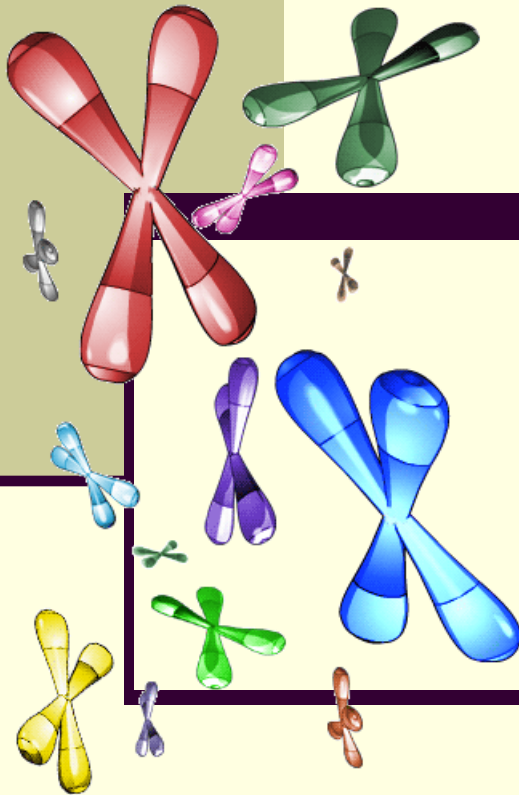


# Metody molekulární cytogenetiky

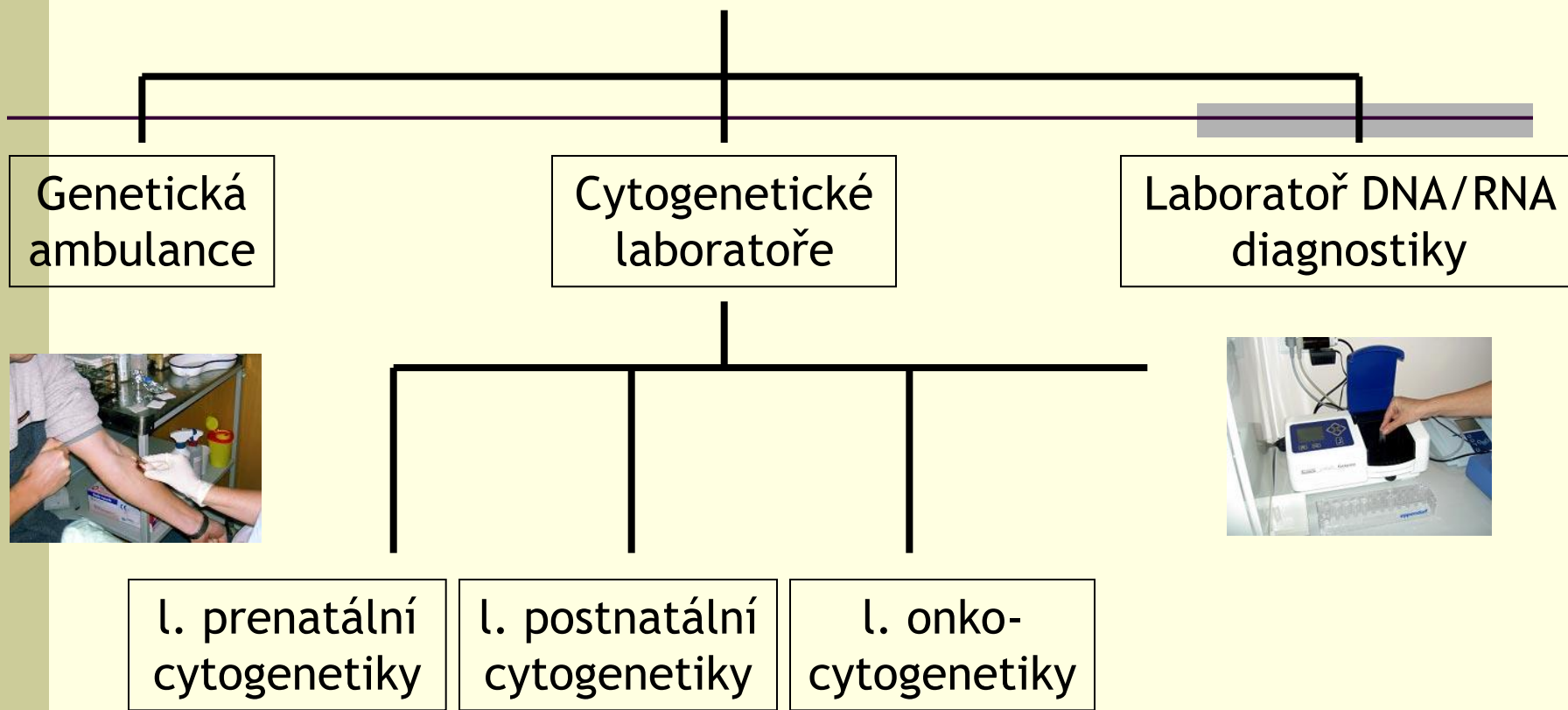


Hana Filková

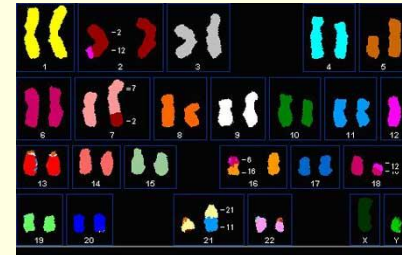
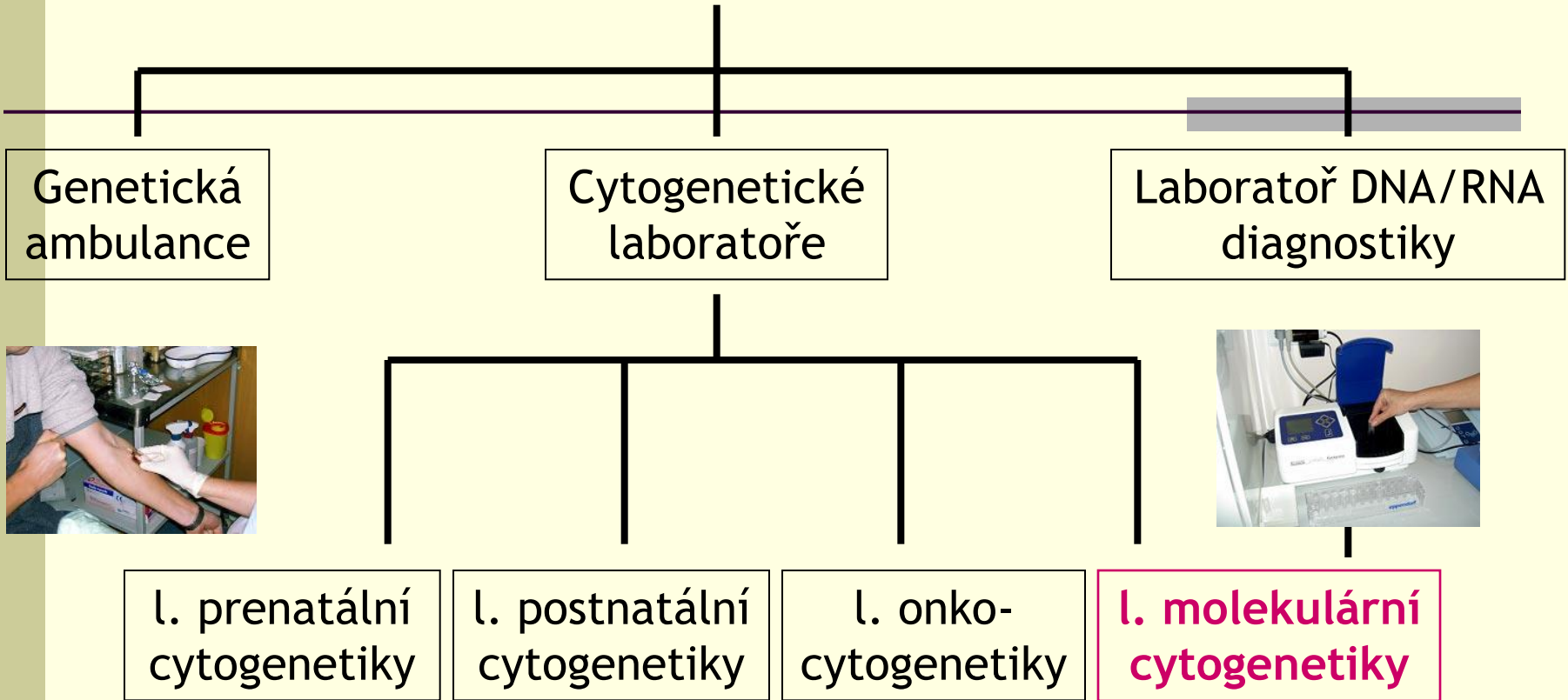
Oddělení lékařské genetiky  
FN Brno



# Oddělení lékařské genetiky FN Brno



# Oddělení lékařské genetiky FN Brno



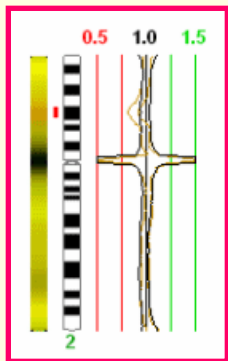
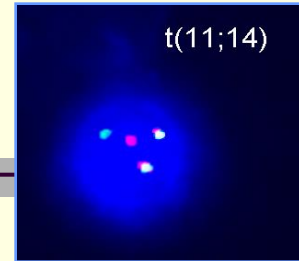
# Materiál pro cytogenetické vyšetření

---

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

# Metody využívané na OLG FN Brno

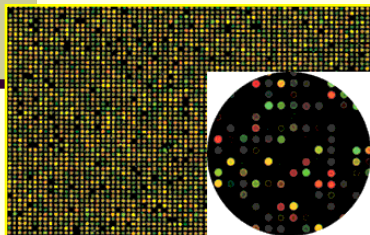
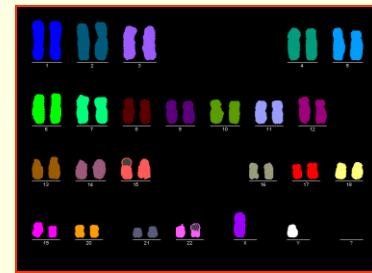
**FISH** (fluorescenční in situ hybridizace) r. 1996  
detekce balancovaných i nebalancovaných změn



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 mitóz

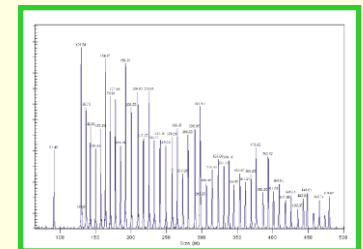


**Array-CGH** r.2008

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

**MLPA** (Multiple Ligation-dependent Probe Amplification)

Screening subtelomerových oblastí  
DiGeorge syndrom



# FISH = fluorescenční *in situ* hybridizace

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

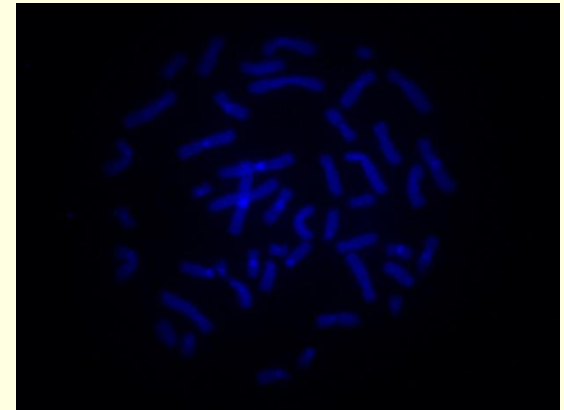
- 1969 Parduvová a Gall - radioaktivní značení
- 1986 Pinkel a spol. - fluorescenční značení (FISH)

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

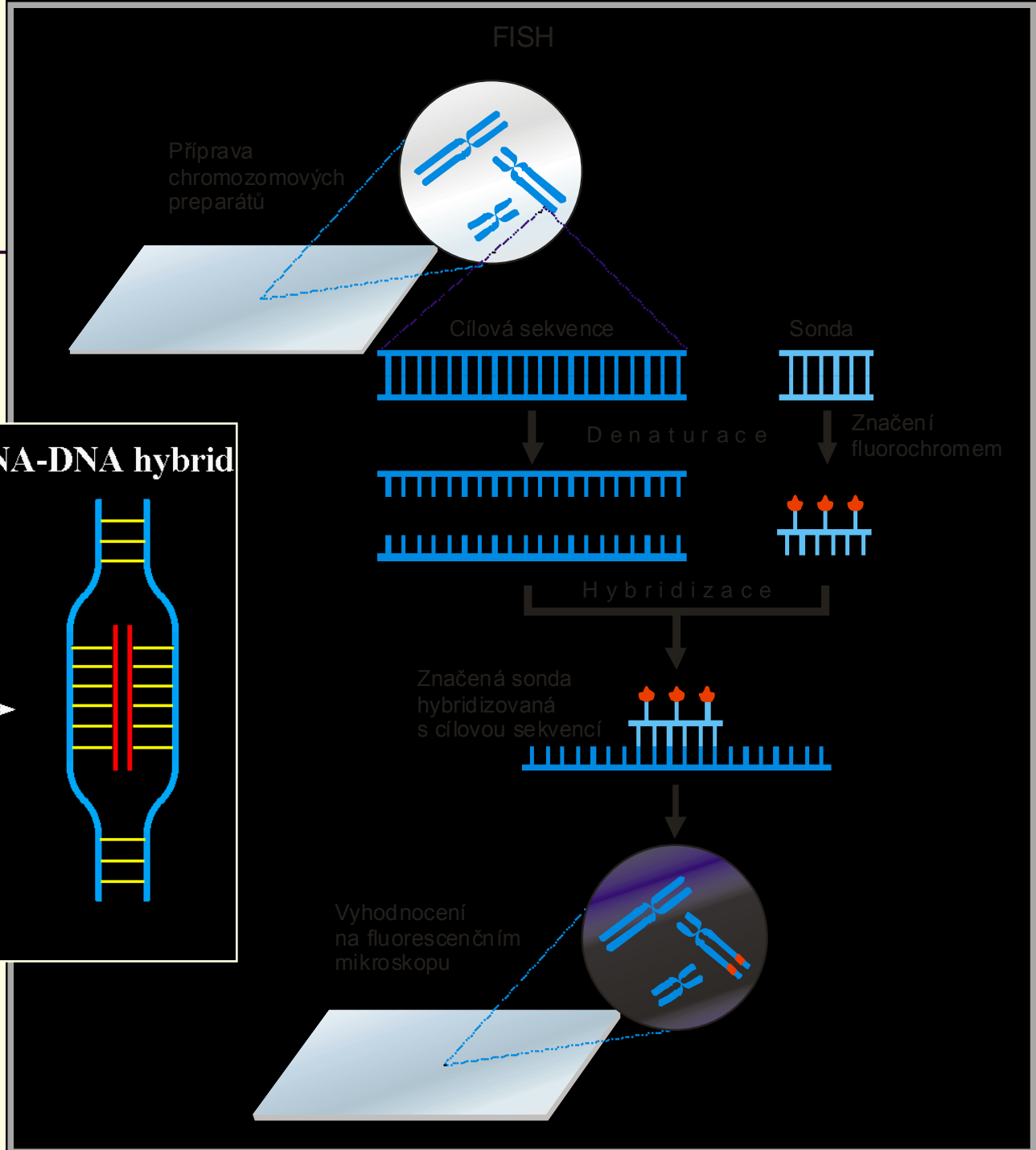
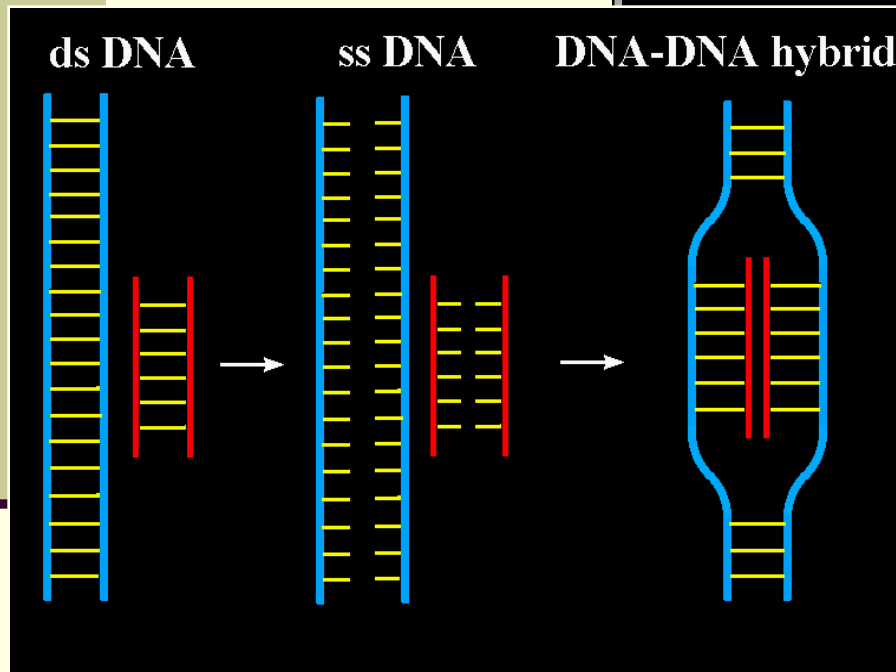
## Postup FISH

Zhotovení kvalitních preparátů

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



# FISH



# FISH : Typy sond

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

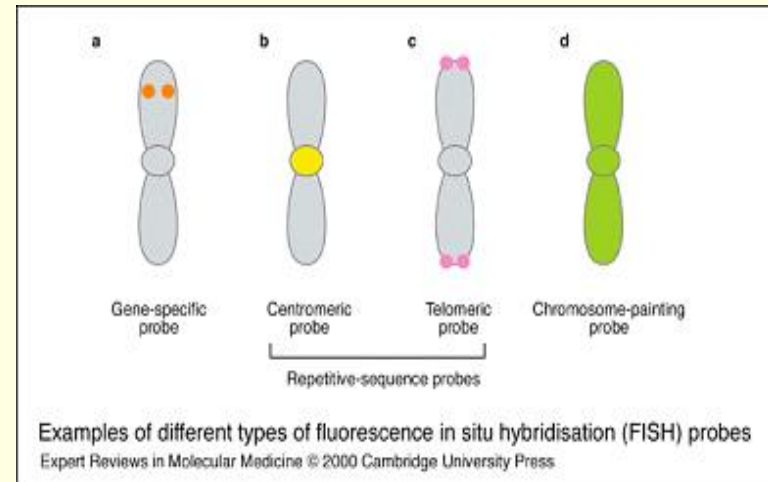
- Sondy pro jedinečné sekvence:

a) plazmidové (500pb-5 kb)

