



del 15q11-13

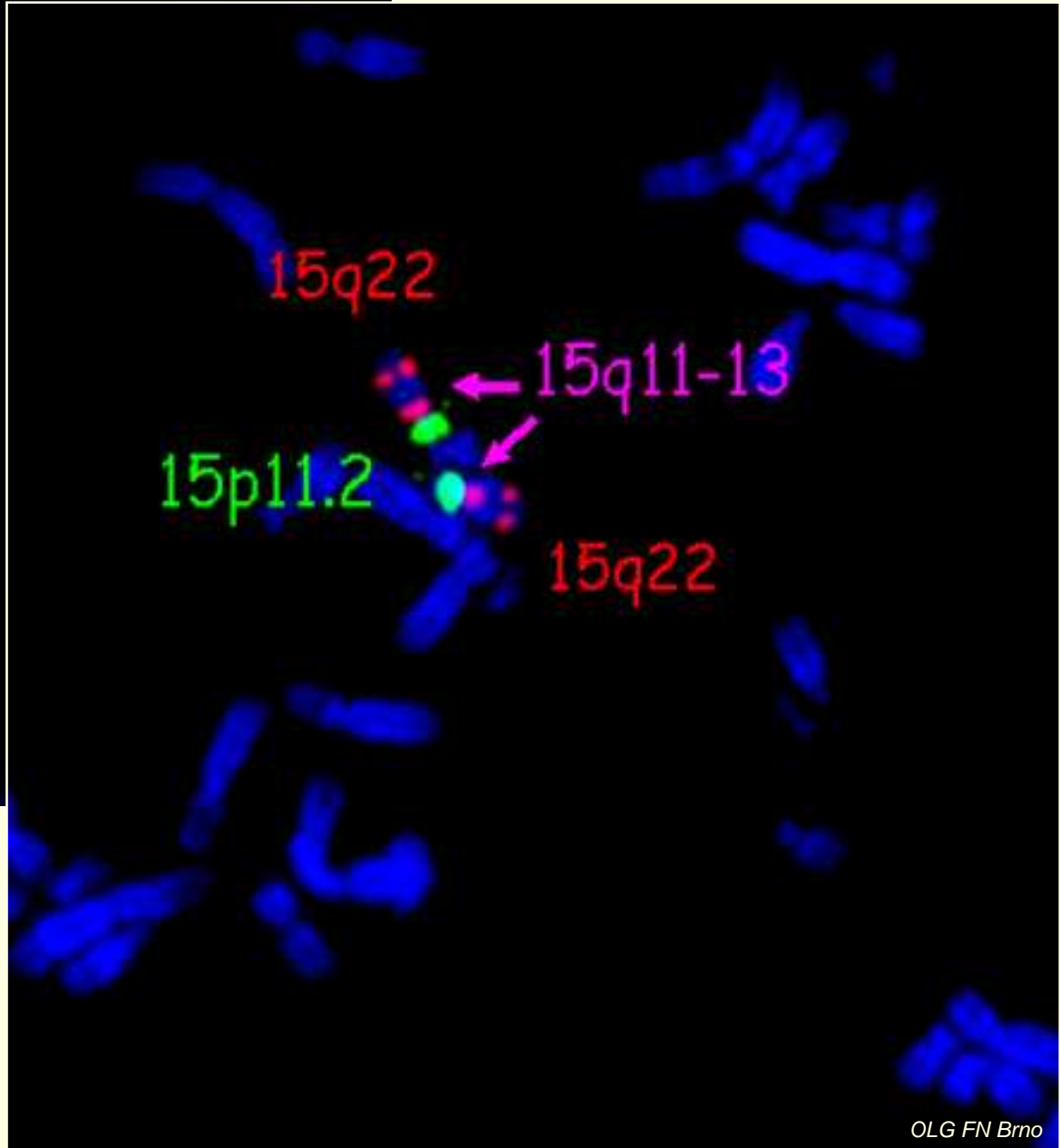


15q22

15q11-13

15p11.2

15q22

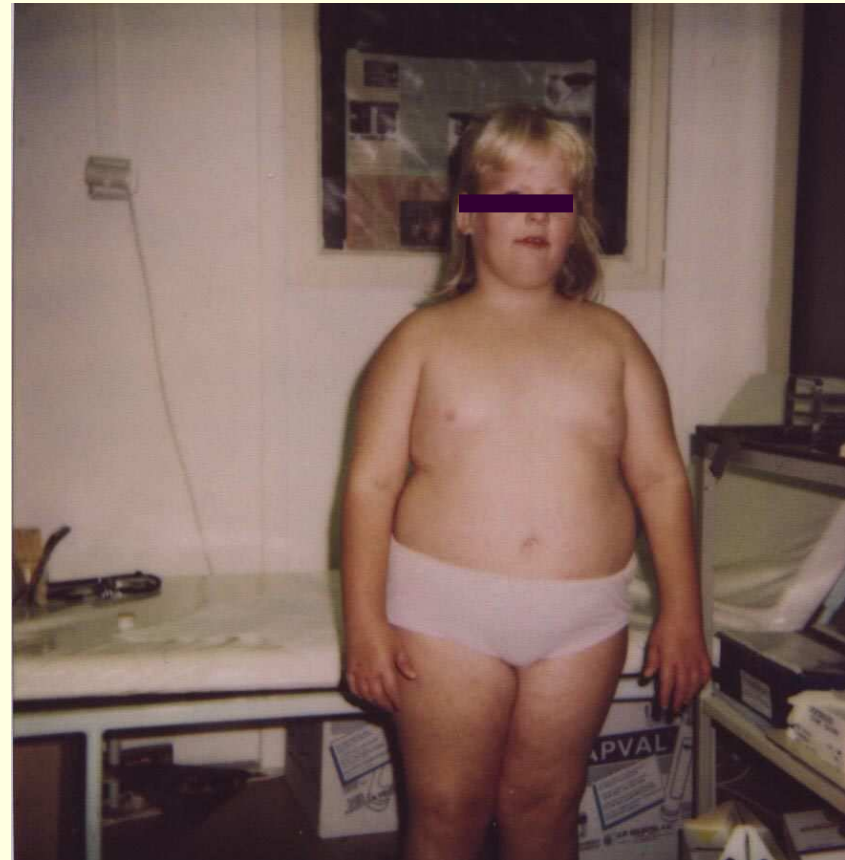


Klinická cytogenetika

Prader-Willy syndrom

Hlavní klinické příznaky:

- Snížená aktivita plodu
- Neprospívání kojenců
- Hypotonie novorozenců
- Obesita
- Hyperfagie, neukojitelný hlad
- Hypogonitalismus, hypogonadismus
- PMR
- Malá postava
- Akromikrie
- Hypopigmentace
- Problémy s chováním



Klinická cytogenetika

Angelman syndrom

Hlavní klinické příznaky:

