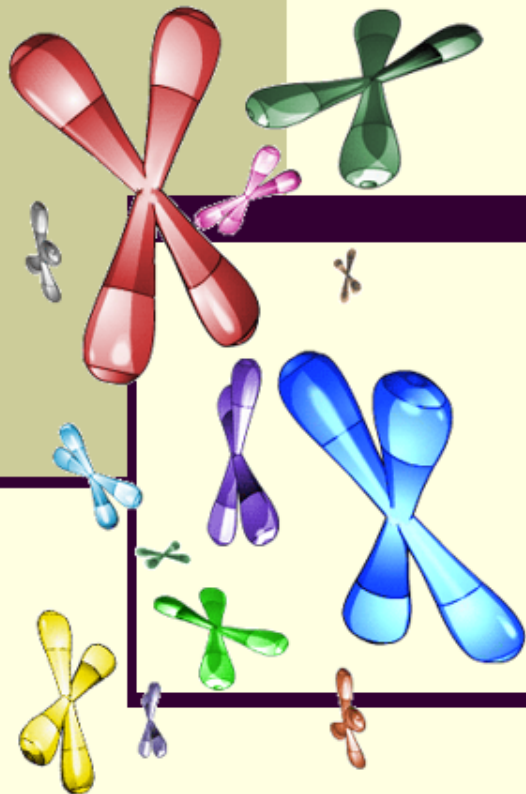


Metody molekulární cytogenetiky

Mgr. Hana Filková

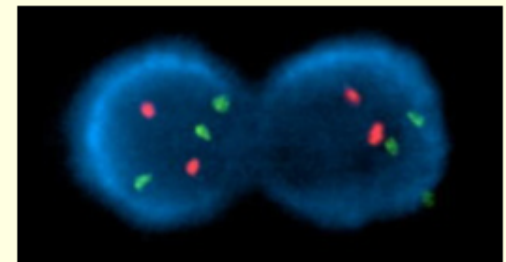


Oddělení lékařské genetiky
FN Brno



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 mitóz, 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

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

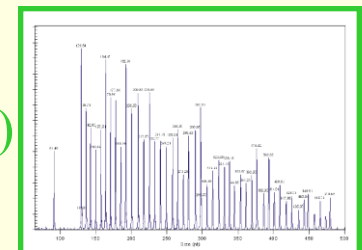
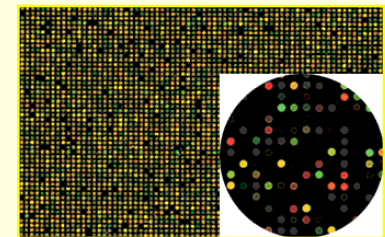
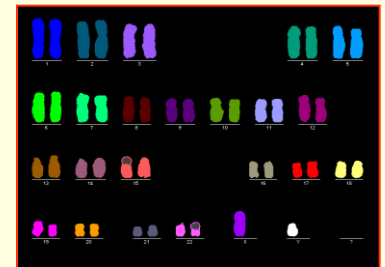
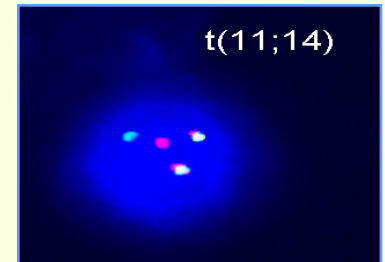
Array-CGH

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

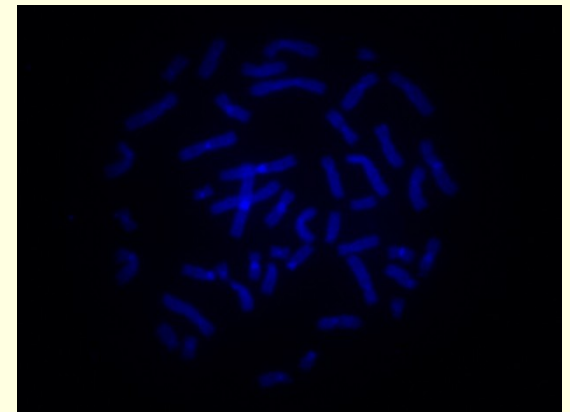
- 1969 Parduová a Gall - radioaktivní značení
- 1986 Pinkel a spol. - fluorescenční značení (FISH)