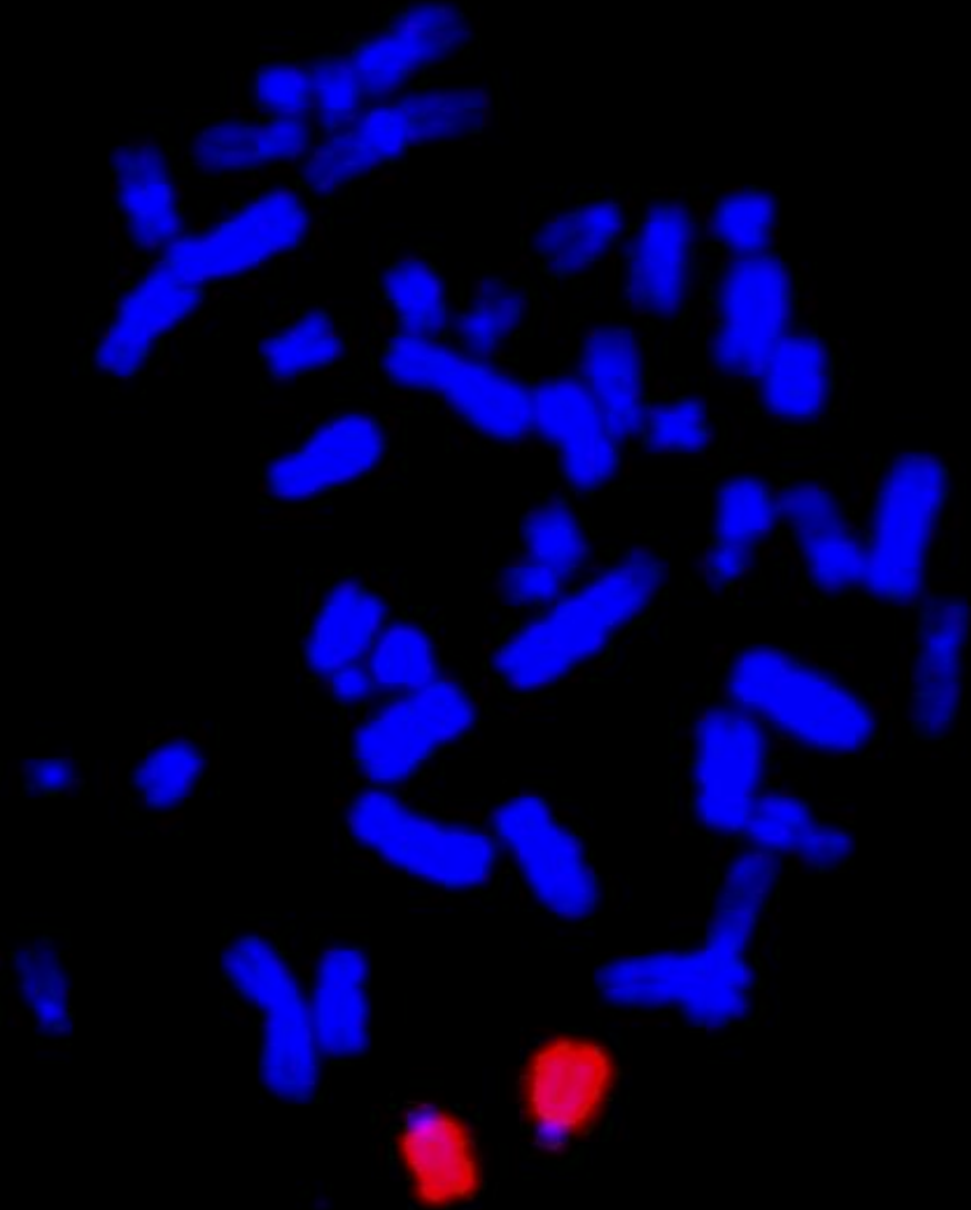
b) kosmidové (20-50 kb)

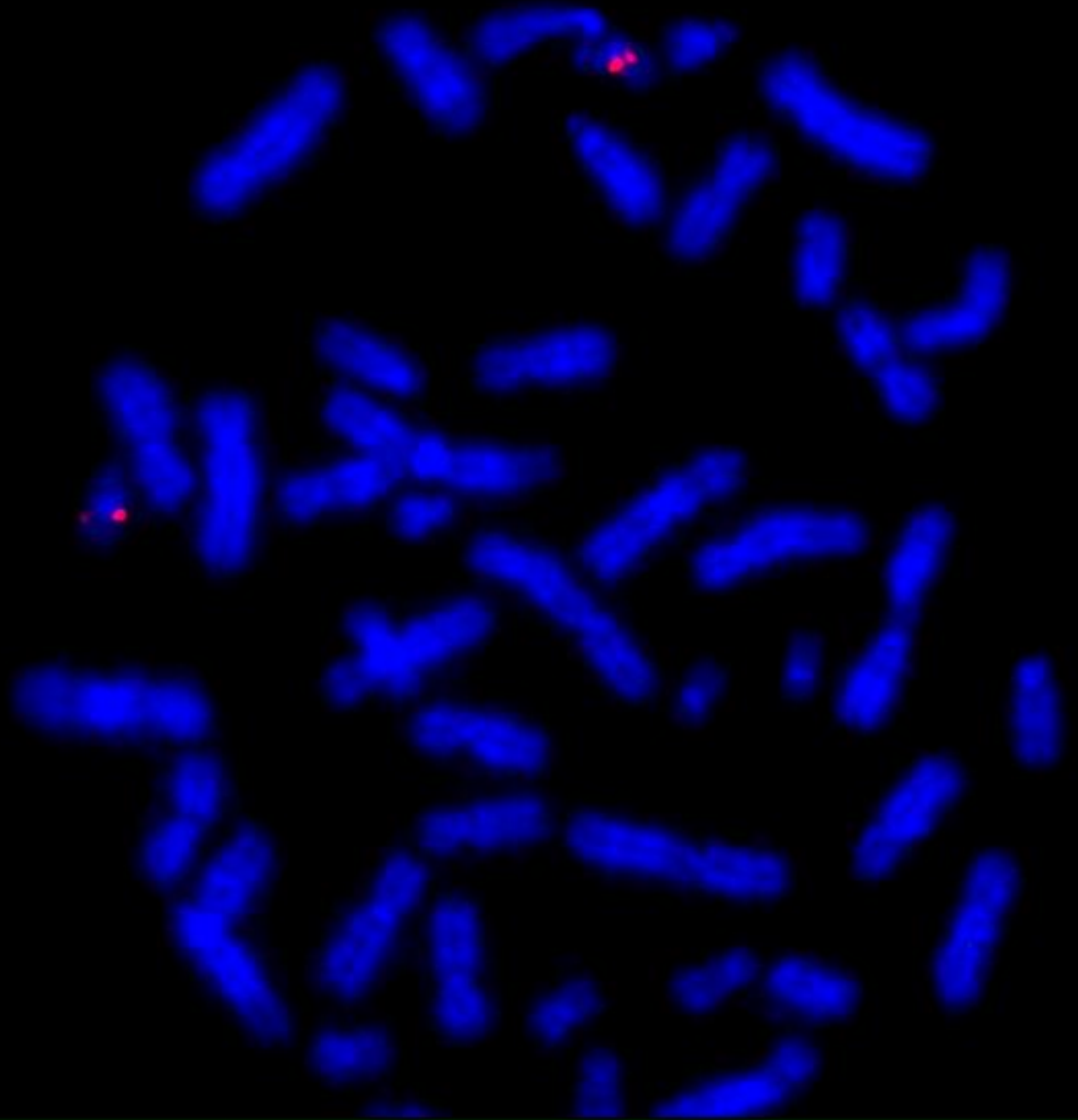
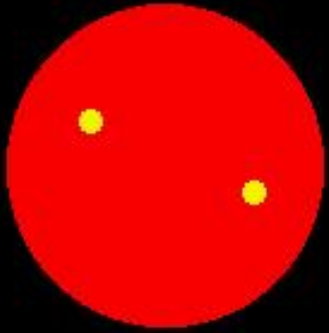
c) bakteriofág lambda (8-15 kb)

d) YAC klony (50-1000 kb)

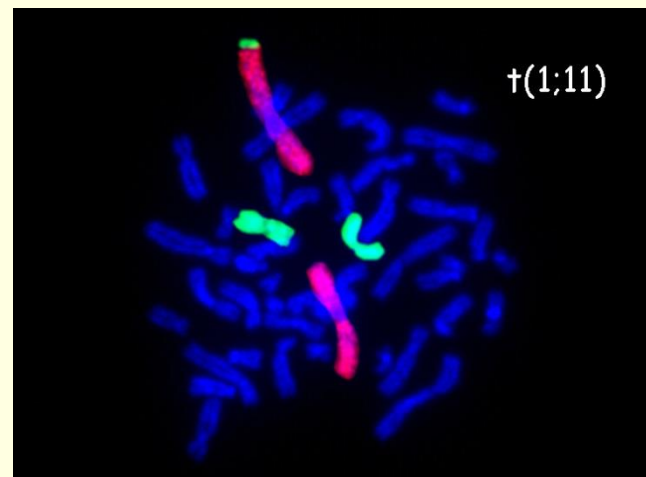
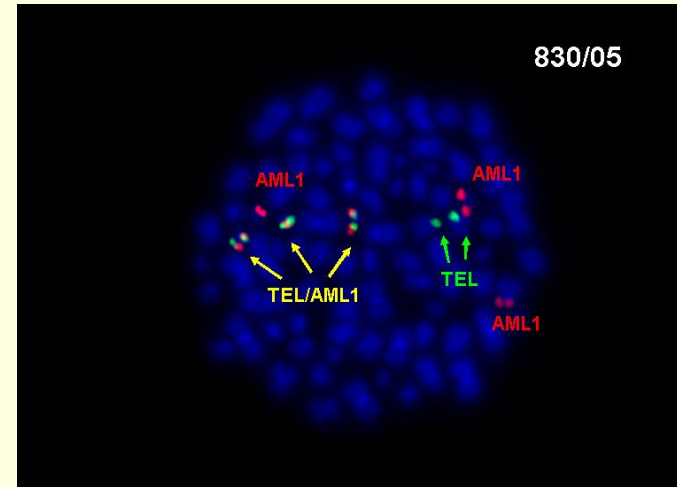
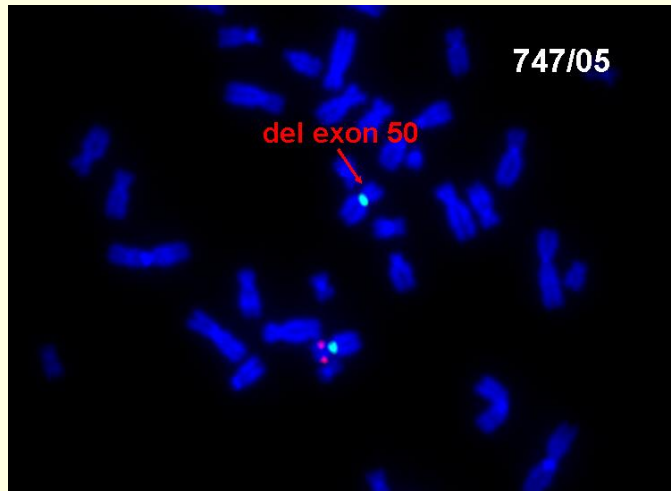








# Přítomnost, počet a poloha signálů

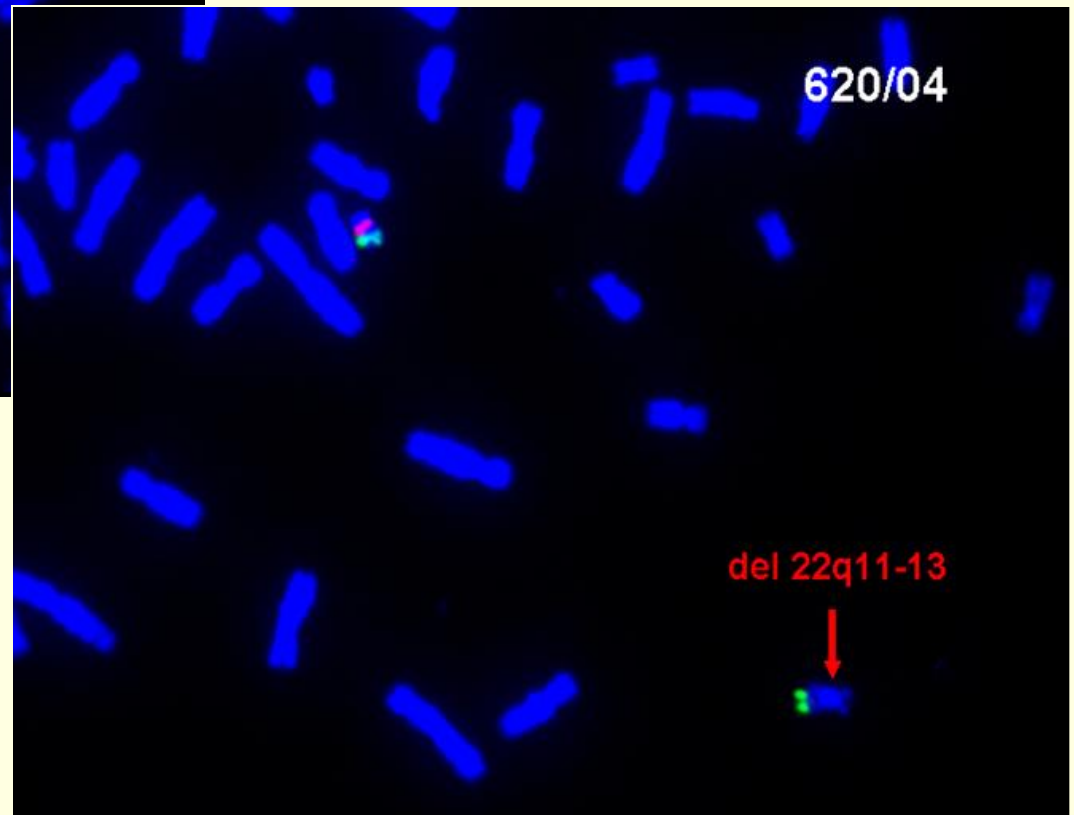
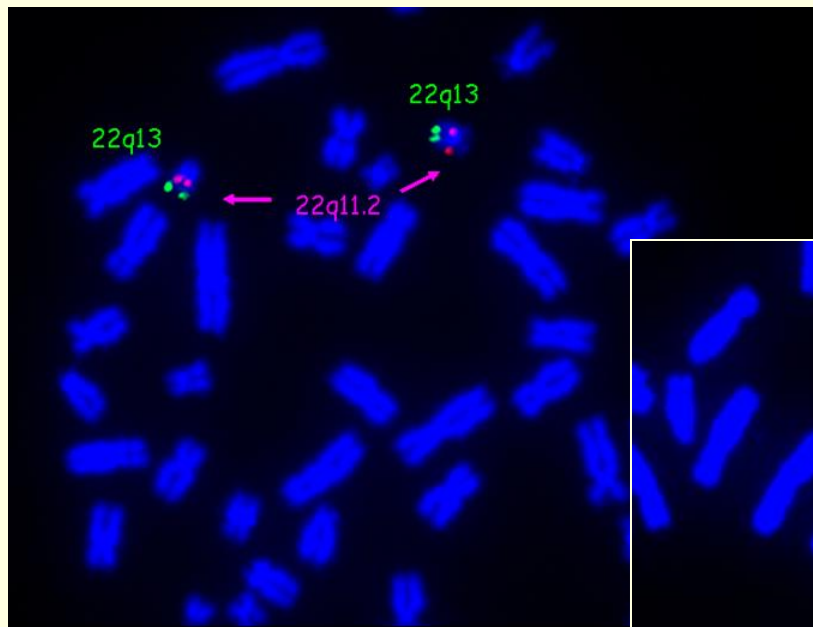