- Vážná PMR
- Trhavé pohyby, špatná rovnováha
- Hyperaktivita
- Výbuchy smíchu , šťastná povaha
- Absence řeči
- Hypotonie
- Epilepsie
- Abnormální tvar lebky
- Hypopigmentace



Genetické příčiny vzniku PWS a AS

Prader-Williho syndrom

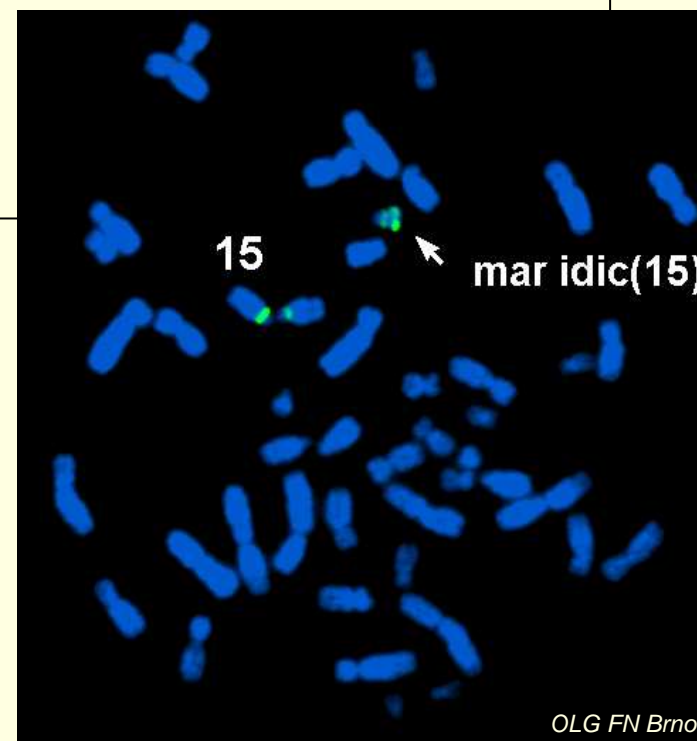
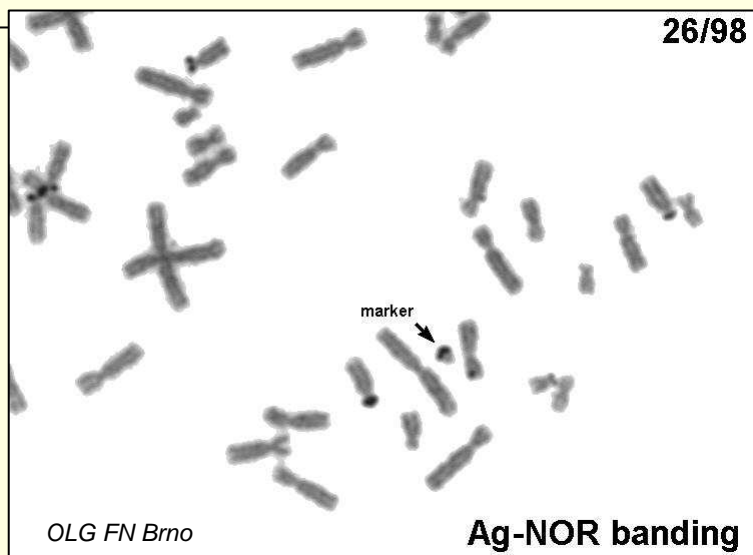
1. Delece na paternálním chromozómu 15 (70%)
2. Maternální uniparentální disomie chromozómu 15 (20 - 25%)
3. Změna imprintingu (2 - 4%)
4. Různé chromozomální přestavby (méně než 5%)

Angelmanův syndrom

1. Delece na maternálním chromozómu 15 (70%)
2. Paternální uniparentální disomie chromozómu 15 (4%)
3. Změna imprintingu (1%)
4. Různé chromozomální přestavby (2%)
5. Mutace v genu UBE 3A (3 - 5%)

Identifikace markerových chromozomů

- „supernumerary marker chromosome“, markerový chromozom či jen marker;
- je to malý nadbytečný chromozom, který není možno analyzovat cytogenetickými pruhovacími metodami;
- výskyt - 1/4000 u novorozenců, 1/2500 u amniocentéz;



Klinická cytogenetika

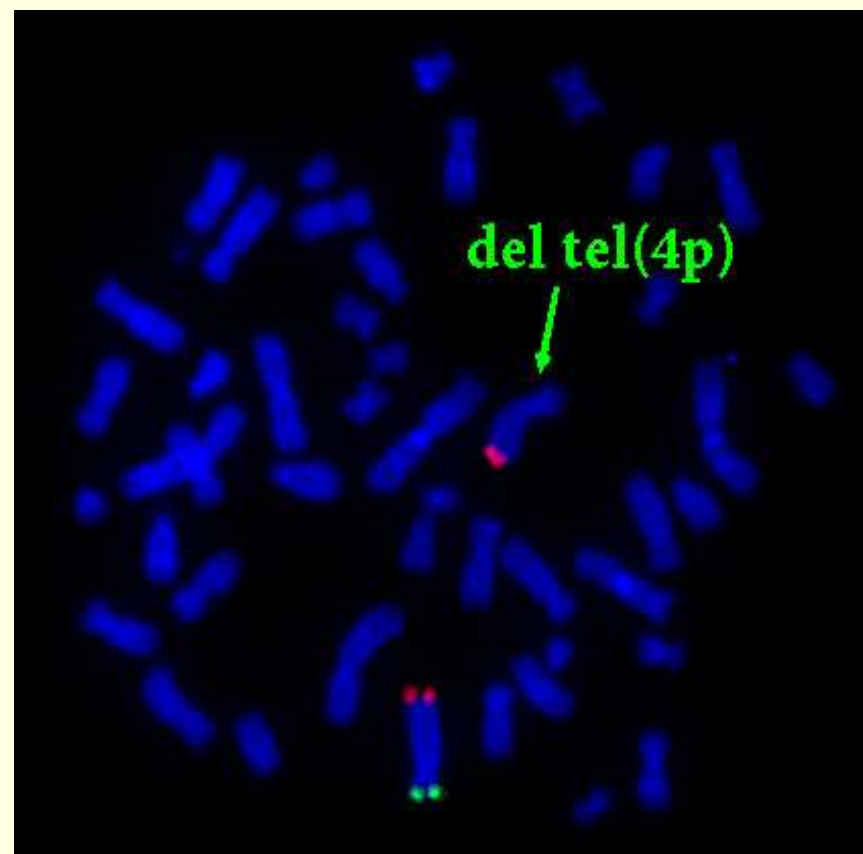
Základní charakteristika markerových chromozomů

- chromozom - nese funkční kinetochory, většinou se stabilně dědí;
- malý - velikost obvykle menší než chromozomy skupiny G;
- nadbytečný - výjimka jsou markery odvozené od gonozomů;
- nepřítomnost pruhového vzoru - nelze analyzovat běžnými cytogenetickými metodami;