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

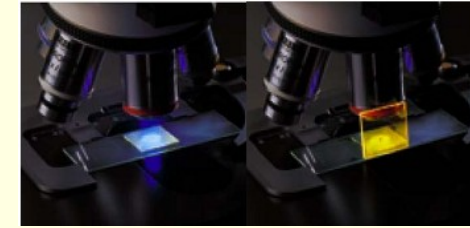
Postup FISH

Zhotovení kvalitních preparátů

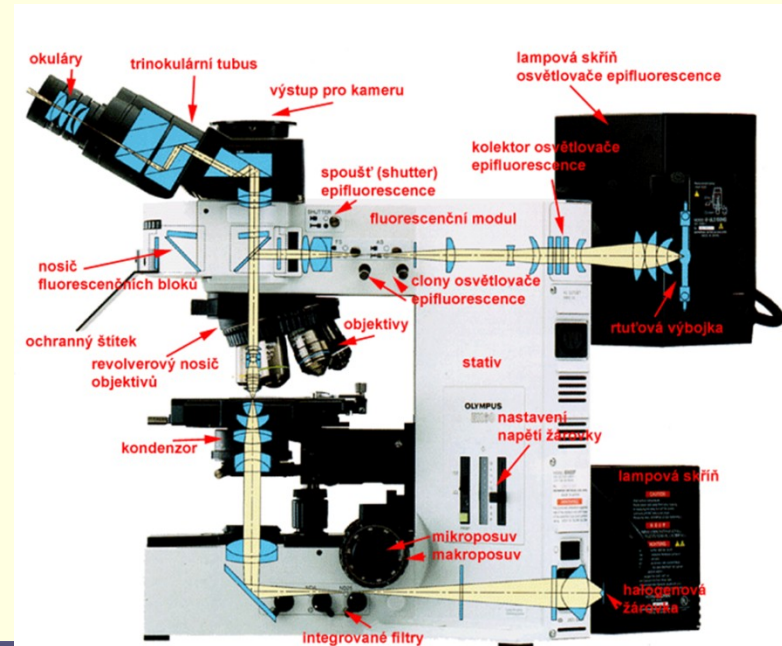
1. Denaturace sondy i cílového místa
2. Hybridizace
3. Odmytí
4. Barvení pozadí
5. Hodnocení pomocí fluorescenčního mikroskopu