# FISH - využití techniky fluorescenční *in situ* hybridizace

---

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

# Využití FISH: detekce mikrodelačních syndromů – např. del 22q11 (DiGeorge syndrom)



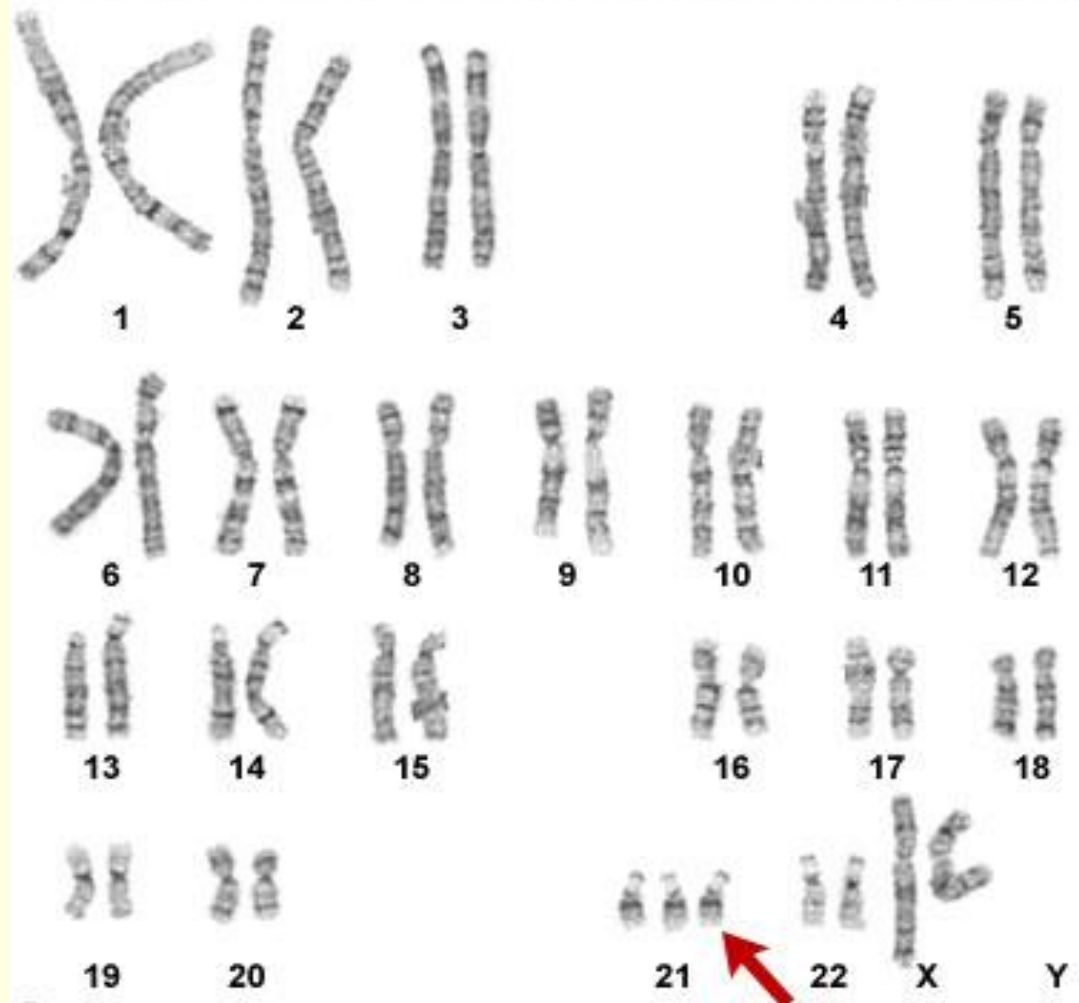
- SRDEČNÍ VADY
- ANOMÁLIE TVÁŘE
- PORUCHY IMUNITY

# Využití FISH: detekce numerických změn

## Downův syndrom



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

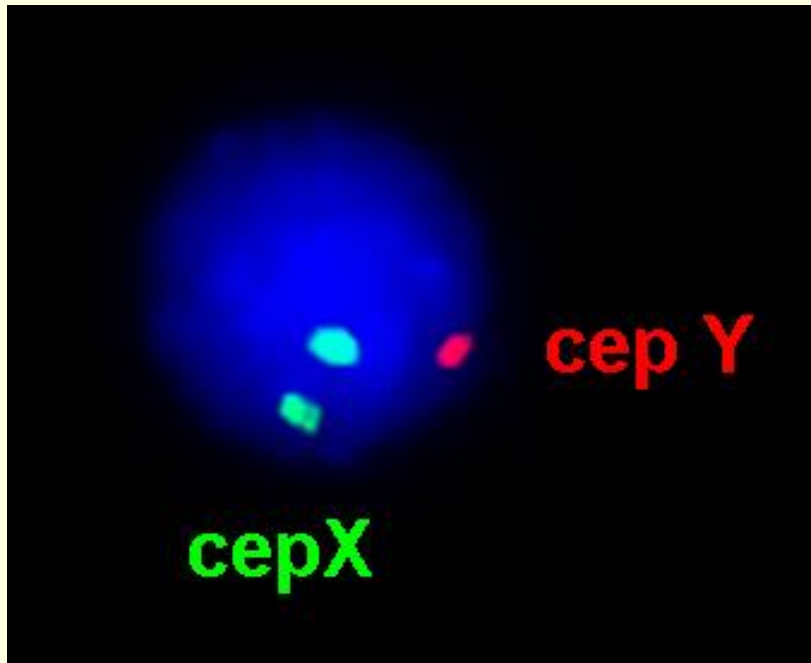
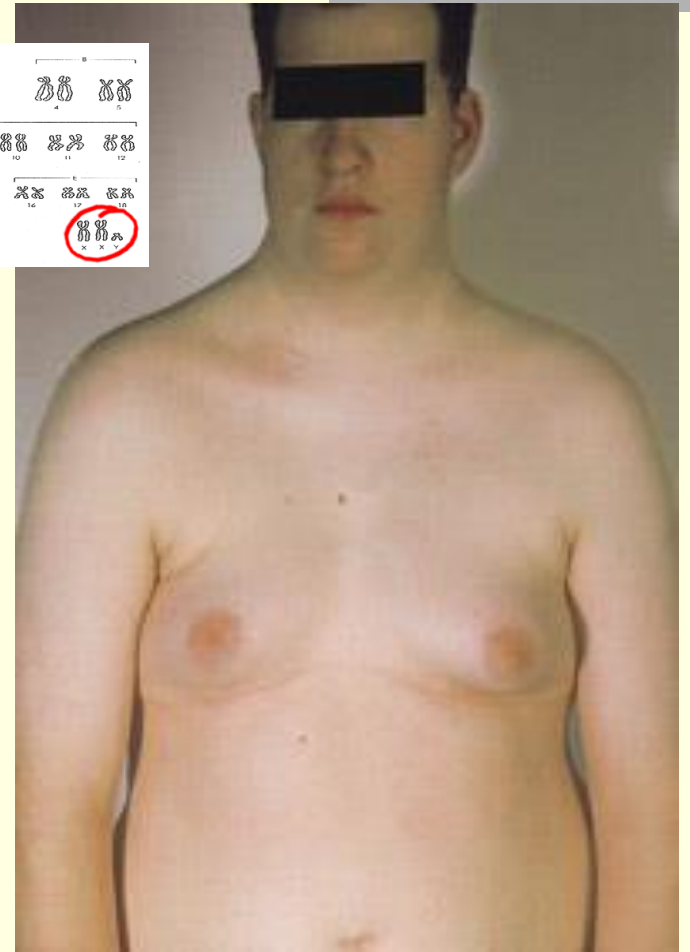
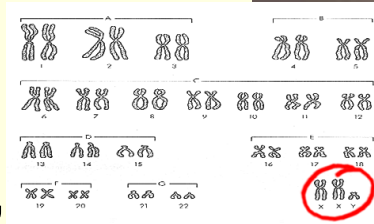




# Využití FISH: detekce numerických změn

## Klinefelterův syndrom

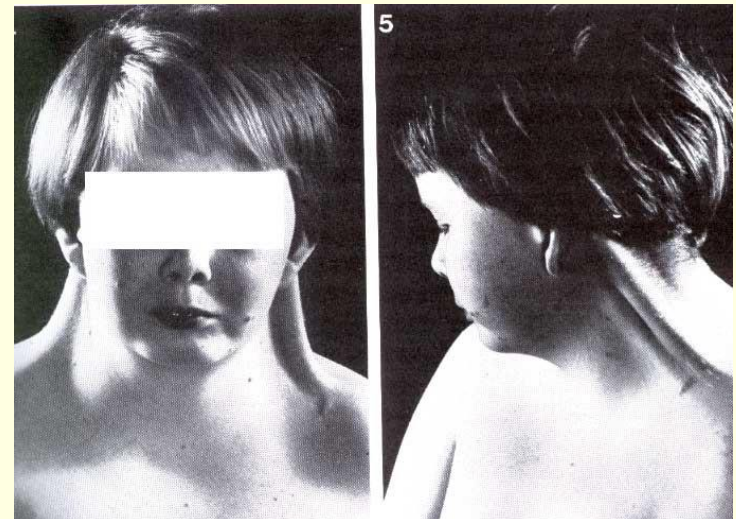
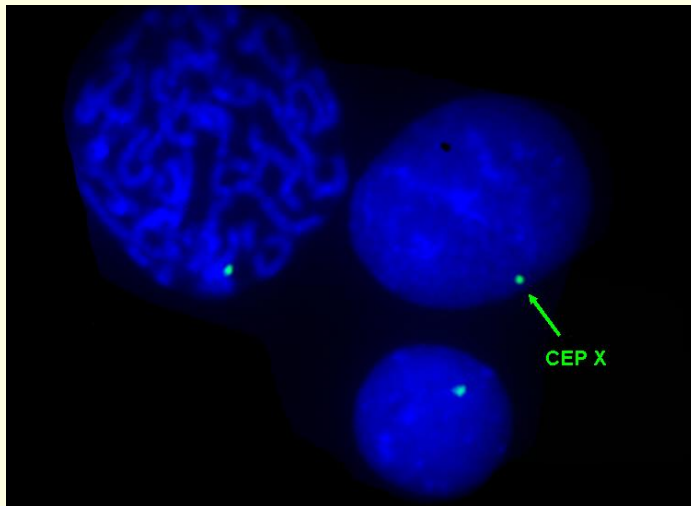
- **47,XXY**
- vysoká postava,  
porucha růstu vousů,  
ženská distribuce  
podkožního tuku, PMR



# Využití FISH: detekce numerických změn

## Turnerův syndrom

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

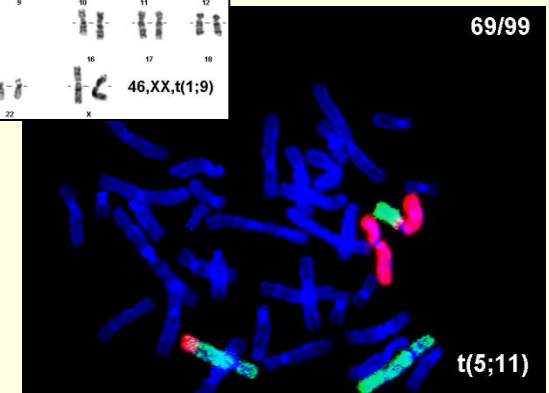
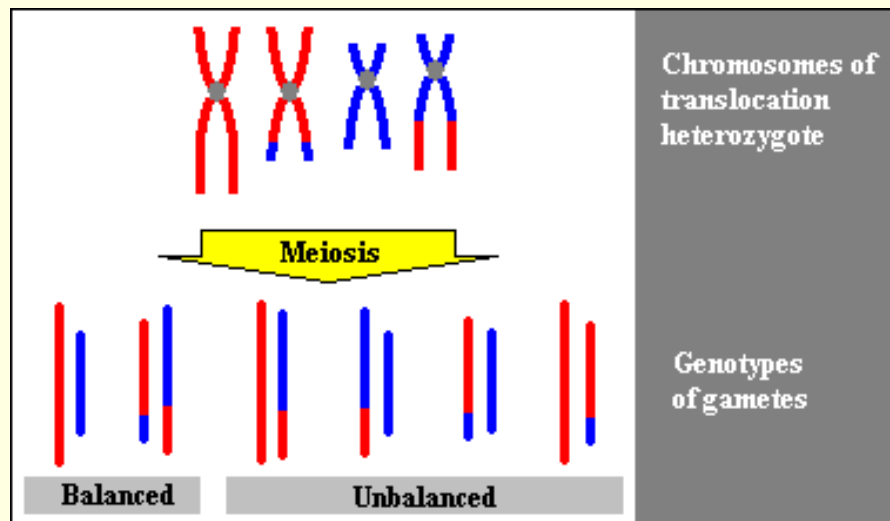




# Využití FISH: detekce strukturních změn

## 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)

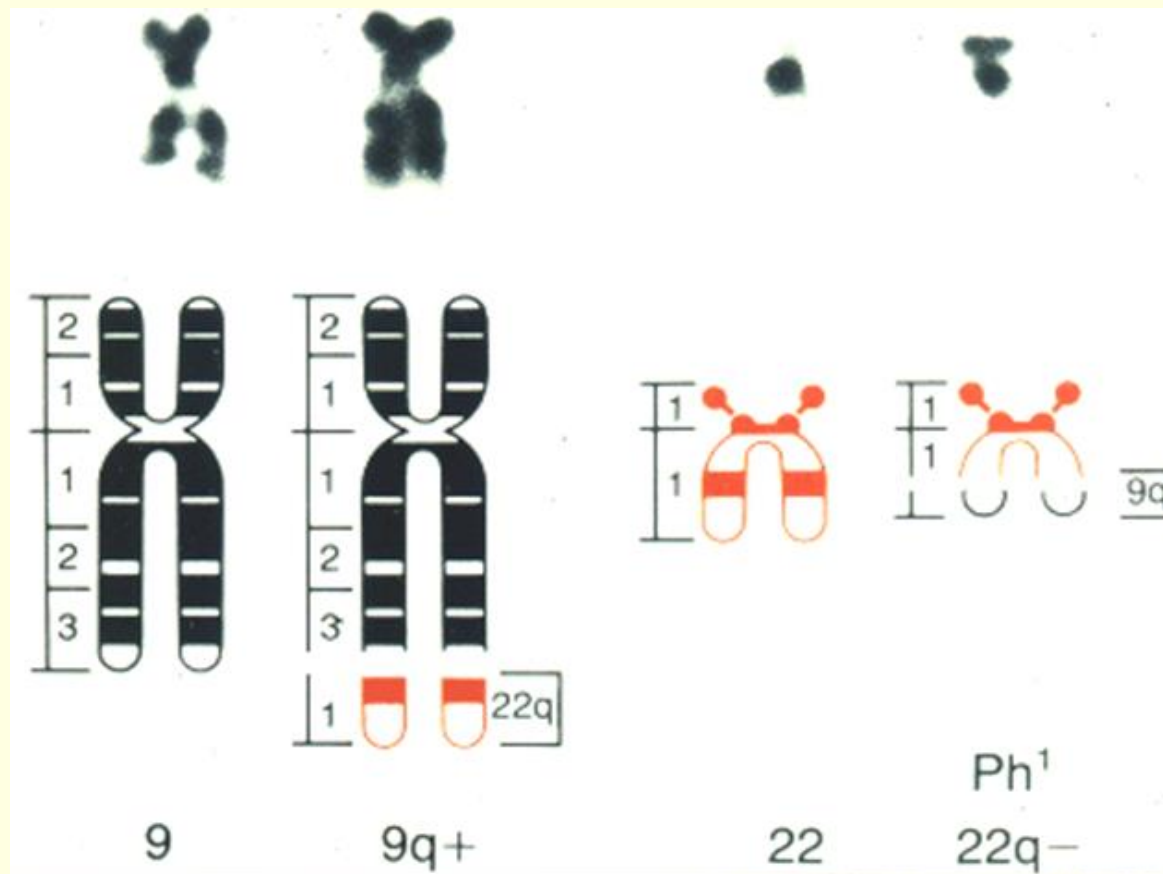


# Využití FISH: onkogenetika

## Chronická myeloidní leukemie (CML)

### Philadelphský chromozóm

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



# Využití FISH:

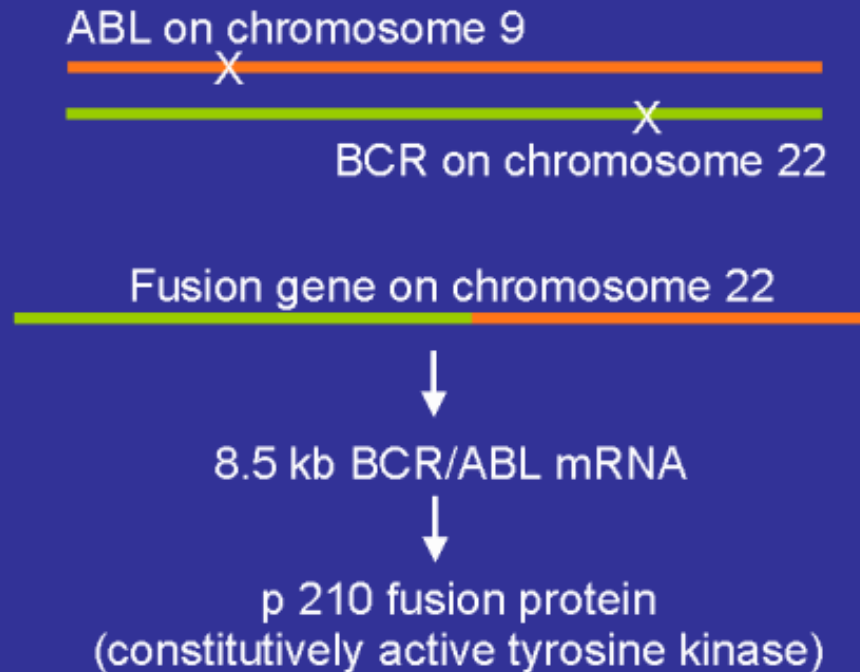
## Chronická myeloidní leukemie (CML)

- Ph obvykle přítomen ve 100% mitóz v době diagnózy, přítomen i v průběhu onemocnění
- nejlepší prognózu mají pacienti, kteří mají v době diagnózy Ph chromozom jako jedinou změnu
- v době diagnózy u některých nemocných kromě Ph další chromozómové změny, jejich výskyt je nepříznivý prognostický znak
- v době blastického zvratu až 70% nemocných má přídatné chromozómové změny, nejčastěji +8, duplikace Ph, +19, i(17q)
- FISH detekujeme přestavbu BCR/ABL, specifická sonda umožňuje vyšetřovat i interfázní jádra

# Philadelphský chromozóm

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

### Chronic myeloid leukemia (CML)



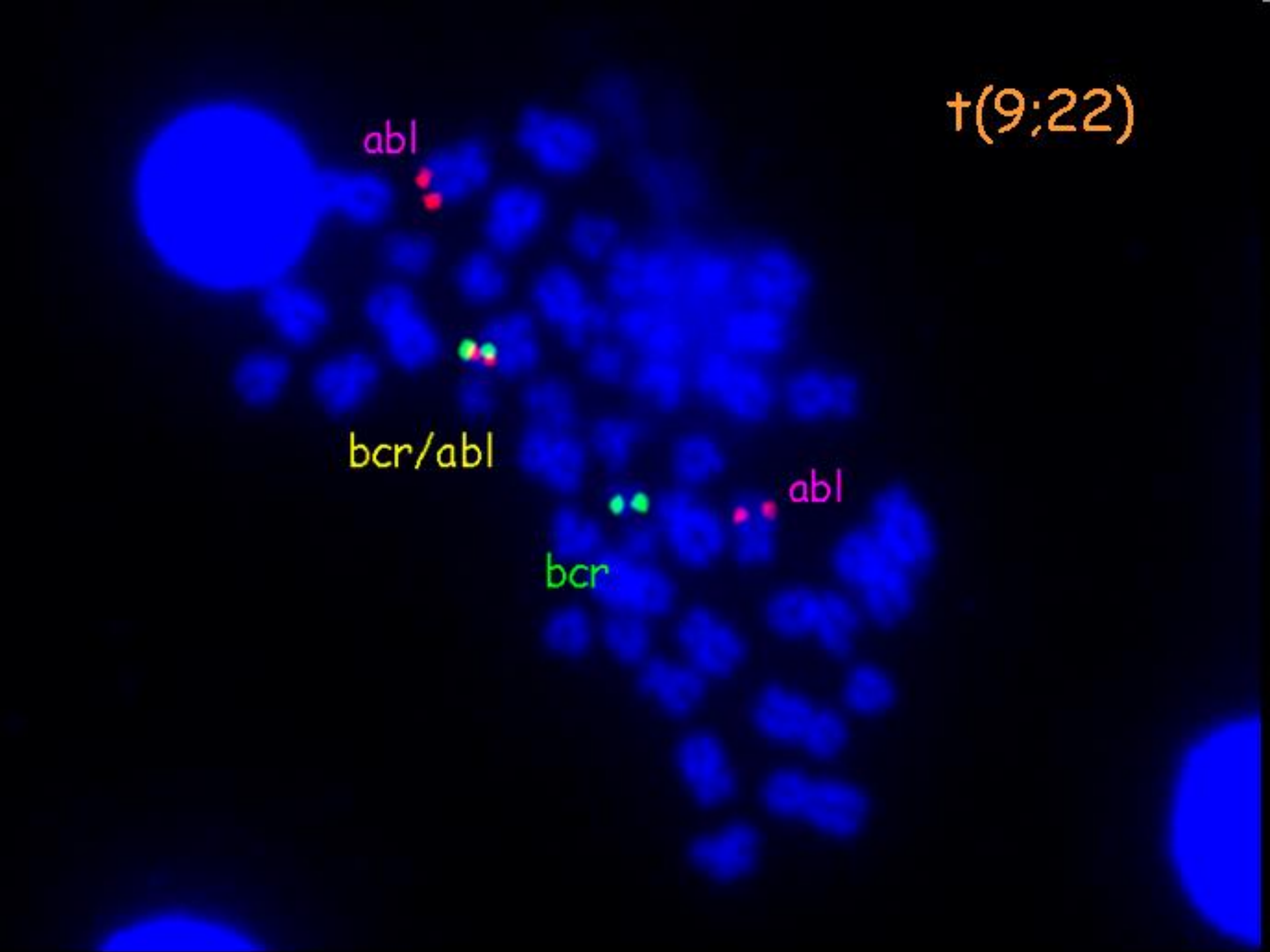
+ (9;22)