Klinická cytogenetika

Delece subtelomerických oblastí

- Sub-microscopic (cryptic) telomeric rearrangements cannot be seen by conventional chromosome banding
- Cryptic rearrangements have been implicated in up to 6% of unexplained mental retardation
- Method exists for assaying all 41 unique telomeres (no p arm for 13, 14, 15, 21 and 22; Xp same as Yp) simultaneously on one slide



1. Spektrum molekulárně cytogenetických vyšetření

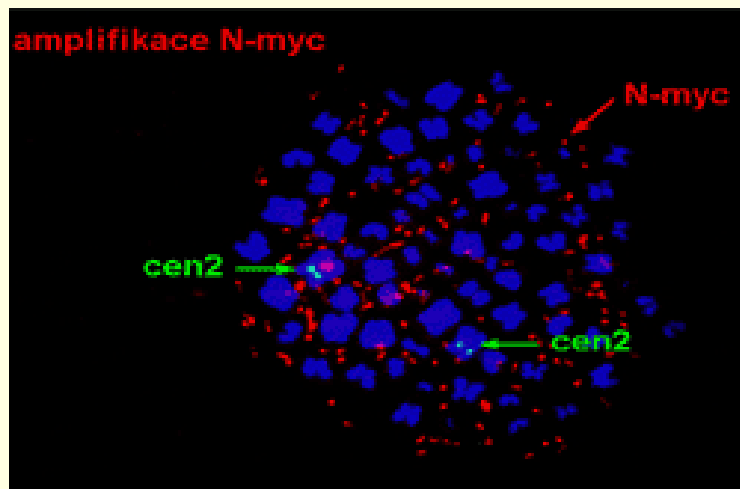
- Prenatální genetická diagnostika
- Klinická (postnatální) cytogenetika
- Onkogenetika

1. Spektrum molekulárně cytogenetických vyšetření

Onkogenetika

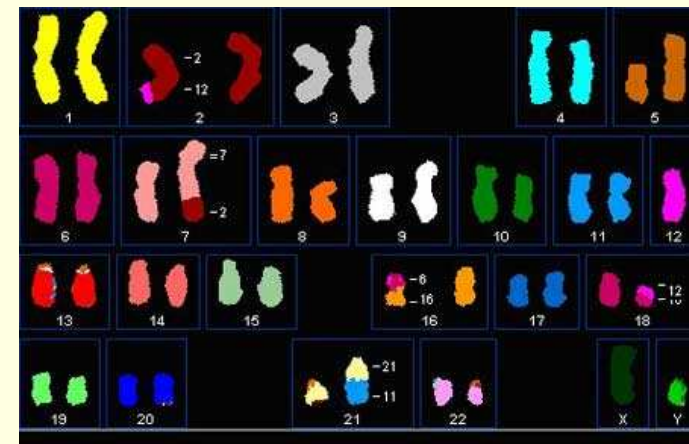
kultivované buňky KD, nátěry KD, otisky nádorů, DNA z KD a nádorů

- detekce prognosticky významných specifických CHA u některých hematologických malignit (AL, CL, MDS, lymfomy), u dětských solidních nádorů (NB, meduloblastom, Ewingův sarkom)
- FISH, CGH, SKY



Amplifikace N-myc onkogenu

OLG FN Brno



OLG FN Brno

Komplexní karyotyp pomocí SKY

Cytogenetická vyšetření v onkologii

- nedílná součást všech onkohematologických vyšetření
- cytogenetické a molekulárně genetické metody používané v onkohematologii jsou součástí diagnostiky a léčby těchto malignit ve smyslu:
 - upřesnění diagnózy
 - stanovení léčebné strategie
 - monitorování léčby
 - sledování reziduální choroby po transplantaci
 - předpověď pravděpodobného vývoje onemocnění
 - lokalizování protoonkogenů a tumorsupresorových genů

Chromozomové změny u nádorů – rozdělení I.

- **ztráta** genetického materiálu
(delece, monozomie)
- **zmnožení** genetického materiálu
(duplikace, amplifikace, trizomie, polyploidie)
- **přemístění** bez ztráty materiálu
(translokace, inverze, inzerce)

Onkogenetika

Chromozomové aberace u nádorů – rozdělení II.

primární základní při vzniku nádorů, jediná změna, spouští mnohastupňový proces karcinogeneze

sekundární objevují se v průběhu onemocnění, obraz stadia choroby, výraz progresu tumoru, prognostický faktor progresu onemocnění

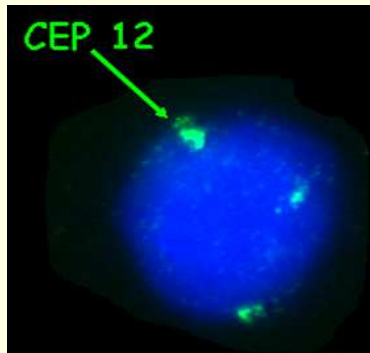
specifické pravidelně u určitého typu nádoru, představují specifický nádorový marker, v místech zlomu byly identifikovány geny, které jsou zúčastněné v nádorovém procesu