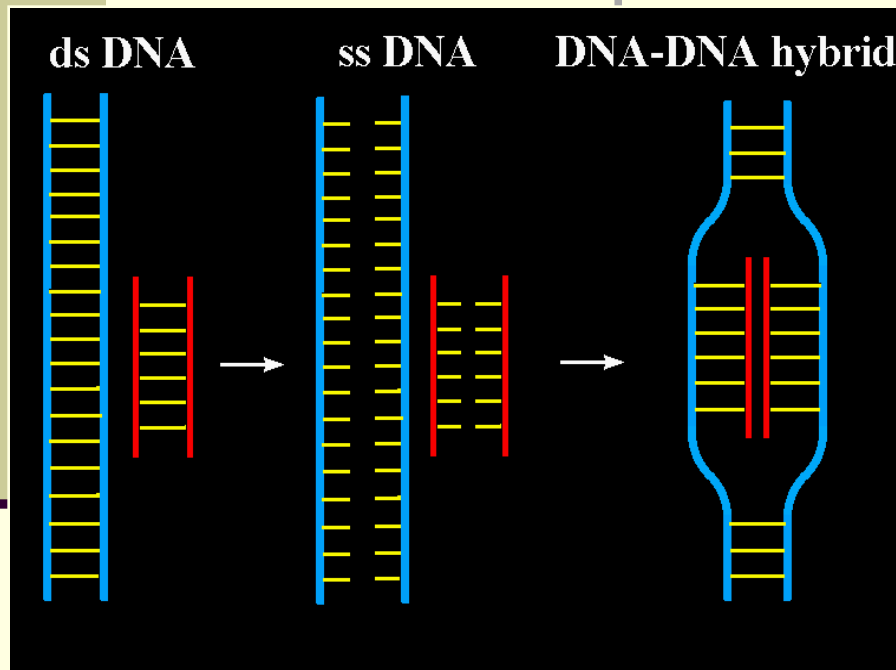
FISH Vybavení



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

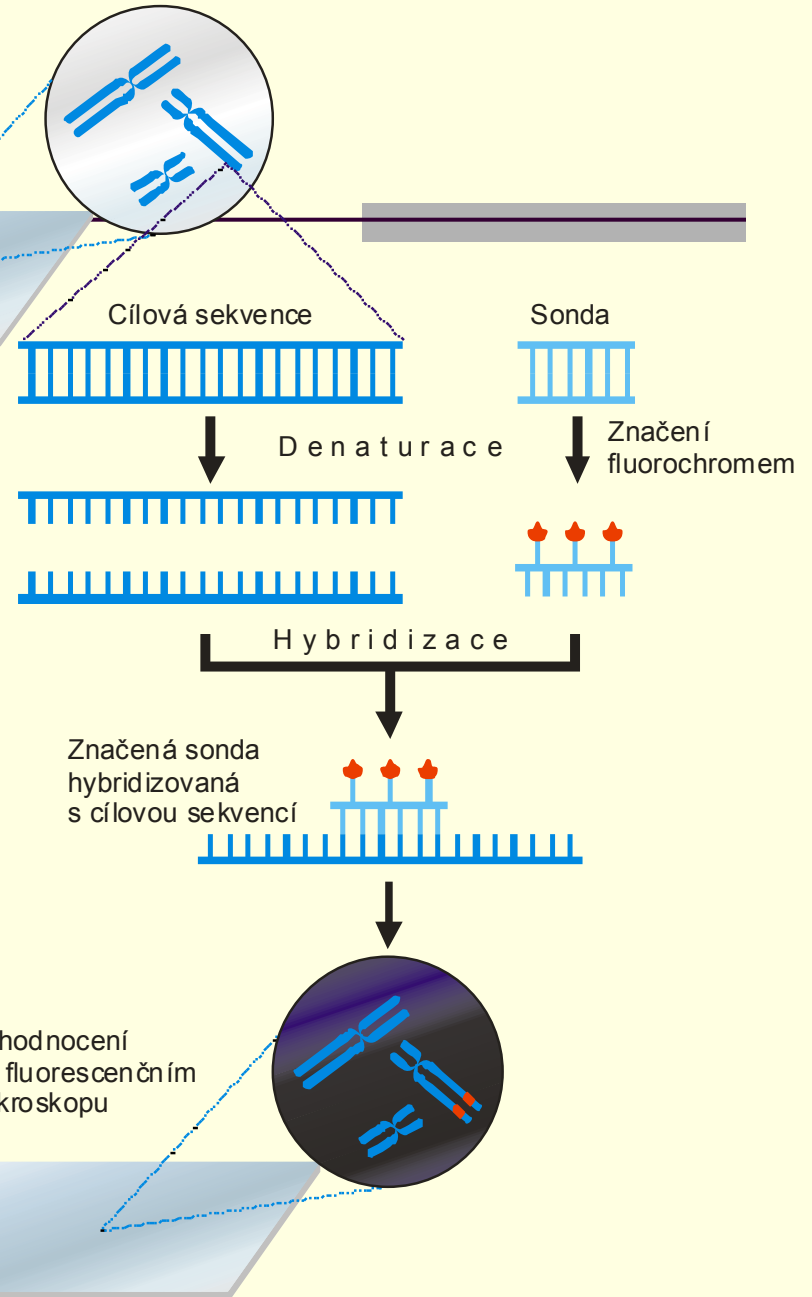



FISH



Příprava chromozomových preparátů

FISH



FISH : Typy sond

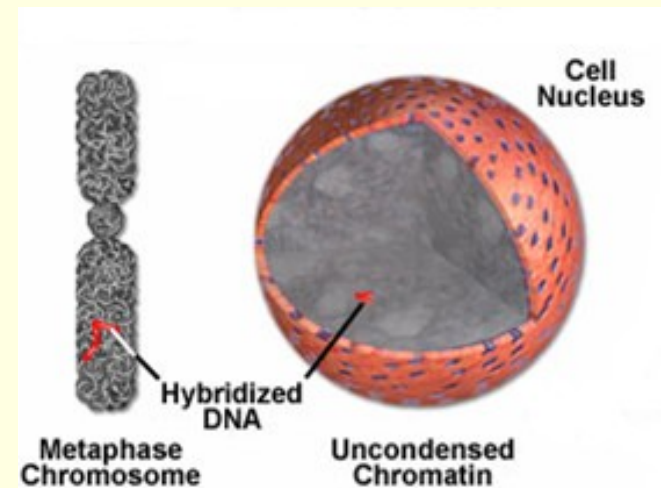
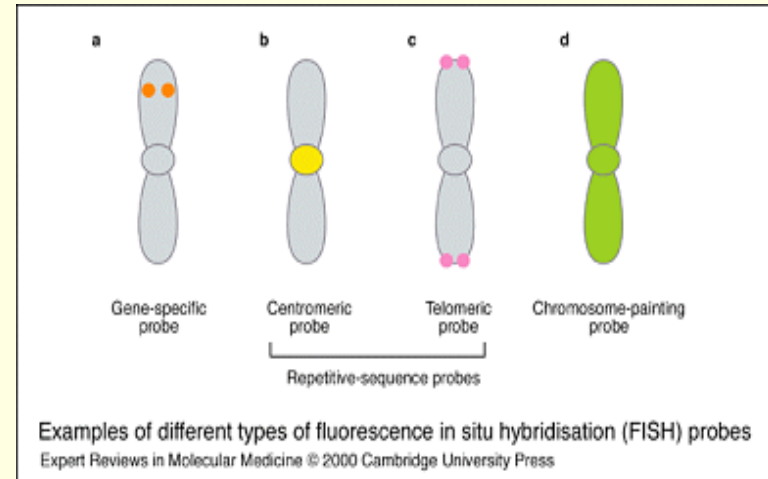
- Celochromozomové
- Centromerické
- Sondy subtelomerické
- Sondy lokus specifické