abl

bcr/abl

bcr

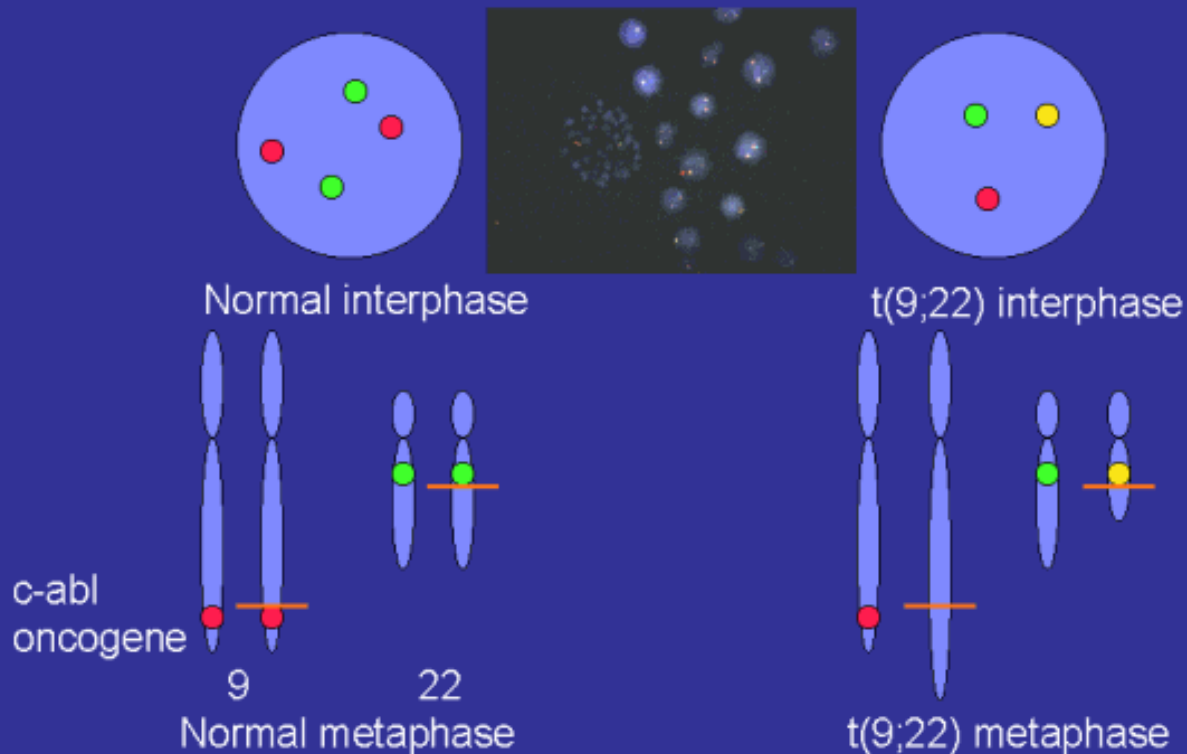
abl



# Philadelphský chromozóm

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

## Two colour FISH for cancer translocations (CML)



# Philadelphský chromozóm

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

## Two colour (ES) FISH for CML

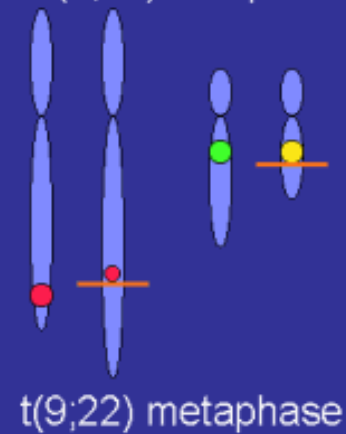
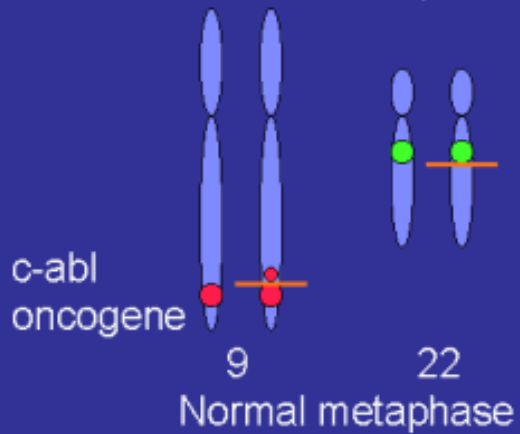
Larger probe – spanning the breakpoint



Normal interphase



t(9;22) interphase



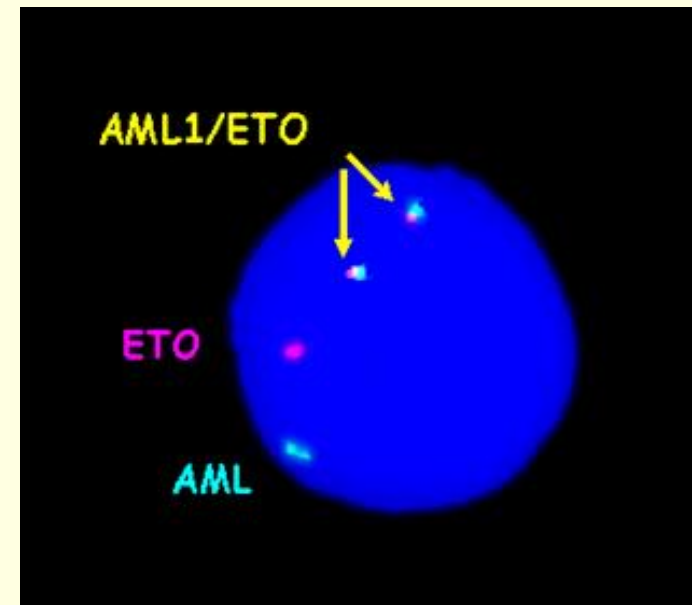
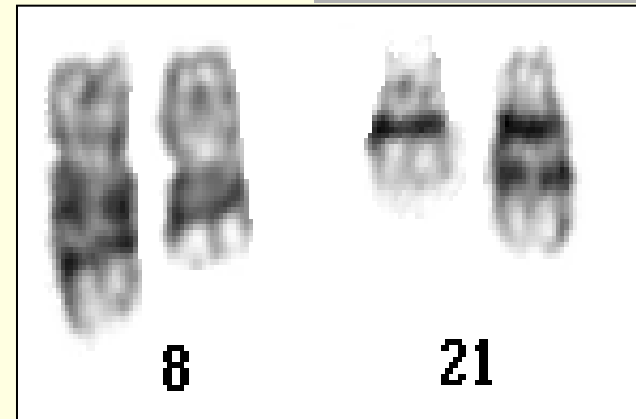
# Využití FISH:

## Akutní myeloidní leukemie (AML)

### AML-M2

#### t(8;21)

- mapované geny ETO, AML1
- především u mladších pacientů, často u dětí
- sekundární změny
  - Y, -X, 9q-, 7q-, +8
- dobrá prognóza

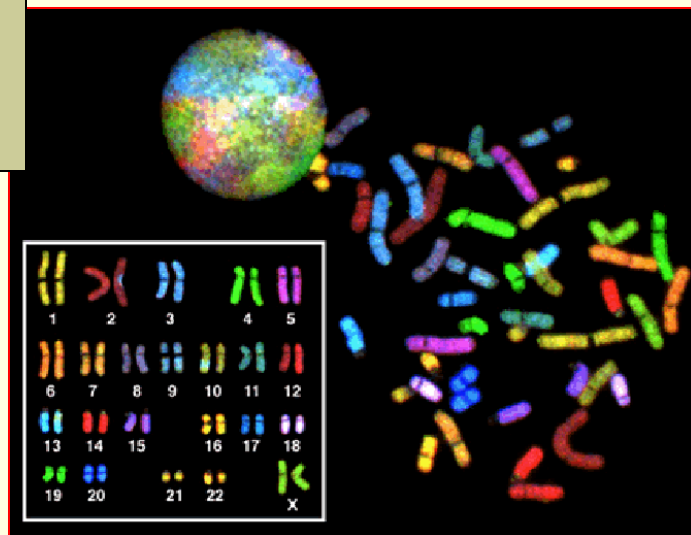




# Spektrální karyotypování SKY

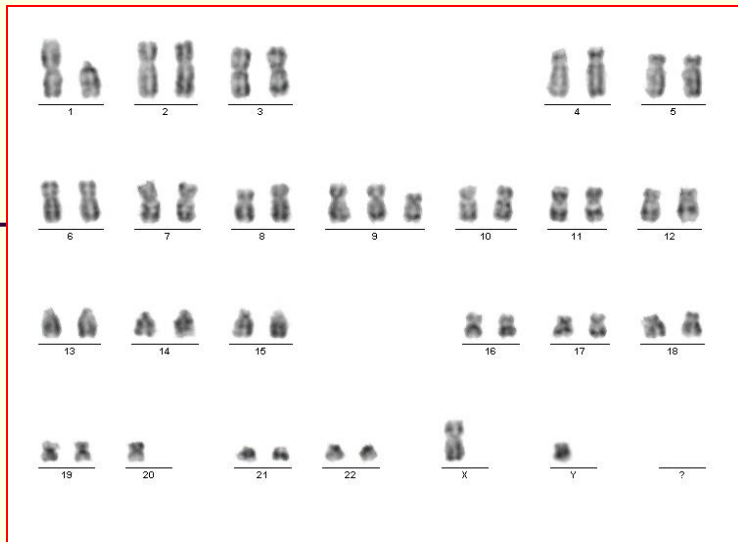
Umožňuje odhalení balancovaných a nebalancovaných ( i kryptických ) přestaveb celého genomu v jednom kroku

- 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

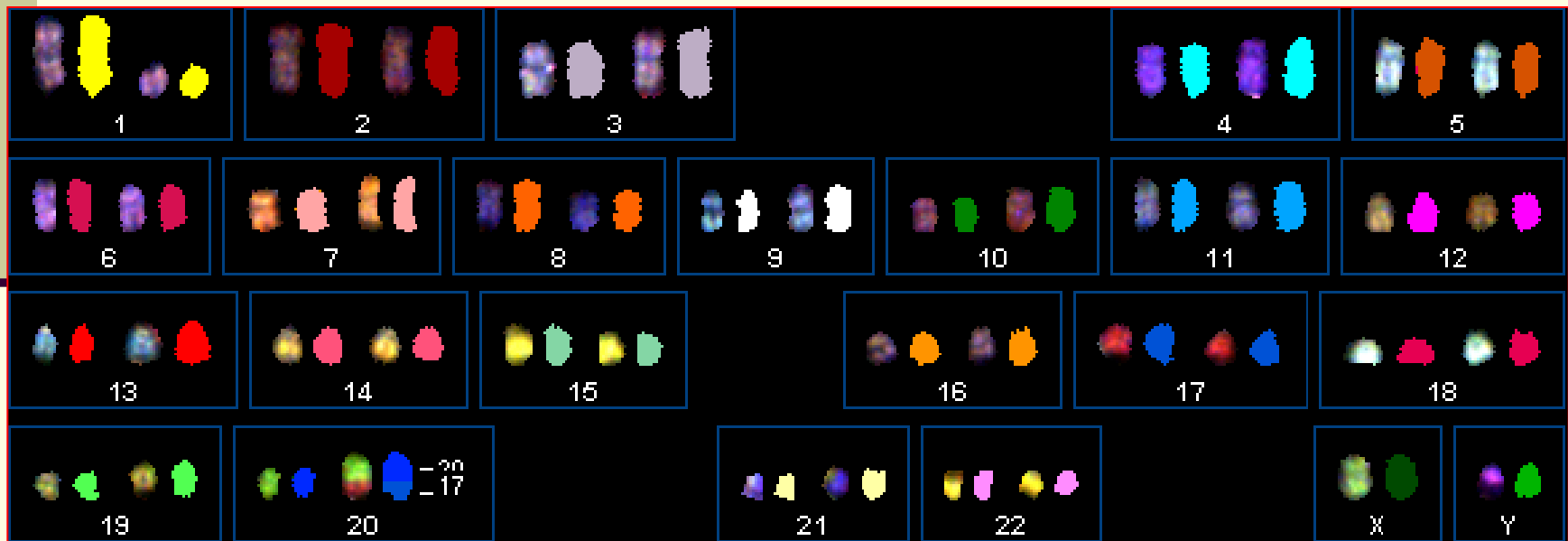


- Nevýhody** - potřeba kvalitních mitóz
- úspěšná hybridizace
  - finančně nákladné

# Chlapec, 1 rok, neuroblastom

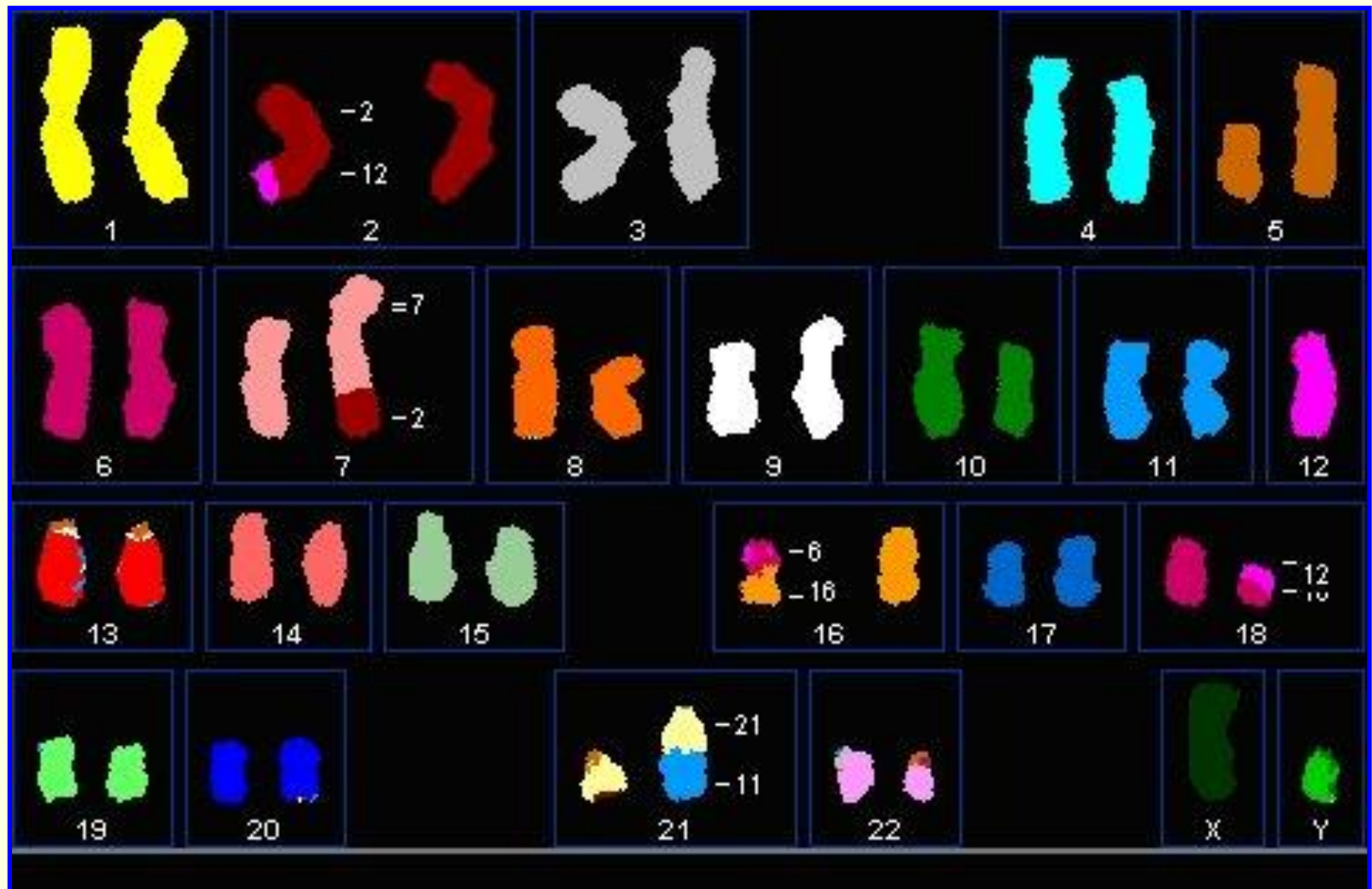


46,XY,del(1p),+del(9p),-20

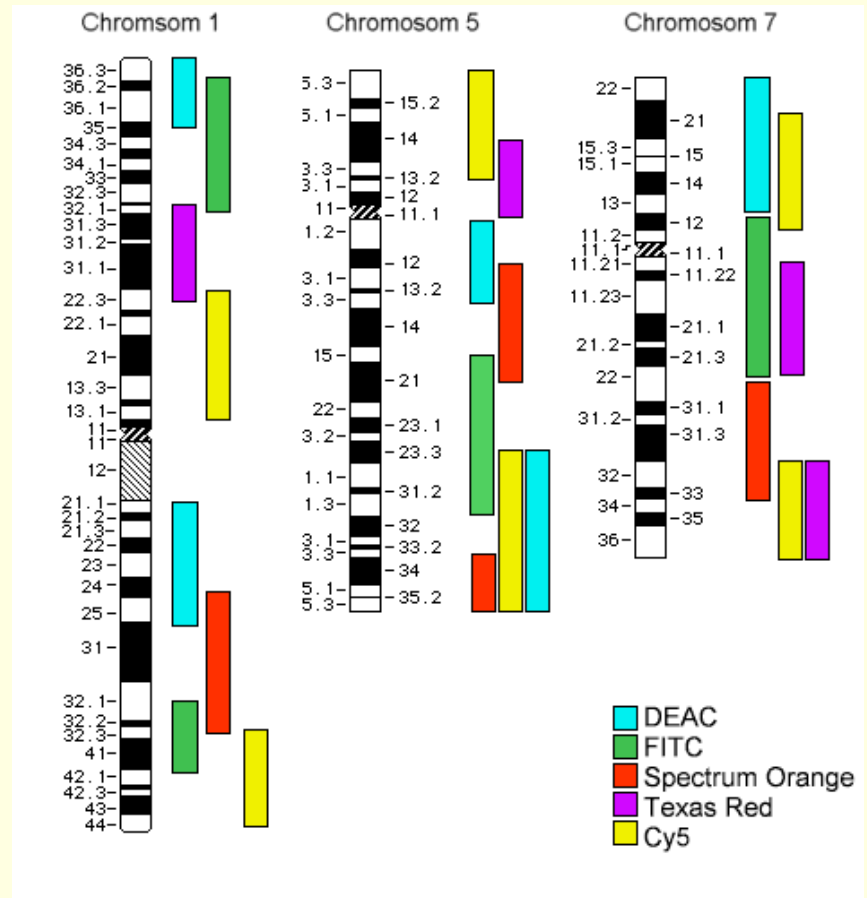
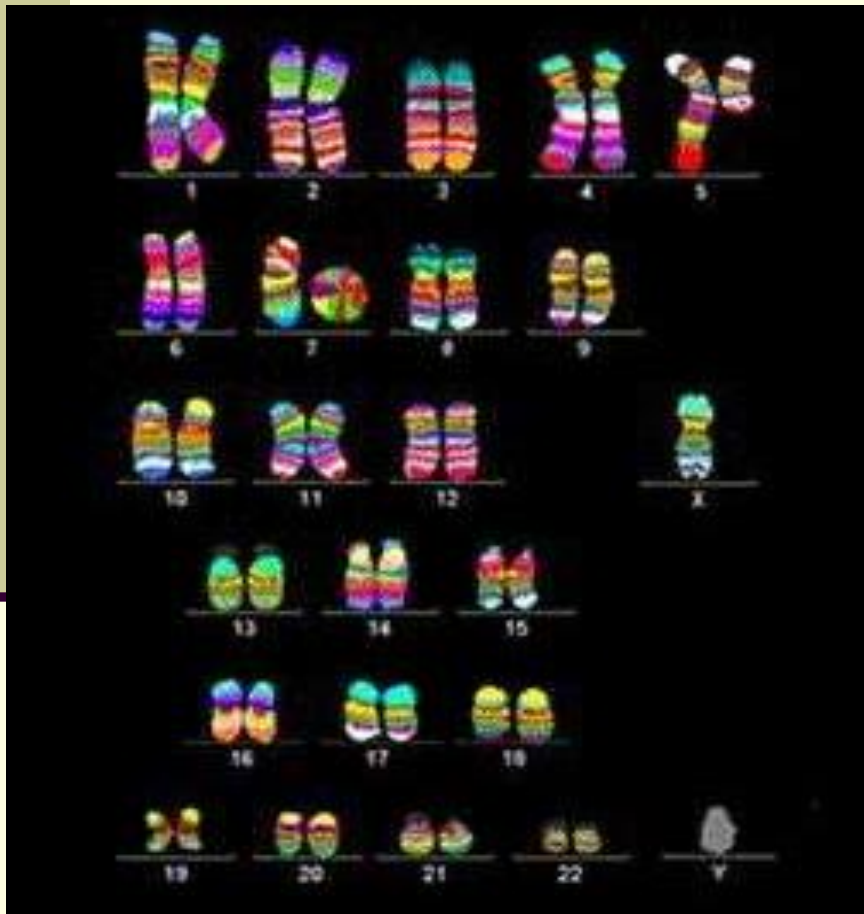