náhodné vyskytují se náhodně, postihují různé chromozomy

Onkogenetika

Typy CHA

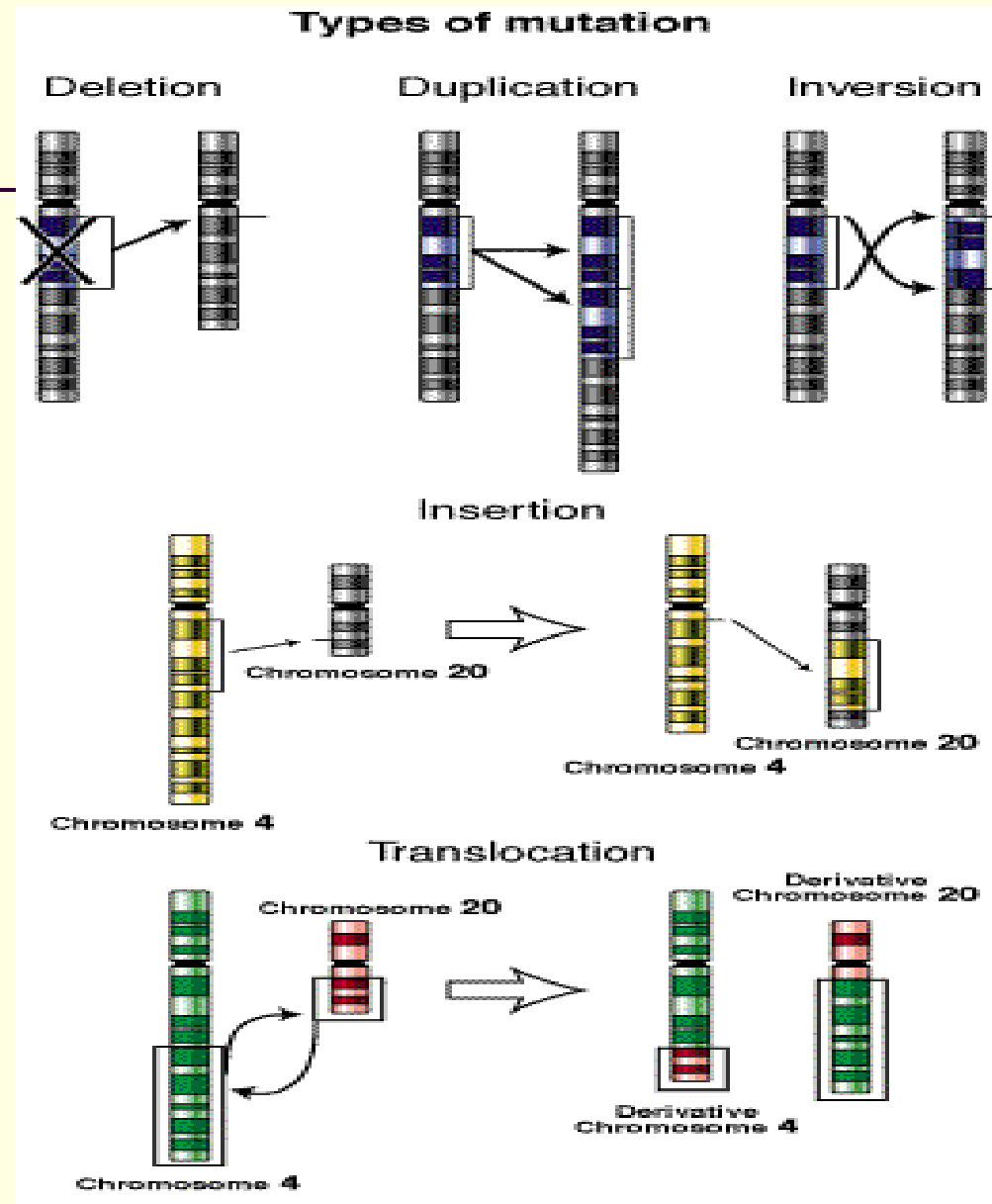
Početní (numerické)



OLG FN Brno

Strukturní:

- AMPLIFIKACE
- DELECE
- DUPLIKACE
- INVERZE
- INZERCE
- TRANSLOKACE
- INVERZE



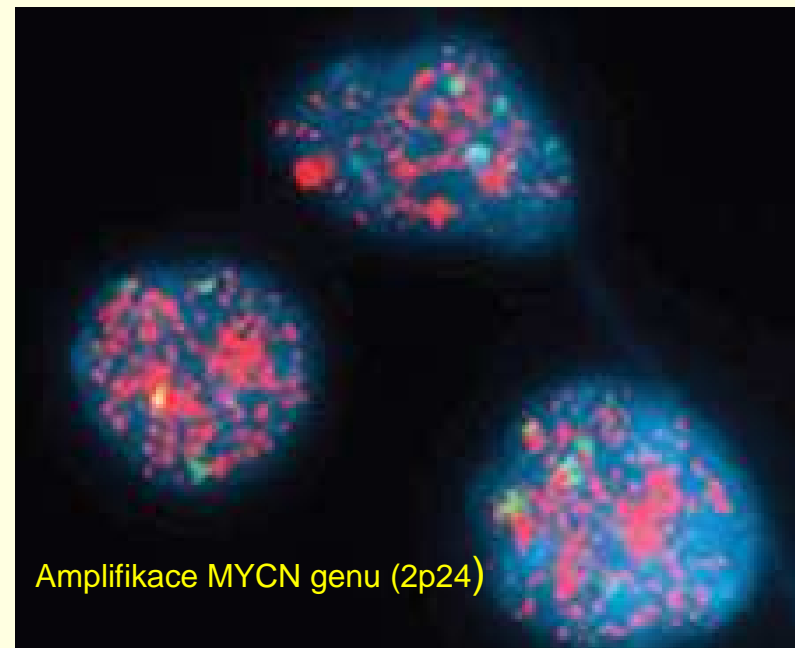
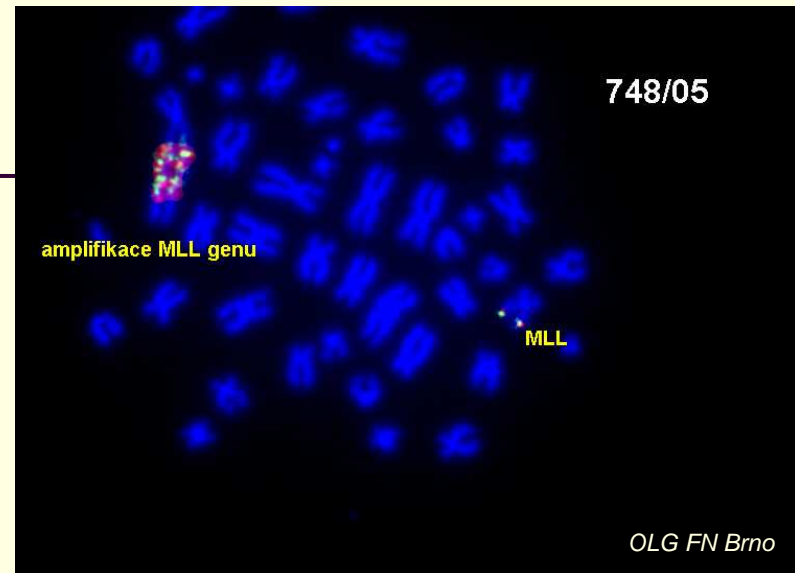
Početní CHA u nádorů

- aneuploidie x polyploidie
- hyperdiploidie (více než 46 chromozomů) – často lepší prognóza (ALL, mnohočetný myelom)
- hypodiploidie – méně než 46 chromozomů – horší prognóza (mnohočetný myelom)