46,XY,del(1p),der(20)t(17;20)

# 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.

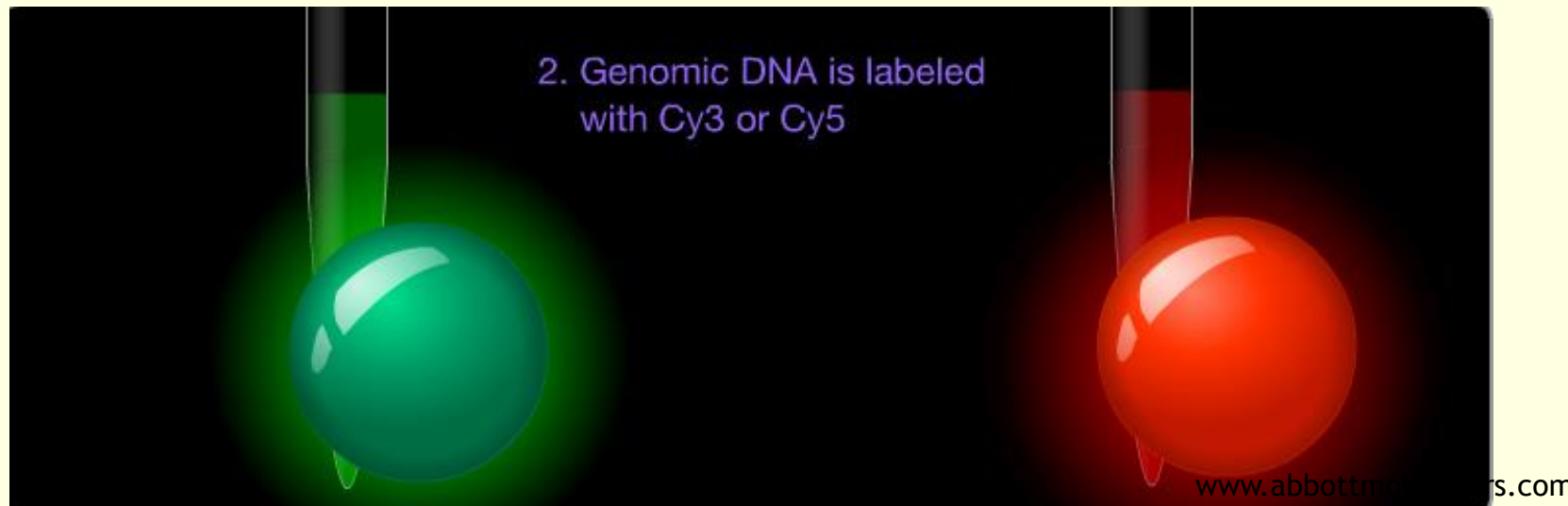
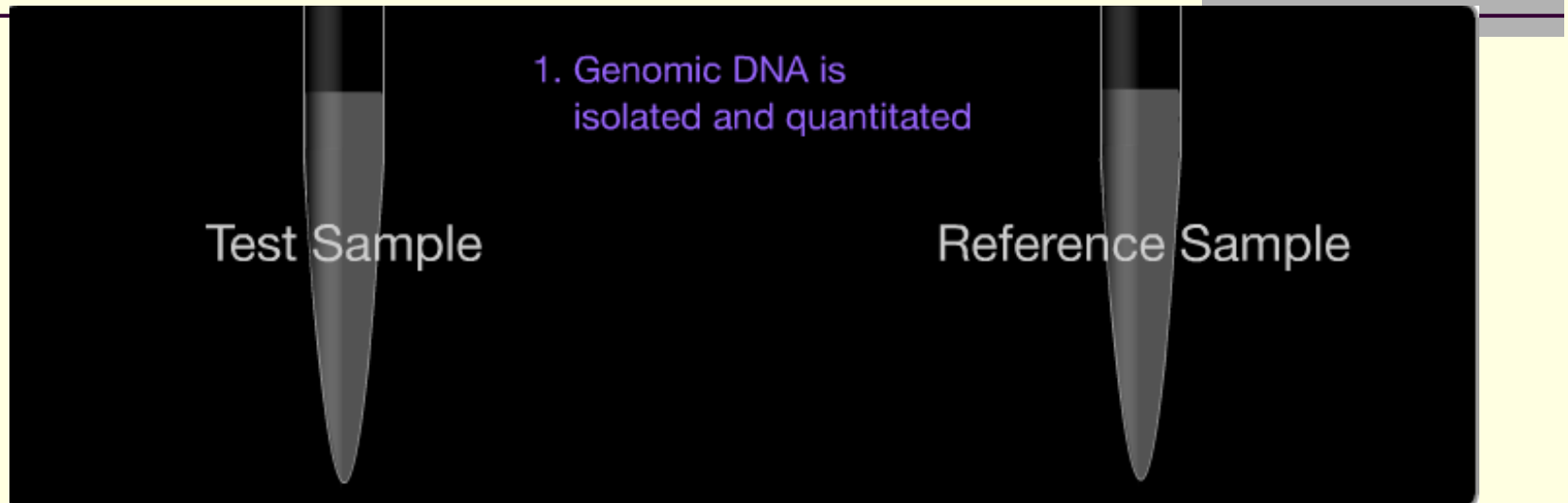
The discovery of genetic changes involved in the development of solid tumors has proven difficult. Karyotyping is impeded by the low number of high-quality metaphase spreads and the complex nature of chromosomal changes (1). Molecular genetic studies of isolated tumor DNA have been more successful and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

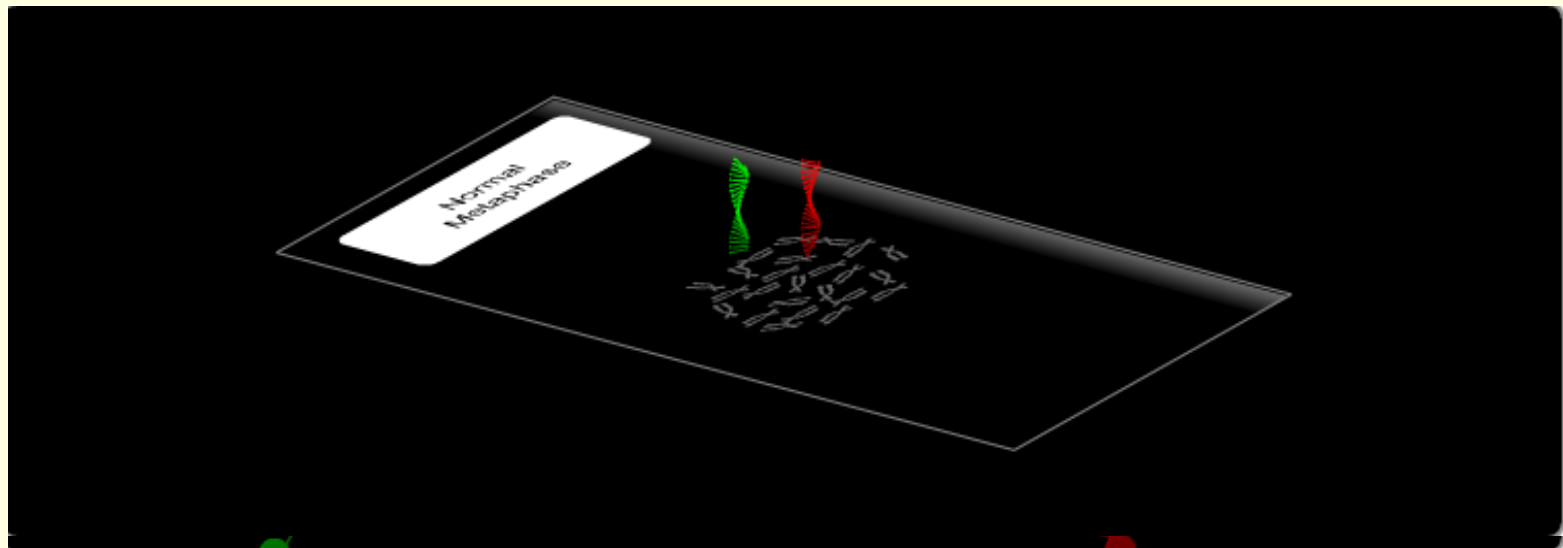
A takto to funguje...



# CGH

## A takto to funguje...

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





# DNA extraction

competitor



reference

(red dUTP)

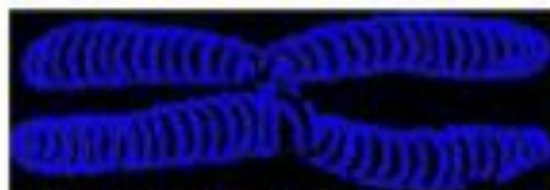


test

(green dUTP)



Hybridisation for  
48-72 hours

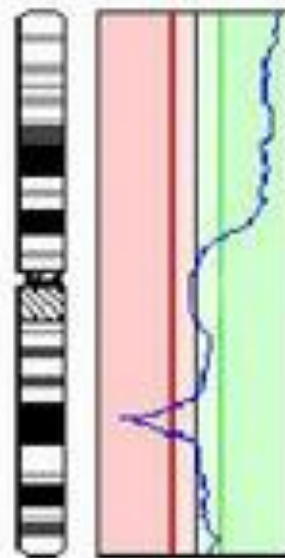


Normal metaphase chromosomes

metaphase  
chromosome



Fluorescent  
Image profile



enh(1p)

dim(1q31)

Image through a triple-band filter

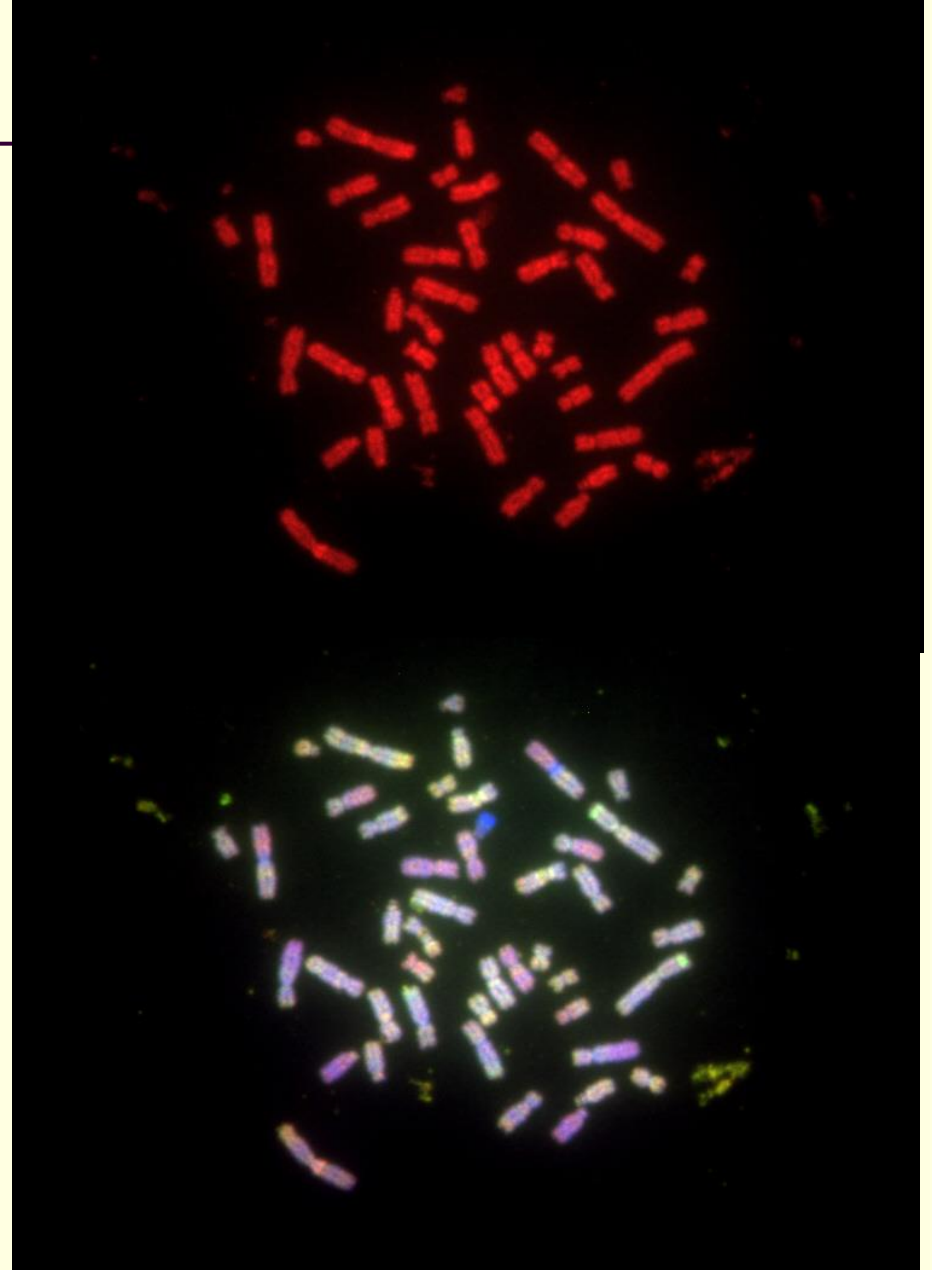
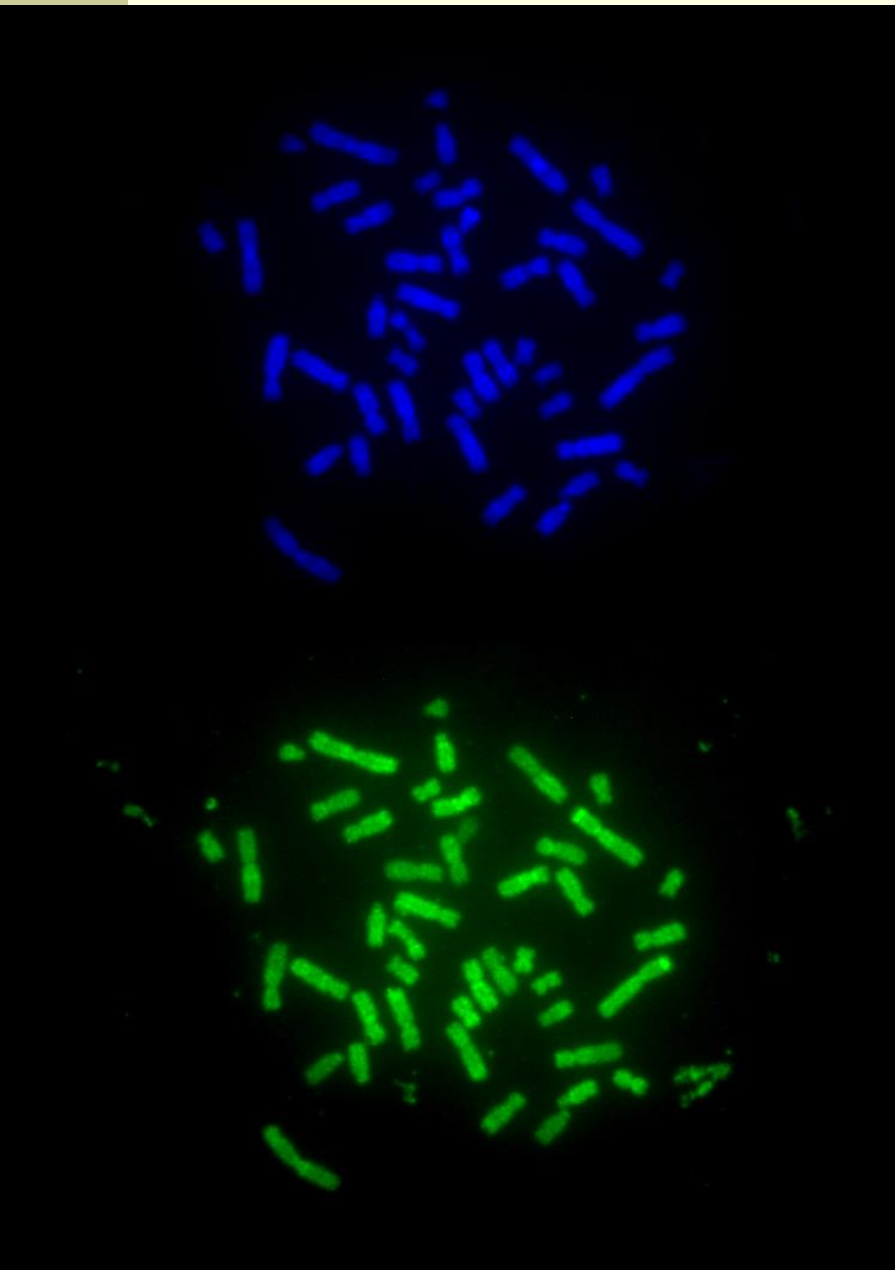
Green; increase in copy number  
Red; decrease in copy number