Onkogenetika

Strukturní CHA: Amplifikace

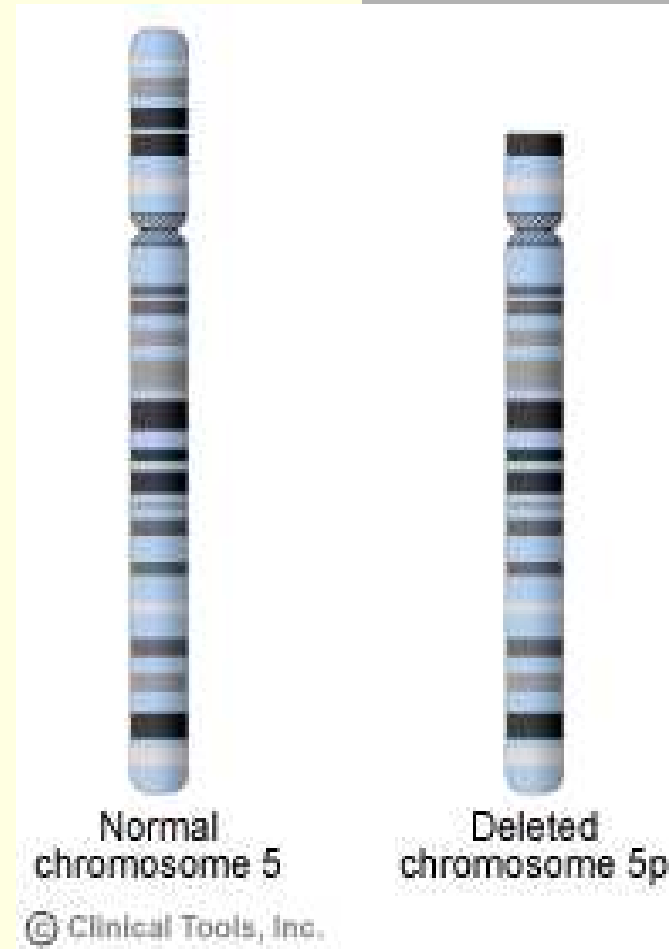
- časté u solidních nádorů ale i u leukémií
- většinou zmnožení proto-onkogenů
- double minutes (d-min)
- vyšetření pomocí FISH, počet signálů v buňce
- vyšetření přítomnosti amplifikace má klinický a terapeutický význam



Onkogenetika

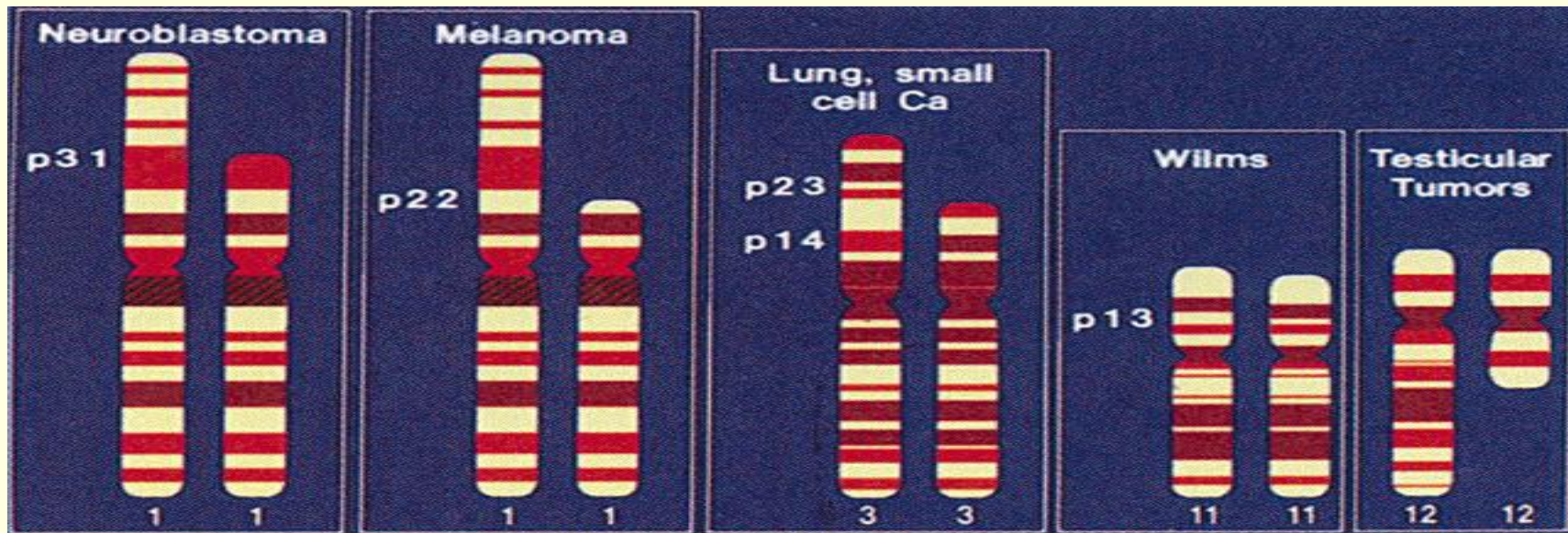
Strukturní CHA : Delece

- ztráta části chromozomu, často postiženy nádorové-supresorové geny nebo geny pro stimulační a růstové faktory
- LOH-ztráta heterozygotnosti v důsledku delece genu
- u hematologických malignit specifické změny



Onkogenetika

Ztráta části chromozomu je častou příčinou různých typů solidních nádorů - příklady delecí



neuroblastom

melanom

plicní karcinom

Wilmsův
tumor

testikulární
tumor

Příklady delecí

del 5q

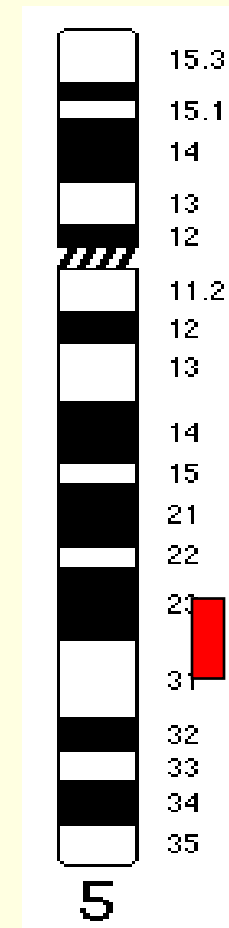
- u AML a MDS, delece je intersticiální, rozsah velmi variabilní, vždy je postižen pruh 5q31-kritická oblast, v oblasti zmapováno více genů řídících normální hemopoézu, předpokládá se přítomnost nádorového- supresorového genu

del 11q23

- u AML a ALL, v oblasti 11q23 mapován MLL gen, mimo delecí zúčastněn v početných translokacích (6q27, 9p21, 10p15, 17q11, 19p13)