Sample Preparation &  
Hybridisation

Fluorescence microscopy &  
Image Analysis

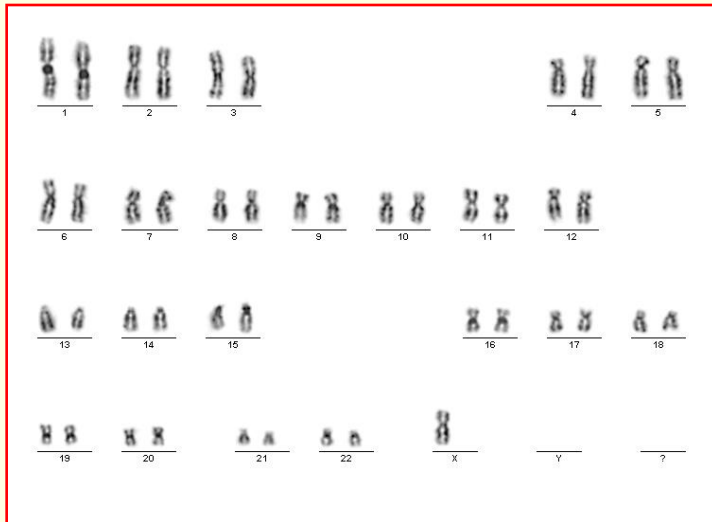
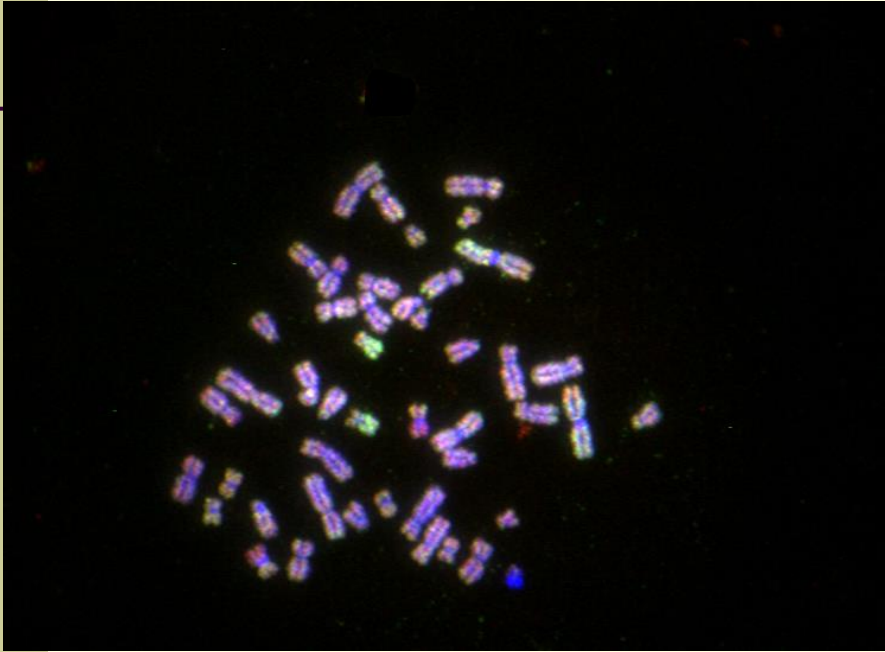
# CGH

## interpretace výsledků



# CGH

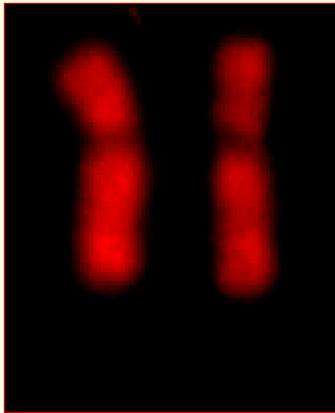
# interpretace výsledků



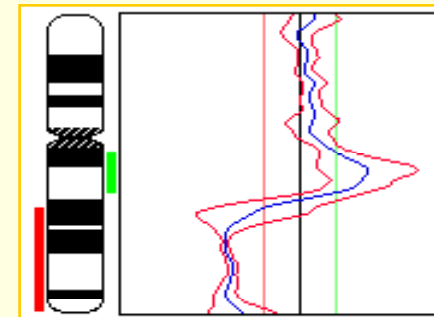
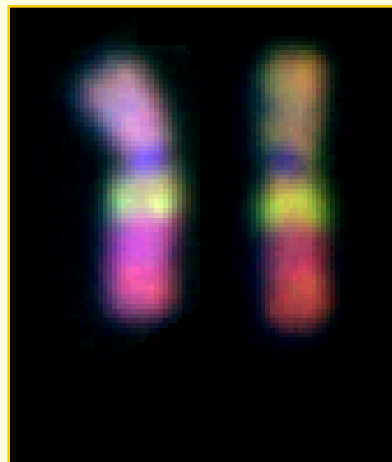
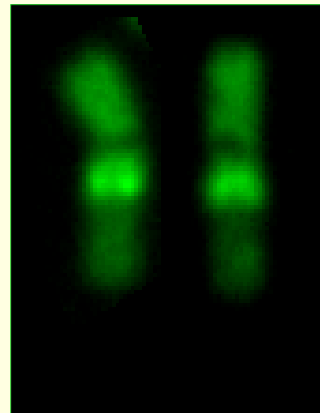
# CGH

## interpretace výsledků

Referenční DNA

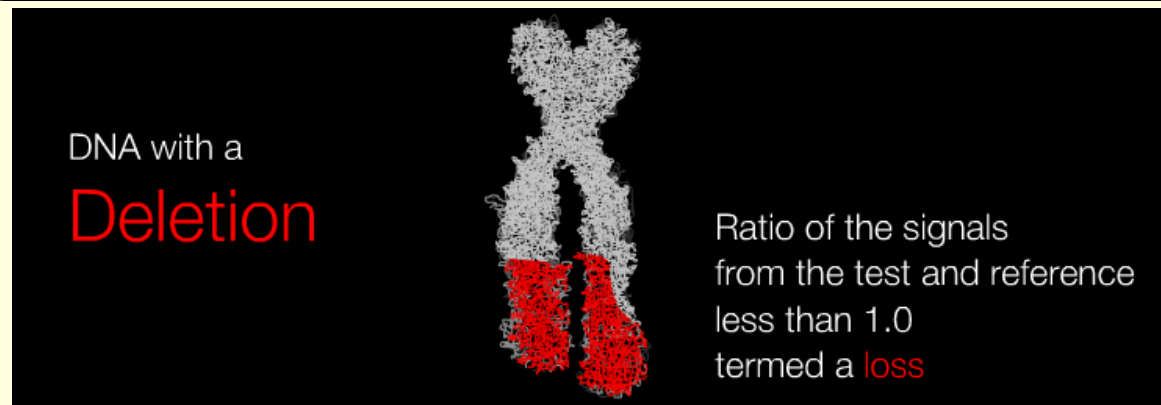
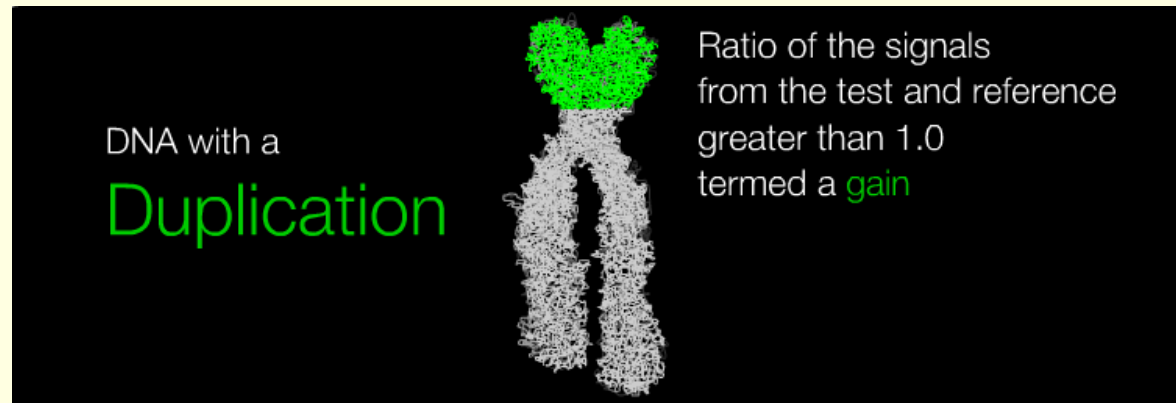
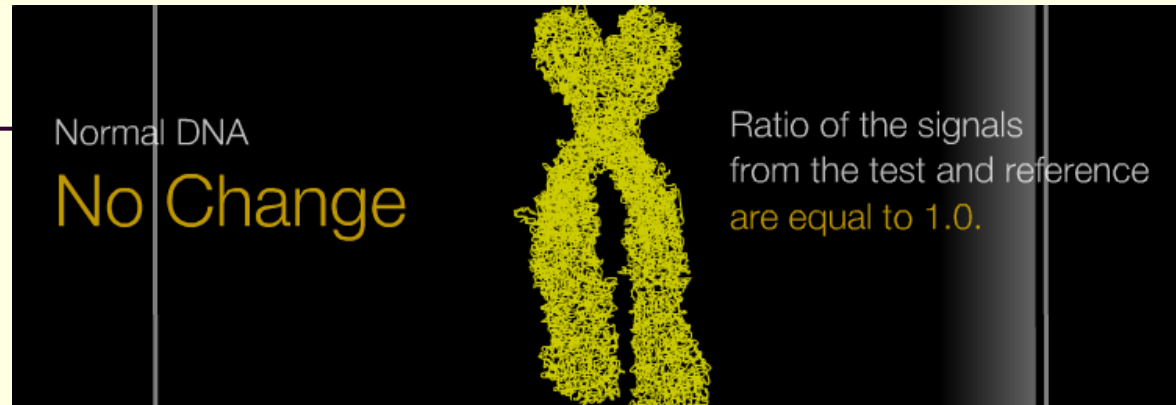


Testovaná DNA



# CGH

## Zelená s červenou...



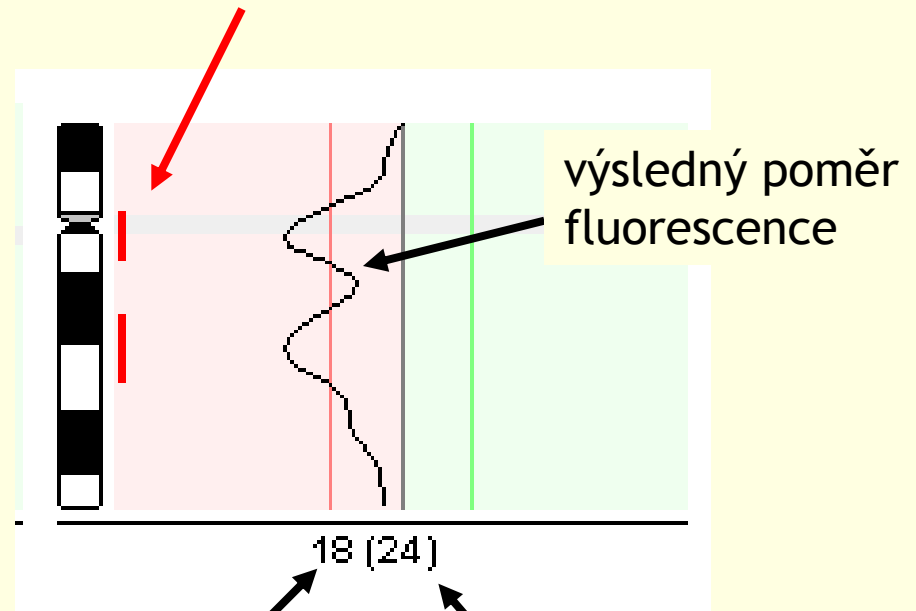
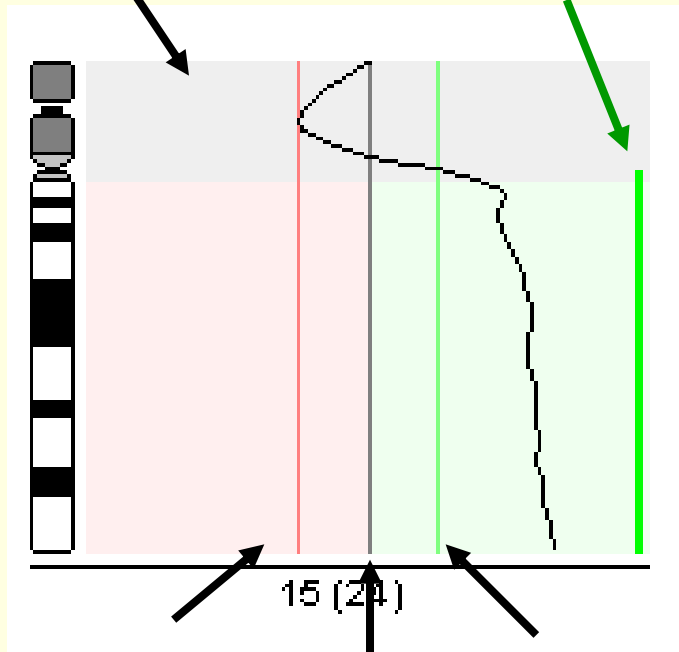
# CGH

## interpretace výsledků

heterochromatin

zelená - zisk

červená - ztráta



výsledný poměr fluorescence

hranice 0,8

hranice 1,2

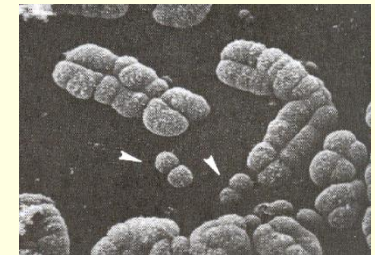
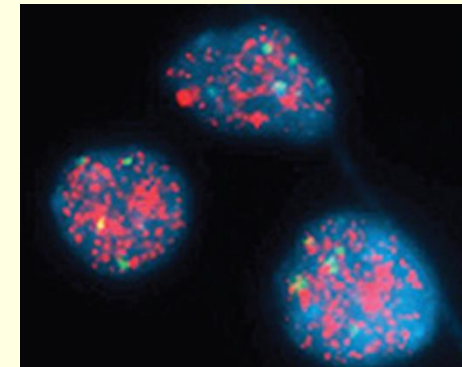
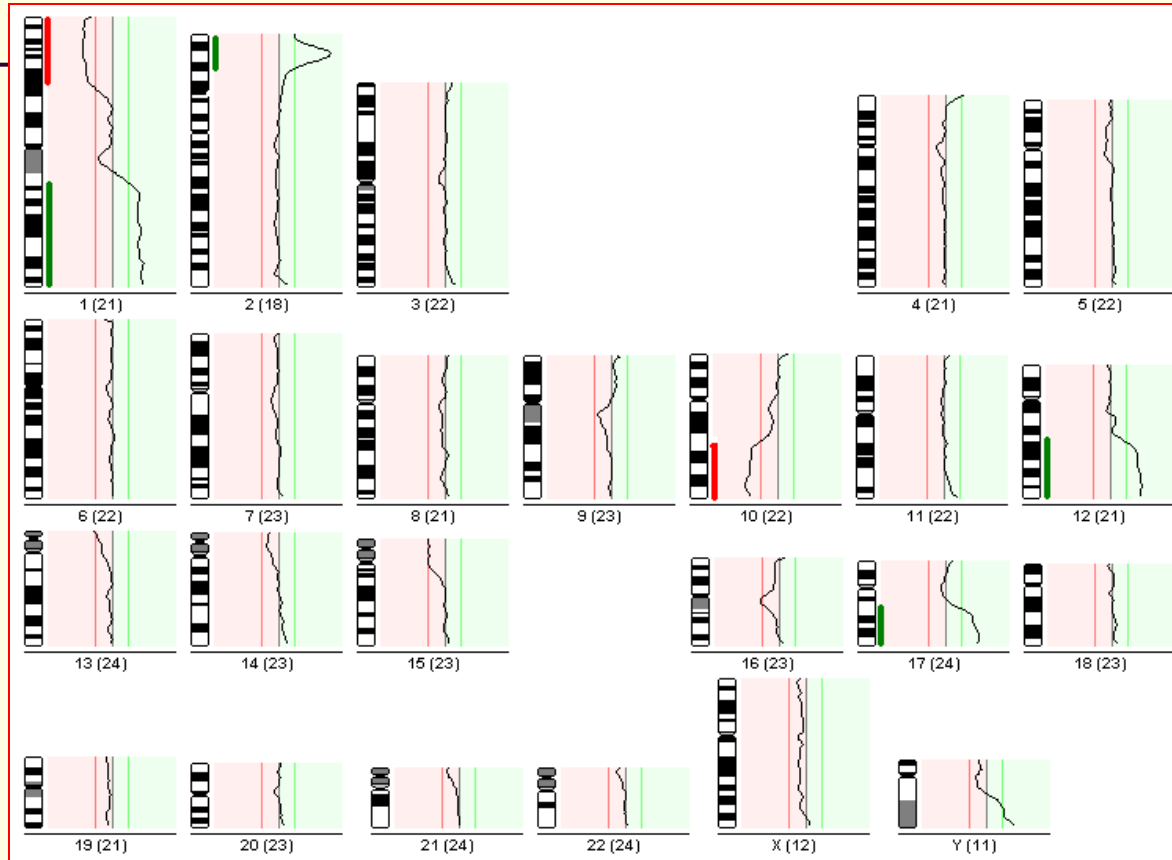
č. chromozómu

počet hodnocených chromozómů

hodnota 1

enh → zisky, amplifikace  
dim → ztráty, delece

# 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

# Array CGH : ještě větší rozlišení

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



BAC, P1 klony,  
oligonukleotidy ~ 35 kb

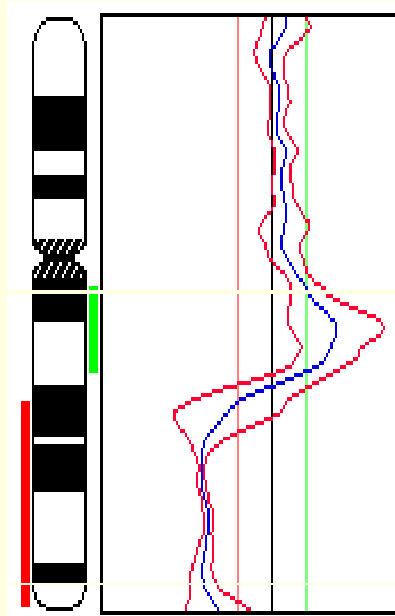
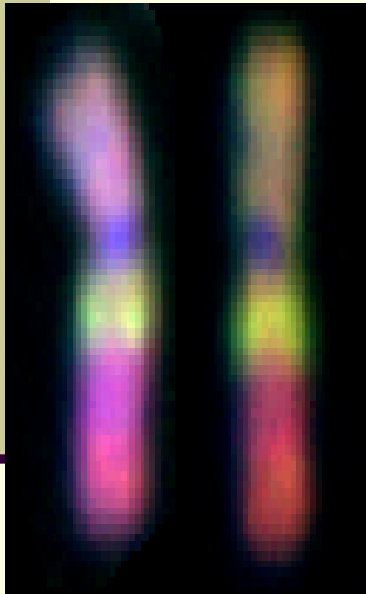


- Solinas-Toldo a kol., 1997
- nahrazení chromozómů separovanými klony
- BAC, PAC, c-DNA klony, oligonukleotidy ~ 35 kb
- princip DNA/DNA hybridizácie, sondy fluorescenčne značené