monozomie

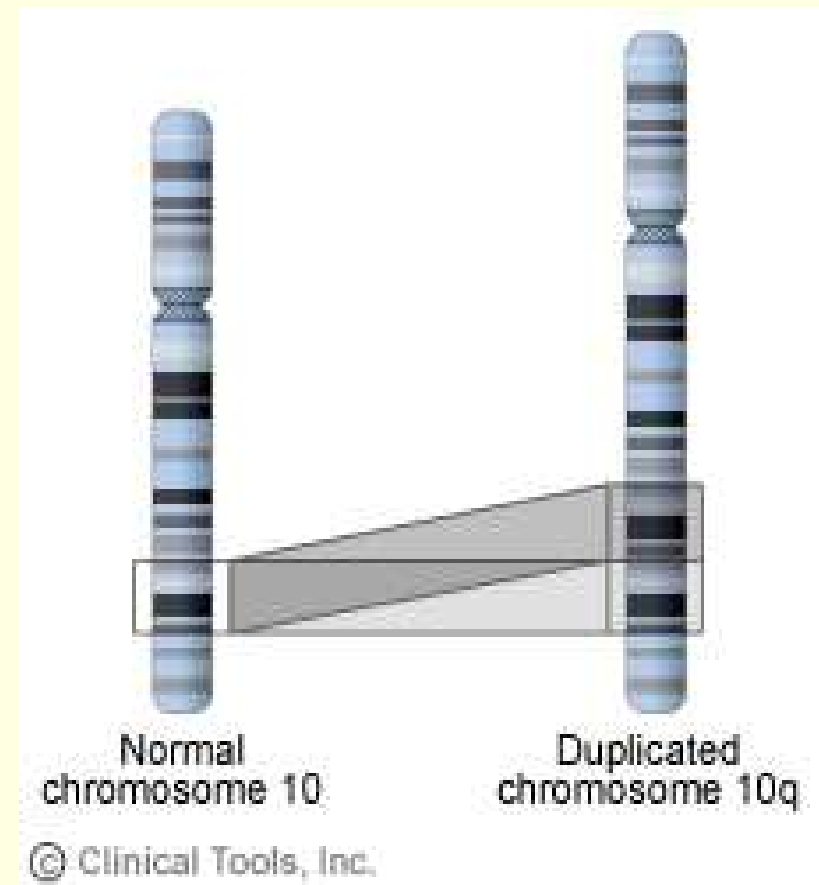
- ztráta celých chromozomů, změny jsou spíše sekundární, častá monozomie 5, 7 u MDS



Onkogenetika

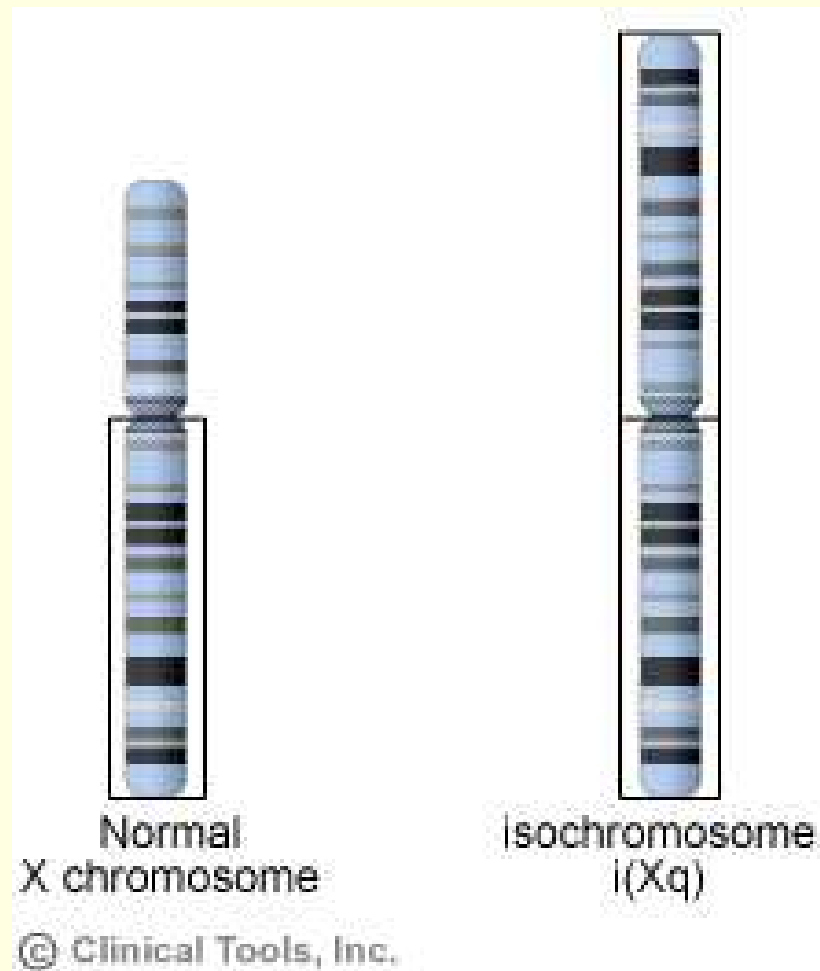
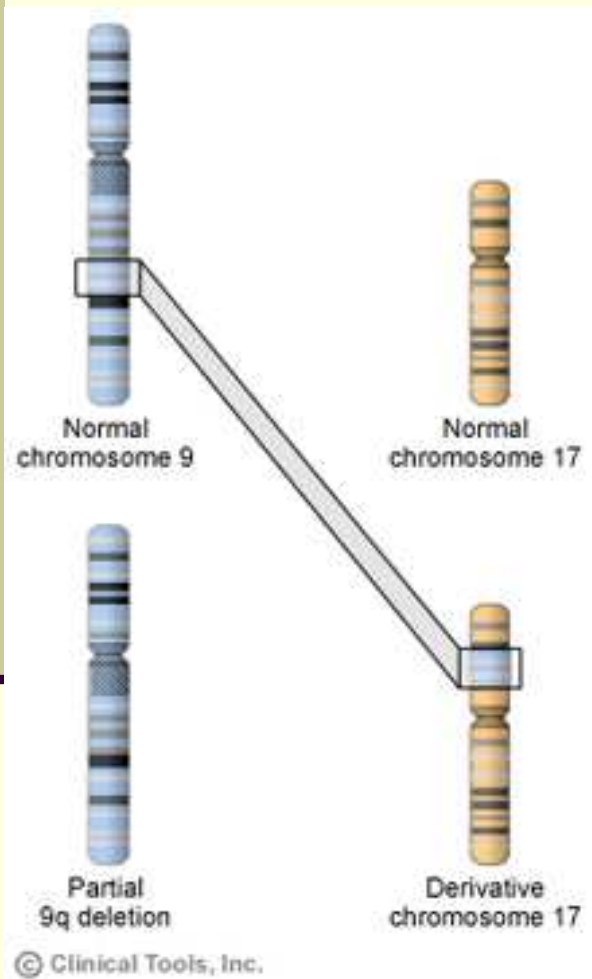
Strukturní CHA : Duplikace

- celé chromozomy nebo jejich části
- časté sekundární změny v nádorových buňkách
- zmnožení genové dávky
- Stav a progrese nádorového onemocnění
- u leukémií časté +8, u CLL specifická +12, další Ph



Onkogenetika

Strukturní CHA : Inserce a Izochromozom



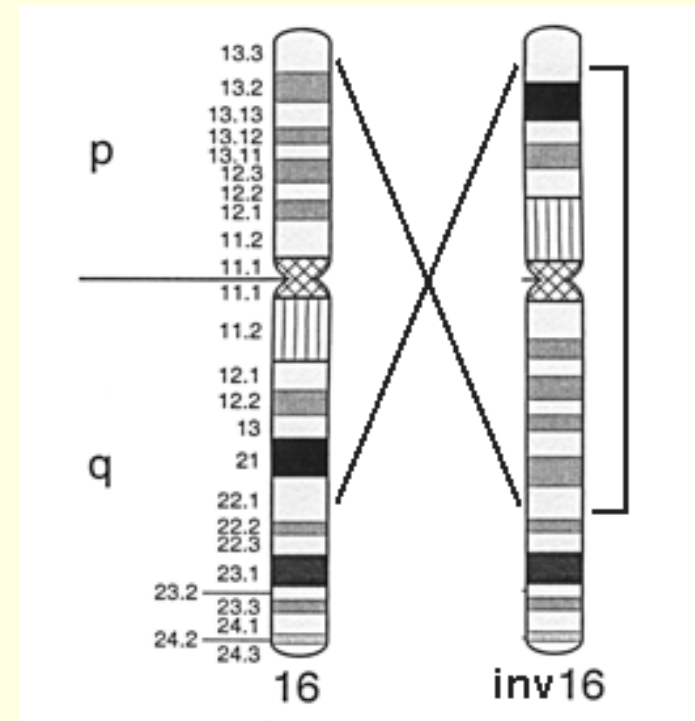
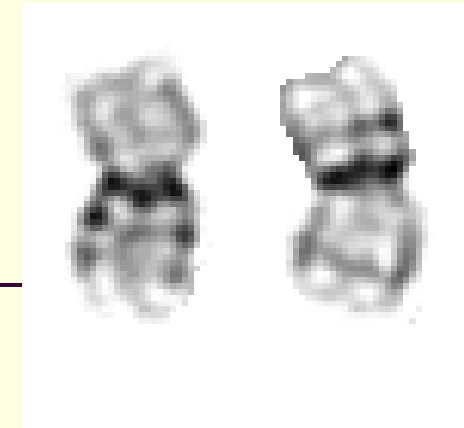
Onkogenetika

Strukturní CHA : Inverze

AML-M4eo

inv(16), t(16;16)

- fúzní gen CBF/MYH11
- asi 50% má přídatné změny 7q-, +8, +21
- spojená s dobrou prognózou
- detekce FISH pomocí specifické sondy



Onkogenetika

Translokace : Důsledky jednotlivých chromozómových aberací v procesu karcinogeneze

- v místech zlomů identifikovány geny přímo zúčastněné v nádorovém procesu

dva principiální důsledky translokací a inverzí:

- místo zlomu uvnitř genů na každém chromozomu, přeskupením se vytvoří fúzní gen, kódující chimérický protein, zapojený do maligního procesu
- deregulace exprese genu (aktivace protoonkogenu) translokací do oblasti silného promotoru (gen pro T-cell receptor nebo imunoglobulinový protein)

Onkogenetika

Důsledky chromozómových aberací v procesu karcinogeneze;

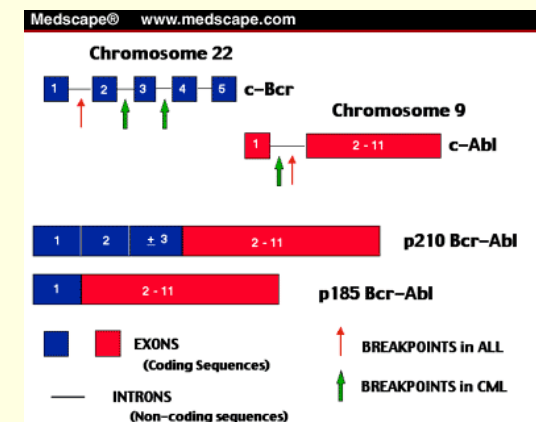
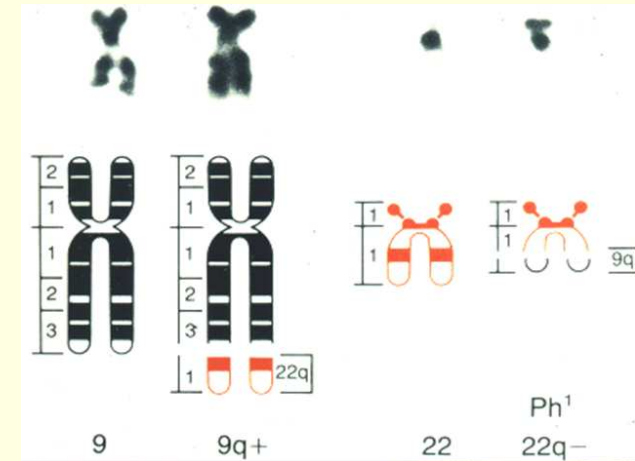
Translokace spojené se vznikem **chimerického proteinu**

t(9;22)

- u CML, vzniká Ph chromozom
- na chromozomu 9q34 je lokalizován buněčný protoonkogen **ABL**, na chromozómu 22q11 **BCR** gen, při translokaci vzájemná výměna částí obou chromozomů
- na chromozomu 22 se vytvoří fúzní gen **BCR/ABL**, který kóduje hybridní protein p210, který je iniciátorem maligního procesu

t(15;17)

- AML M3, fúzní protein **PML/RARA** je pravděpodobně cílovým proteinem při terapii trans retinovou kyselinou,
- přímý vztah léčby genetického defektu a maligního onemocnění



+ (9;22)