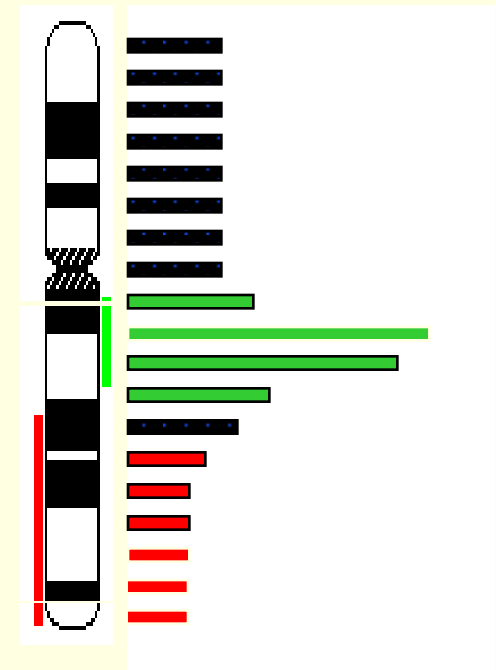
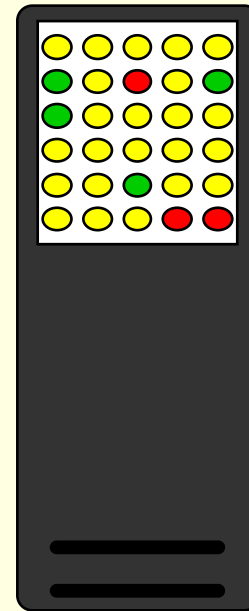


# Array CGH : rozdíl je jen v podkladu

CGH



Array-CGH



## Takto to potom vypadá...



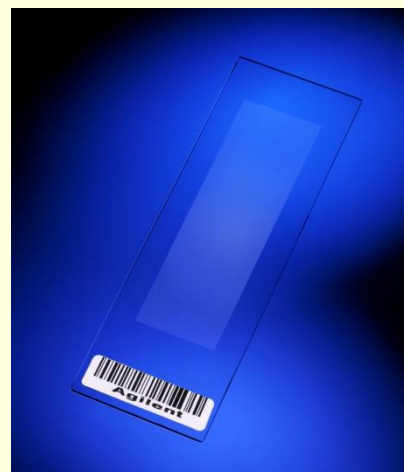
[www.abbottmoleculars.com](http://www.abbottmoleculars.com)

a)



[www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)

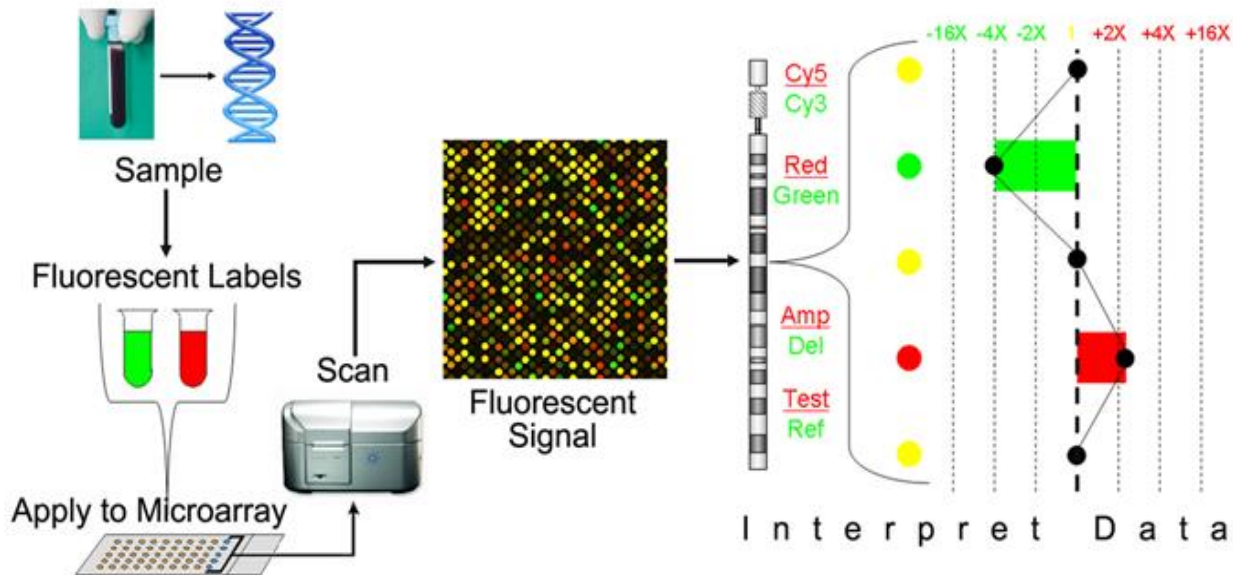
b)



[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

Ukázky CGH čipů firmy a) Affymetrix a b) Agilent.

# DNA mikročipy využívané na OLG FN Brno v klinické diagnostice /2007

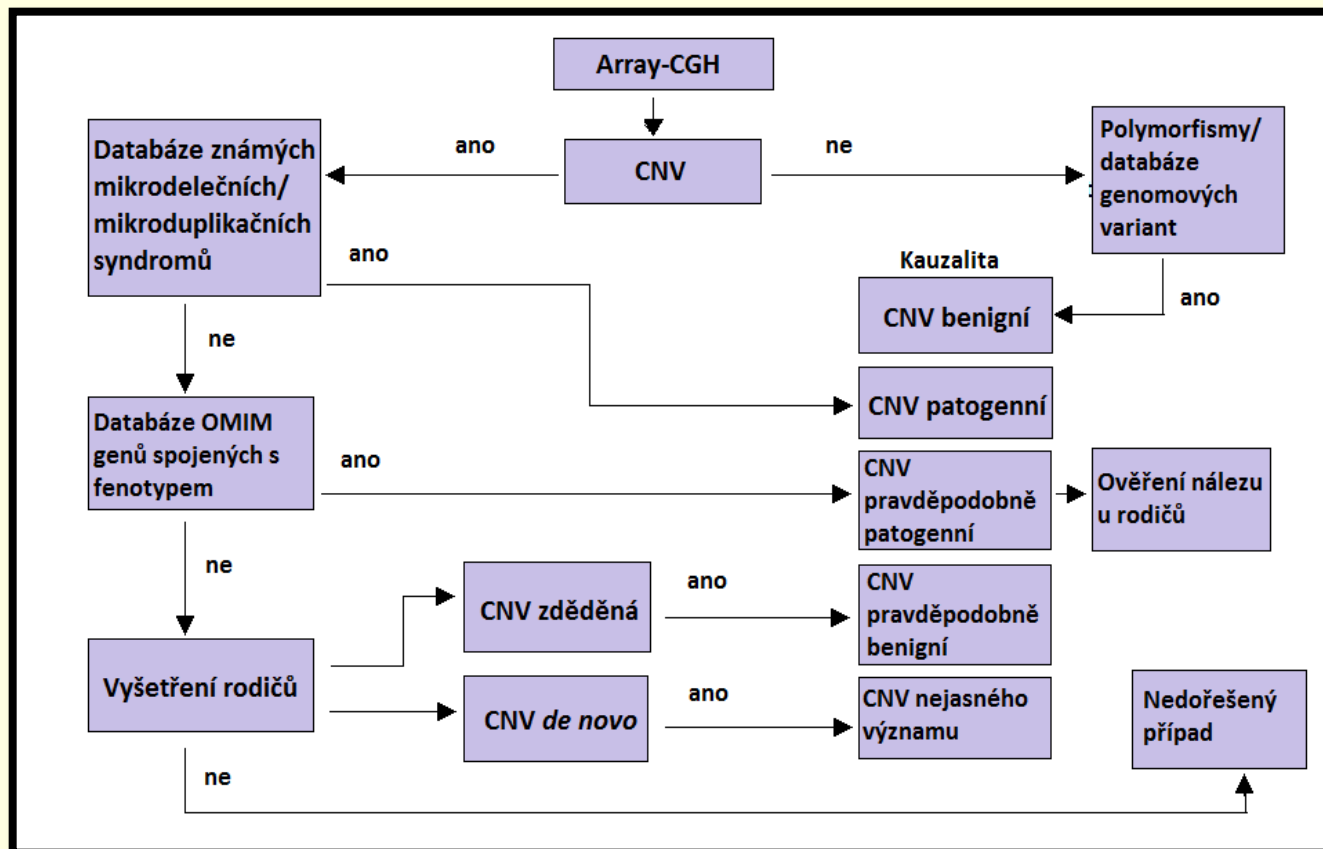


## Oligonukleotidové platformy (Agilent Technologies)

- Human Genome 4x44K CGH array, 8x60K CGH array
- **SurePrint Human 4x180K CGH , ISCA 4x180K CGH+ SNP array**
- spacing ~ 25 kbp, obohacené regiony s RefSeq a ISCA geny

# Klinická interpretace významu detekovaných CNVs (copy number variations)

- **Původ CNV** – *de novo* x familiární výskyt
- **Funkce genů uvnitř CNV** – korelace genotyp-fenotyp
- Informace v **klinických databázích** – PUBMED, UCSC, OMIM, DECIPHER
- **Velikost CNV** – je spolehlivým kritériem?



# Celkový záchyt CNVs u pacientů s MR/VVV vyšetřených pomocí array-CGH 2007-2015

Celkově **275** vyšetření pomocí array-CGH

(144 chlapců, 131 dívek)

- 164 vyšetření s normálním karyotypem
- 111 vyšetření s pozitivním nálezem, tj. 40,4 %

Nalezeno:

- 51 patogenních /prav. patogenních CNVs **(18,5 %)**
- 10 CNVs nejasného významu (3,6 %)
- 36 benigních CNVs (13 %)
- 15 nálezů dosud nedošetřeno (5,4 %)

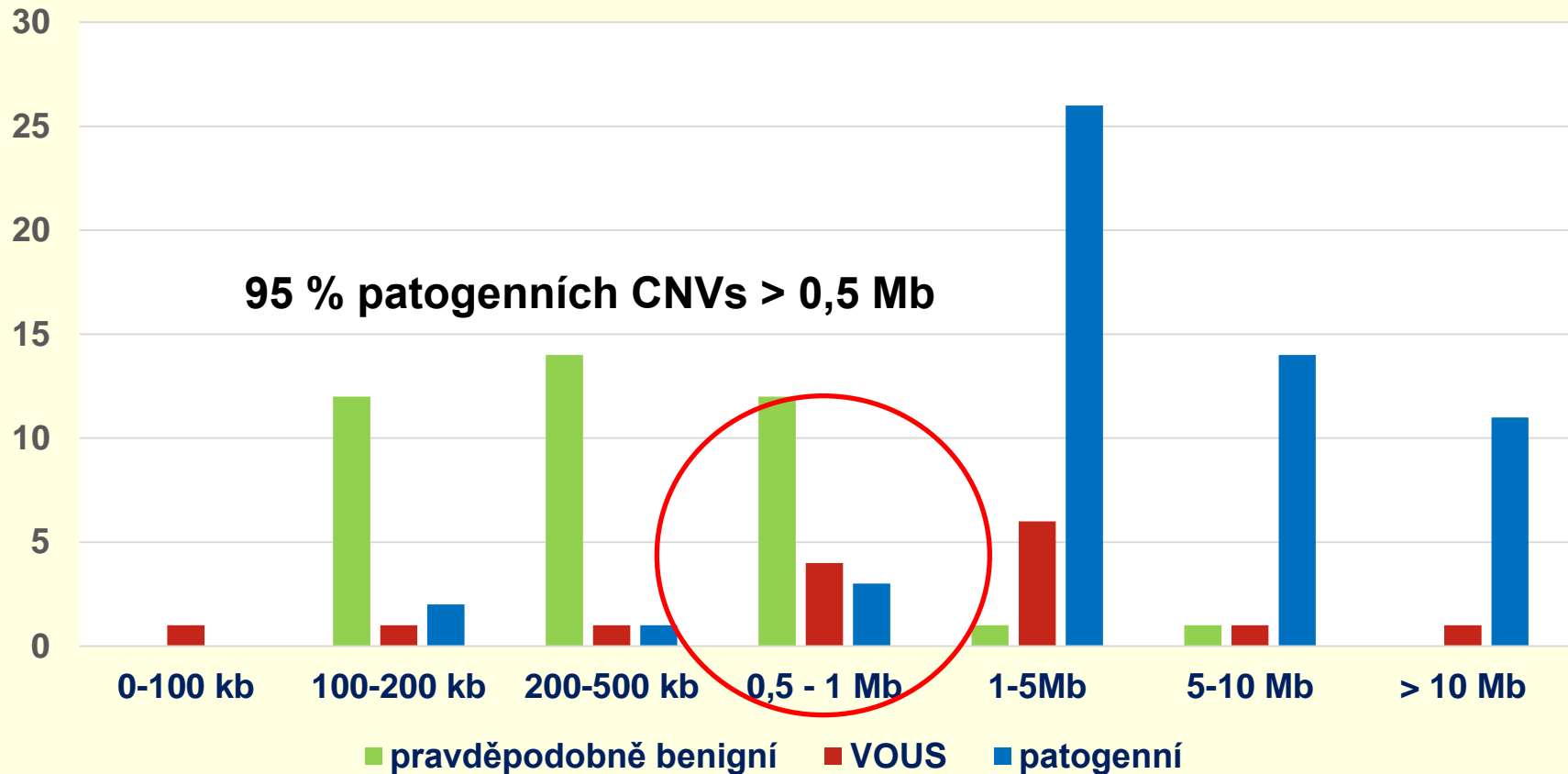
**2016 (I-X) 113 vyšetření / 26 patogenních CNVs (23 %)**

# Klinický význam CNVs vzhledem k velikosti

Mikrodelece: 67 kb – 31, 03 Mb

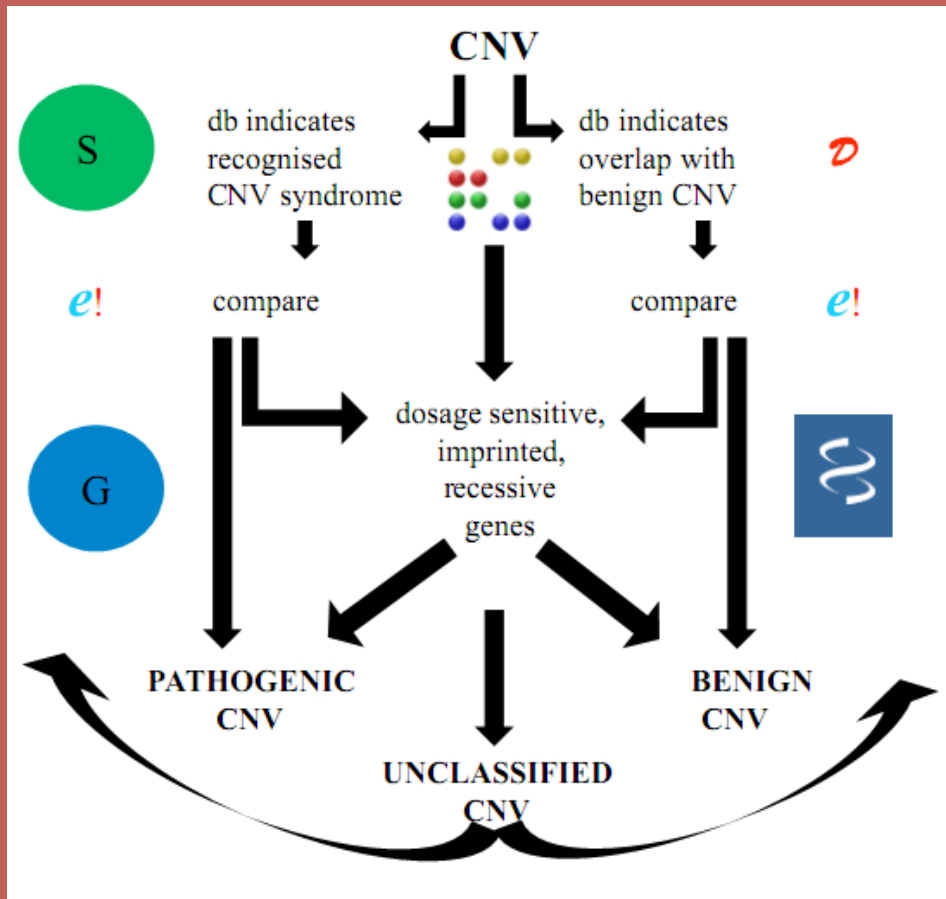
Mikroduplikace: 107 kb – 26,70 Mb

počet CNVs





# Interpretace array CGH



Vždy v kontextu

- s fenotypem pacienta
- s vyšetřením rodičů
- s databázemi

Database of Genomic Variants



DECIPHER v4.1.4



# Kazuistika .1

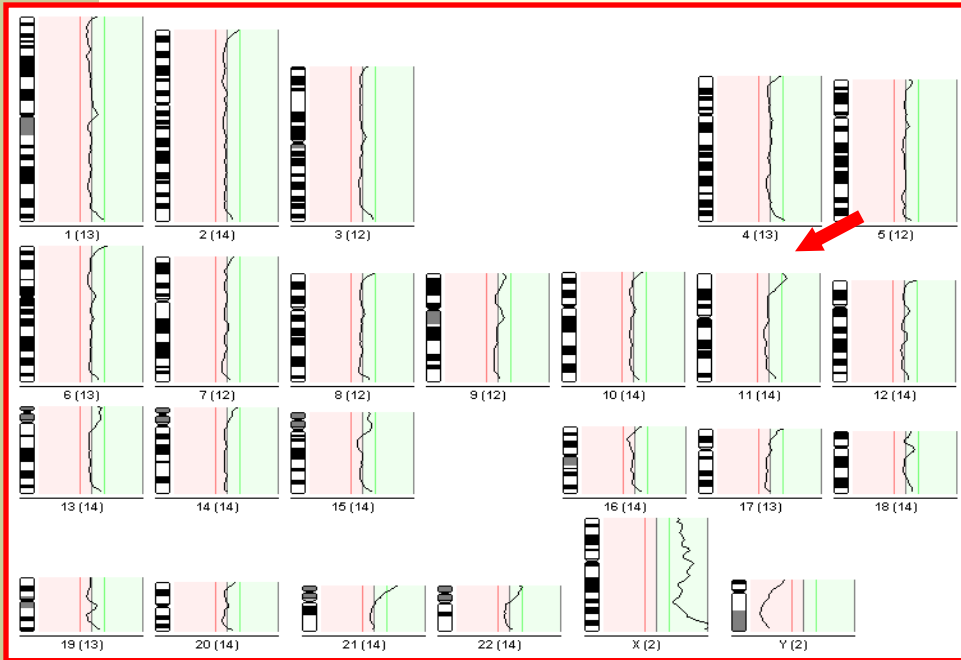
- děvče, rok narození 2002
- dg: stigmata - mongoloidní postavení očí, hyperplastická gingivální sliznice, soudkovitý hrudník, velké rozlité břicho
- matka 46,XX, inv(9), otec 46,XY,add(1)[87]/46,XY[13]



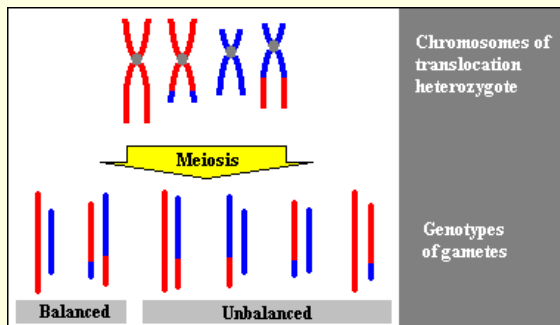
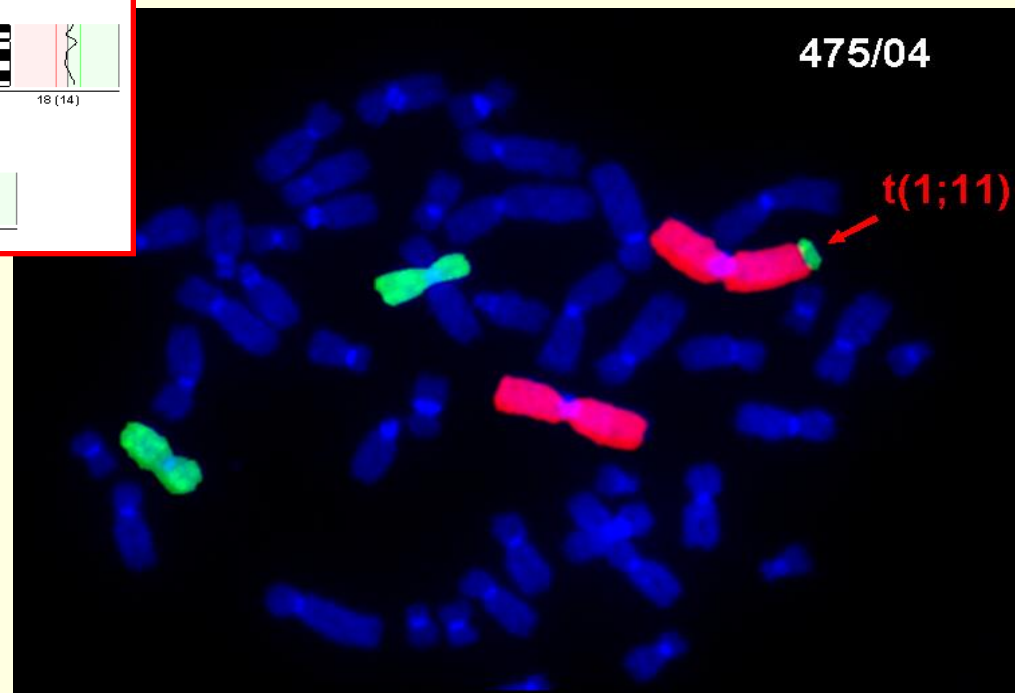
46,XX,add(1)

# Kazuistika .1

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



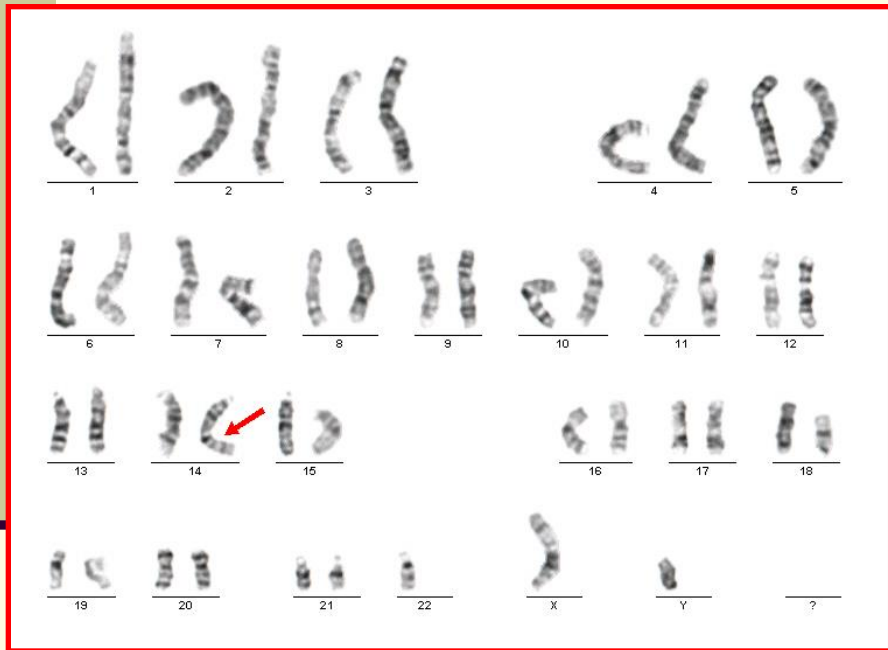
FISH: der(1)t(1;11)



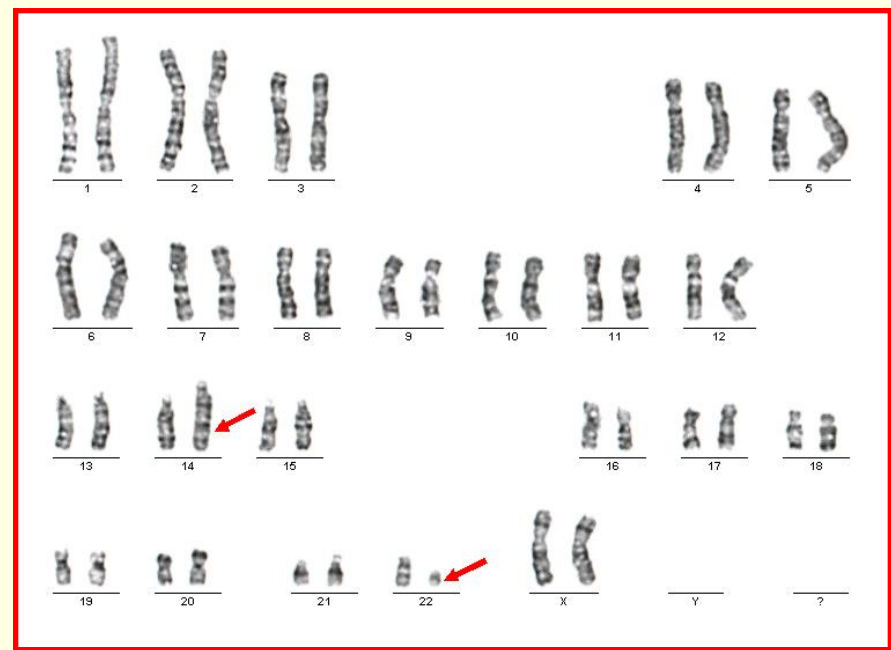
# Kazuistika .2

- chlapec, rok narození 2004

faciální dysmorfie, stigmata

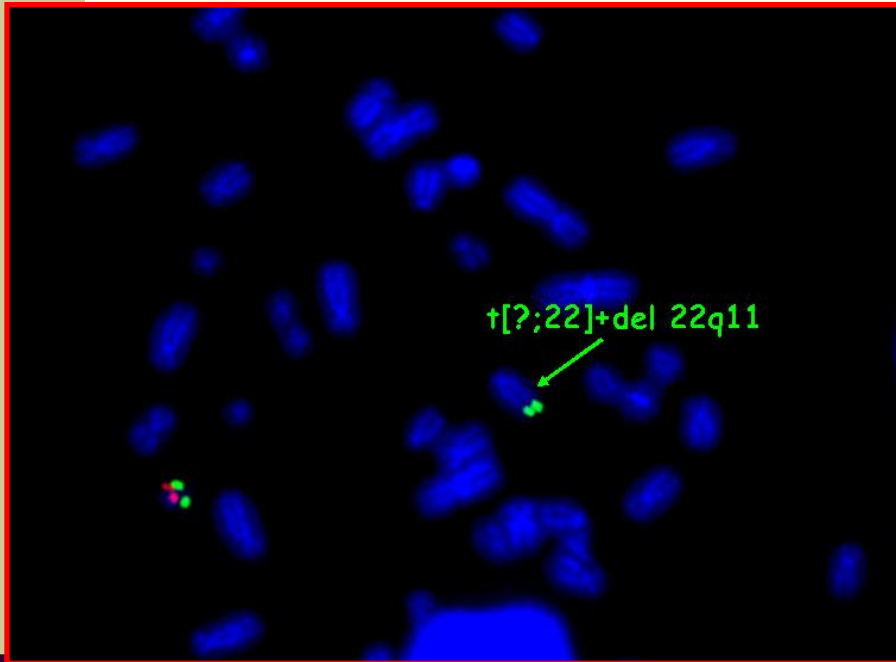


45,XY,-22,der(14)

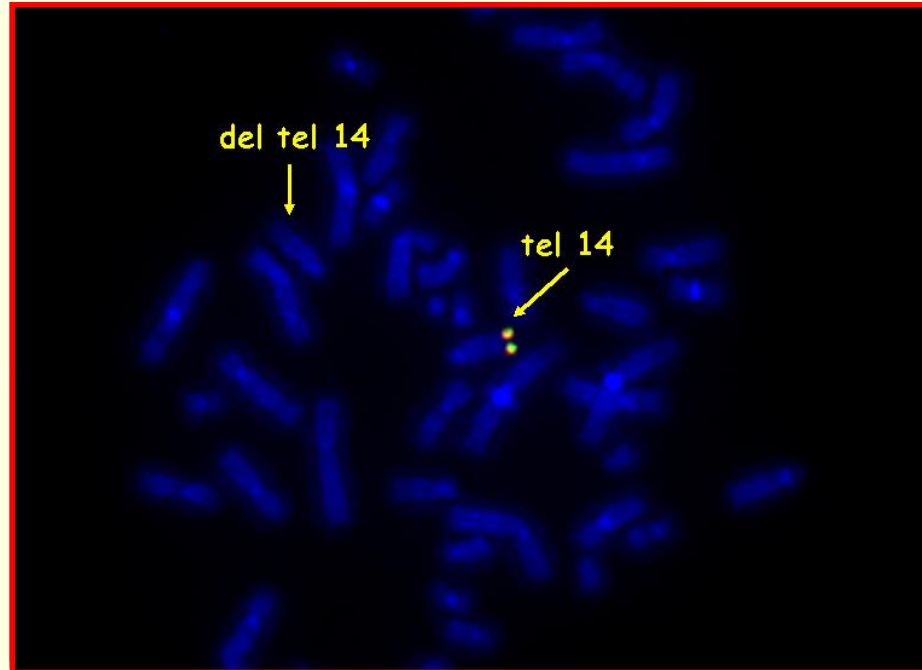


46,XX,der(14)t(14;22)(q32.3;q11.2)

# Kazuistika .2



45,XY,der(14)t(14;22)(q32.3;q11.2)  
DiGeorge sy



46,XX,der(14)t(14;22)(q32.3;q11.2)

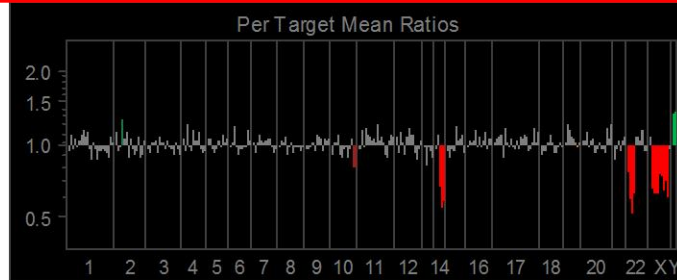
# Výsledky array-CGH

Pacient s **der(14)t(14;22)(q32.3;q11.2)mat  
del(22)(q11.2)del(14qter)**

**XVYSIS**

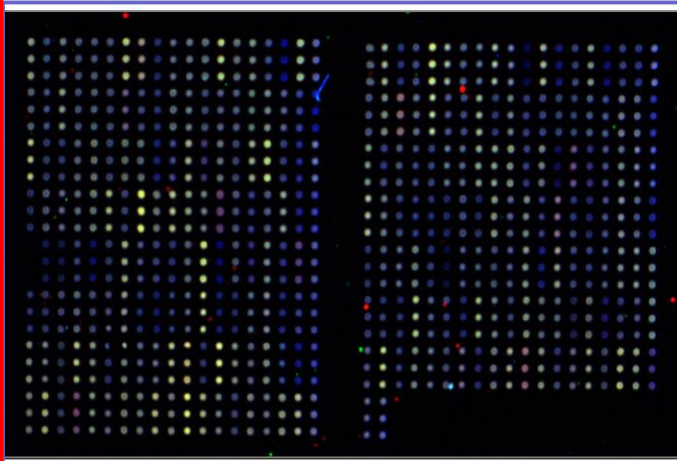
GenoSensor™ Array 300  
Genomic Analysis Report

Document: GATA.qps  
Chip Name: GenoSensor™ Array 300 (rev. 1)  
Analyzed by:  
Chip #:



**Genosensor Report (22 of 287 targets)**  
*only targets whose p <= 0.01*

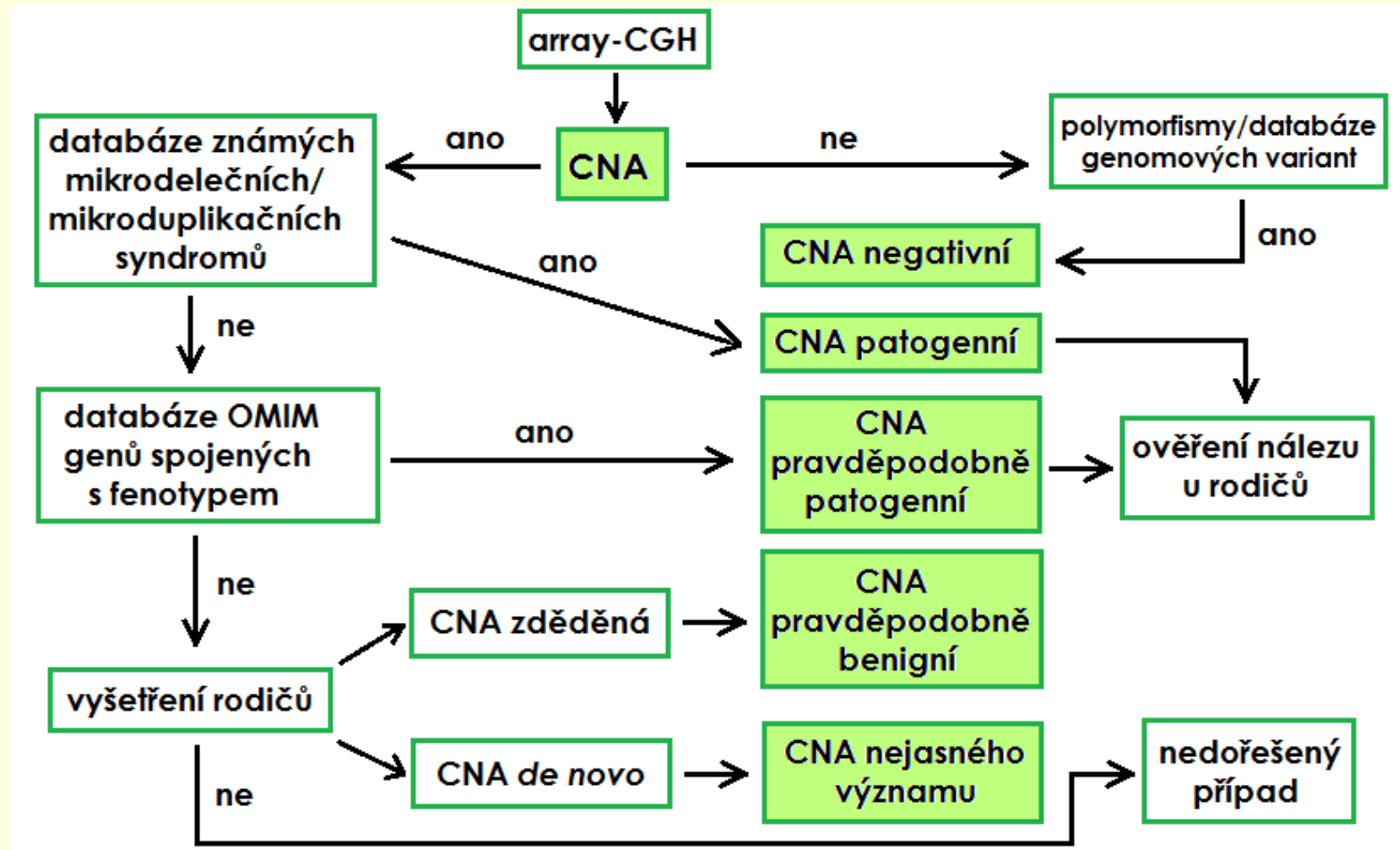
Tgt	Name	Location	#	Mass Ratio		Mean Ref (c/s)	NonModal (nh p<x)	Mod
				Mean	CV(%)			
27	MSH2,KCNK12	2p22.3-2p22.1	3	1.25	0.4	233.6	0.002	
137	stSG27915	10q tel	3	0.81	1.2	531.1	0.002	
138	10QTEL24	10q tel	3	0.81	0.6	395.6	0.002	
171	RB1	13q14	3	0.83	1.2	230.2	0.01	
177	AKT1	14q32.32	3	0.68	0.6	308.7	0.0001	
178	IGH(D14S308)	14q tel	3	0.55	0.5	278.3	0.0001	
179	IGH(SHGC-36156)	14q tel	3	0.58	0.6	389.7	0.0001	
265	D22S543	22q11.21	3	0.78	1.2	110.1	0.0005	
266	GSCL	22q11.21	3	0.60	0.8	236.3	0.0001	
267	HIRA(TUPLE1)	22q11.2	3	0.52	3.9	292.4	0.0001	
268	TBX1	22q11.2	3	0.64	1.5	434.7	0.0001	
276	STS 3'	Xp22.3	3	0.67	2.5	126.3	0.0001	
277	STS 5'	Xp22.3	3	0.63	3.7	267.6	0.0001	
278	KAL	Xp22.3	3	0.64	1.1	166.5	0.0001	
279	DMD exon 45-51	Xp21.1	3	0.64	1.5	172.5	0.0001	
280	DXS580	Xp11.2	3	0.77	0.8	133.9	0.0002	
281	DXS7132	Xq12	3	0.75	1.0	245.8	0.0001	
282	AR 3'	Xq11-q12	3	0.65	2.7	46.7	0.0001	
283	XIST	Xq13.2	3	0.72	0.4	258.5	0.0001	
284	OCRL1	Xq25	3	0.62	2.4	81.8	0.0001	
286	SRY	Y p11.3	3	1.33	0.7	104.4	0.0001	
287	AZFa region	Y q11	3	1.36	1.1	126.3	0.0001	



# Klinická interpretace významu detekovaných CNVs\*

(\*copy-number variant)

- **Typ CNV** – mikrolece, mikroduplikace
- **Původ CNV** – *de novo* x familiární výskyt
- **Funkce genů uvnitř CNV** – korelace genotyp-fenotyp
- Informace v **klinických databázích** – PUBMED, UCSC, OMIM, DECIPHER
- **Velikost CNV** – je spolehlivým kritériem?



**Děkuji za  
pozornost**

---