abl

bcr/abl

bcr

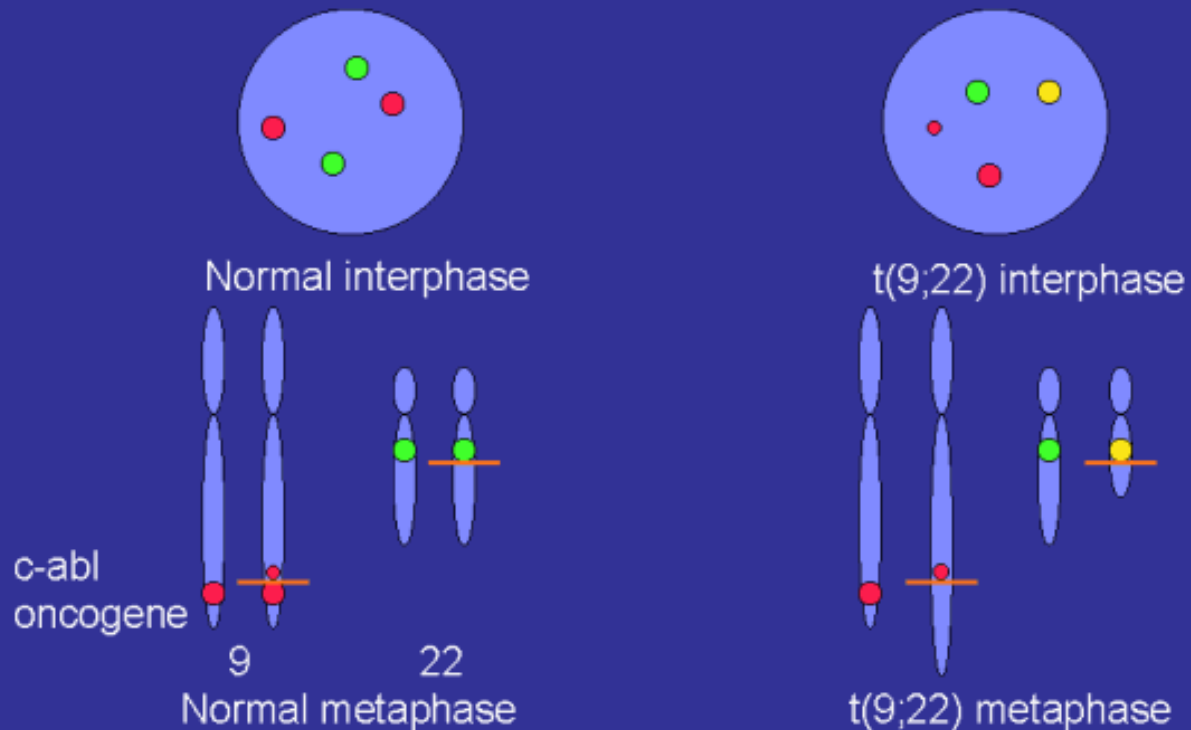
abl

Philadelphský chromozóm

translokace BCR/ABL (9q34/22q11.2)

Two colour (ES) FISH for CML

Larger probe – spanning the breakpoint



Onkogenetika

Důsledky chromozómových aberací v procesu karcinogeneze;

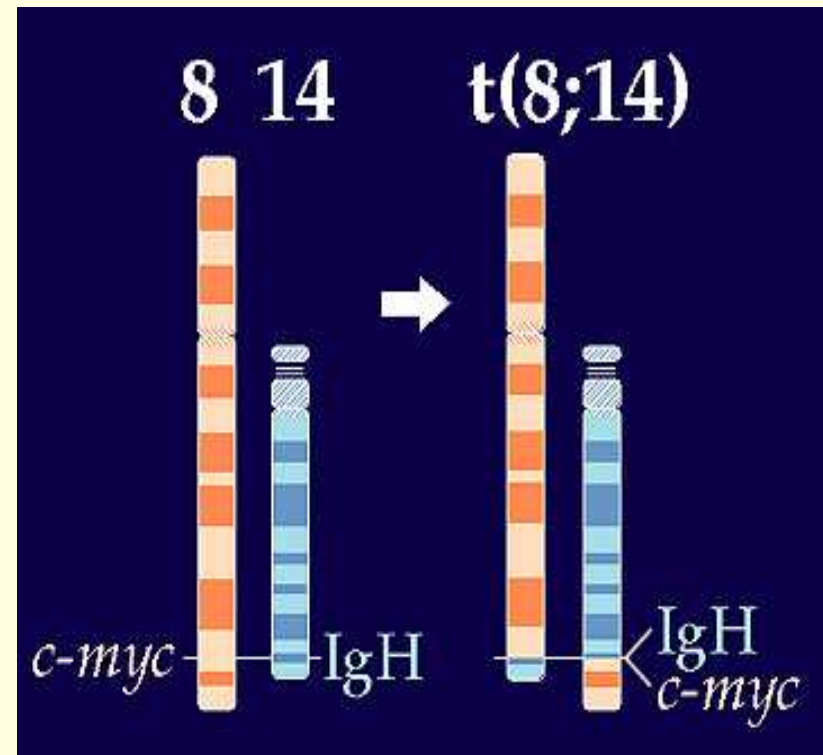
Translokace spojené s **aktivací protoonkogenů**

t(8;14)

- u ALL a lymfomů
- c-MYC onkogen z 8q24 přesunut do oblasti genu pro těžký řetězec imunoglobulinu na 14q32
- přemístěním dochází k deregulaci exprese c-MYC protoonkogenu
- deregulace spouští proces karcinogeneze

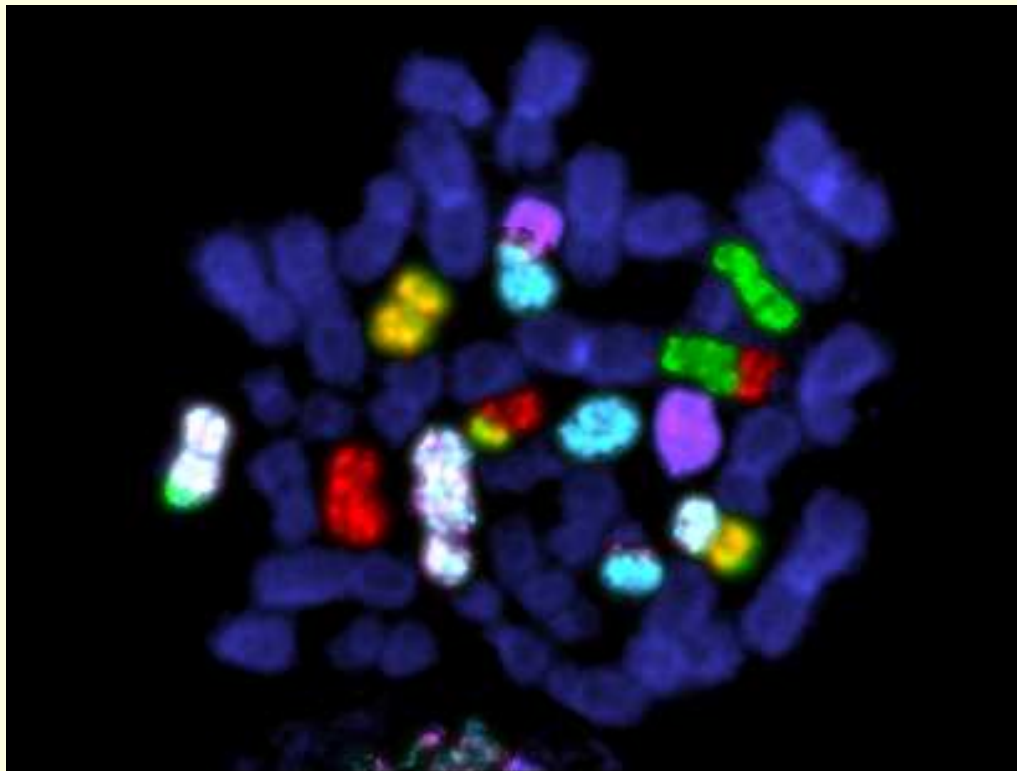
t(2;8), t(8;22)

variantní translokace s místem zlomu v c-MYC genu



Komplexní aberace

Komplexní karyotyp – detegujeme numerické či početní změny zahrnující tři a více chromozomů nebo strukturní změny, při kterých dochází ke třem a více zlomům



Doporučená literatura

Snustad, Peter, D.: Genetika, Masarykova Univerzita, 2009

Kuglík, Petr : Základy molekulární cytogenetiky člověka; elektronická skripta,
<http://www.sci.muni.cz/UEB/OGMB/Cytogenlab.html>

Thompson & Thompson : Klinická genetika, Praha : Triton, 2004

**Děkuji za
pozornost**