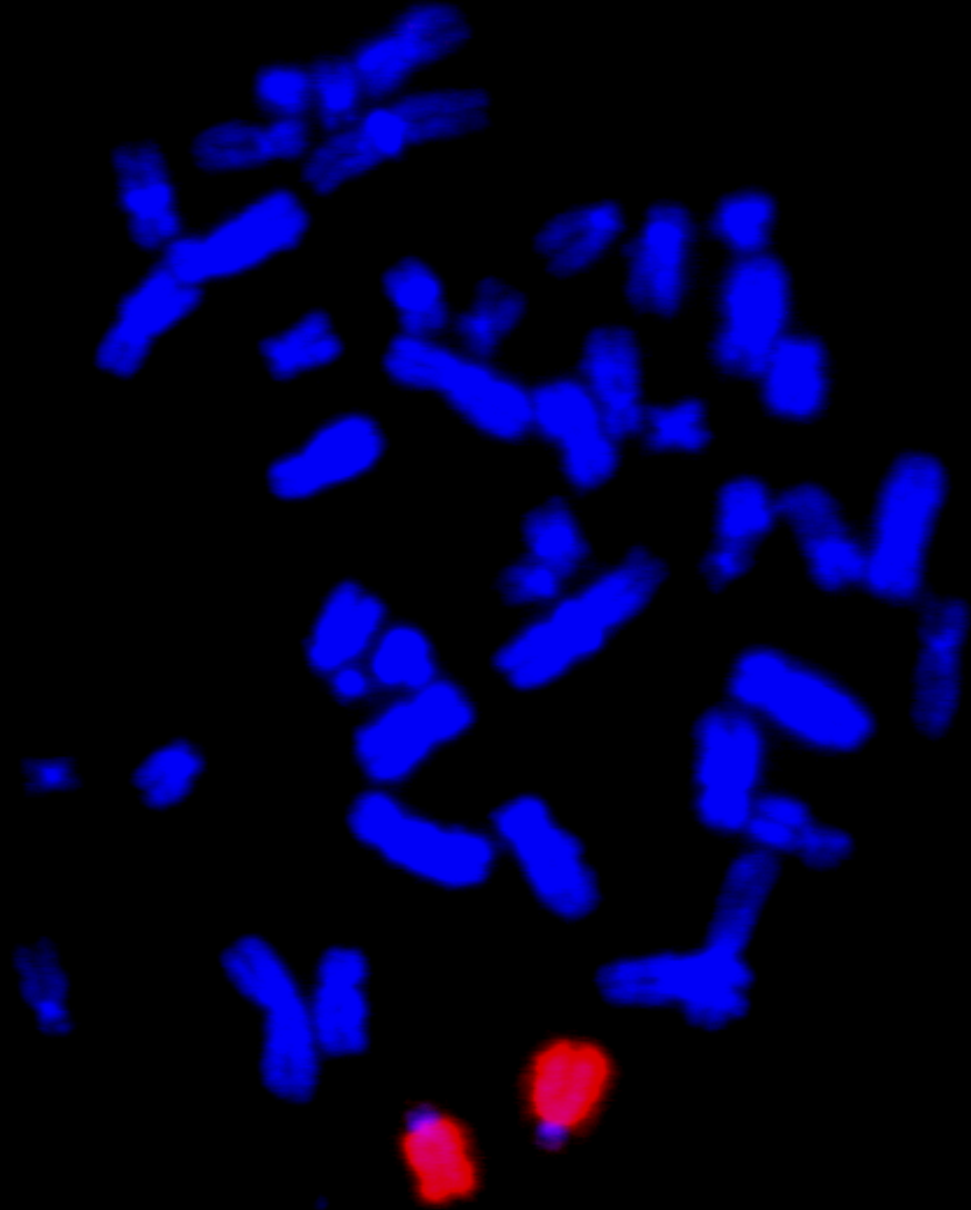
Sondy pro jedinečné sekvence:

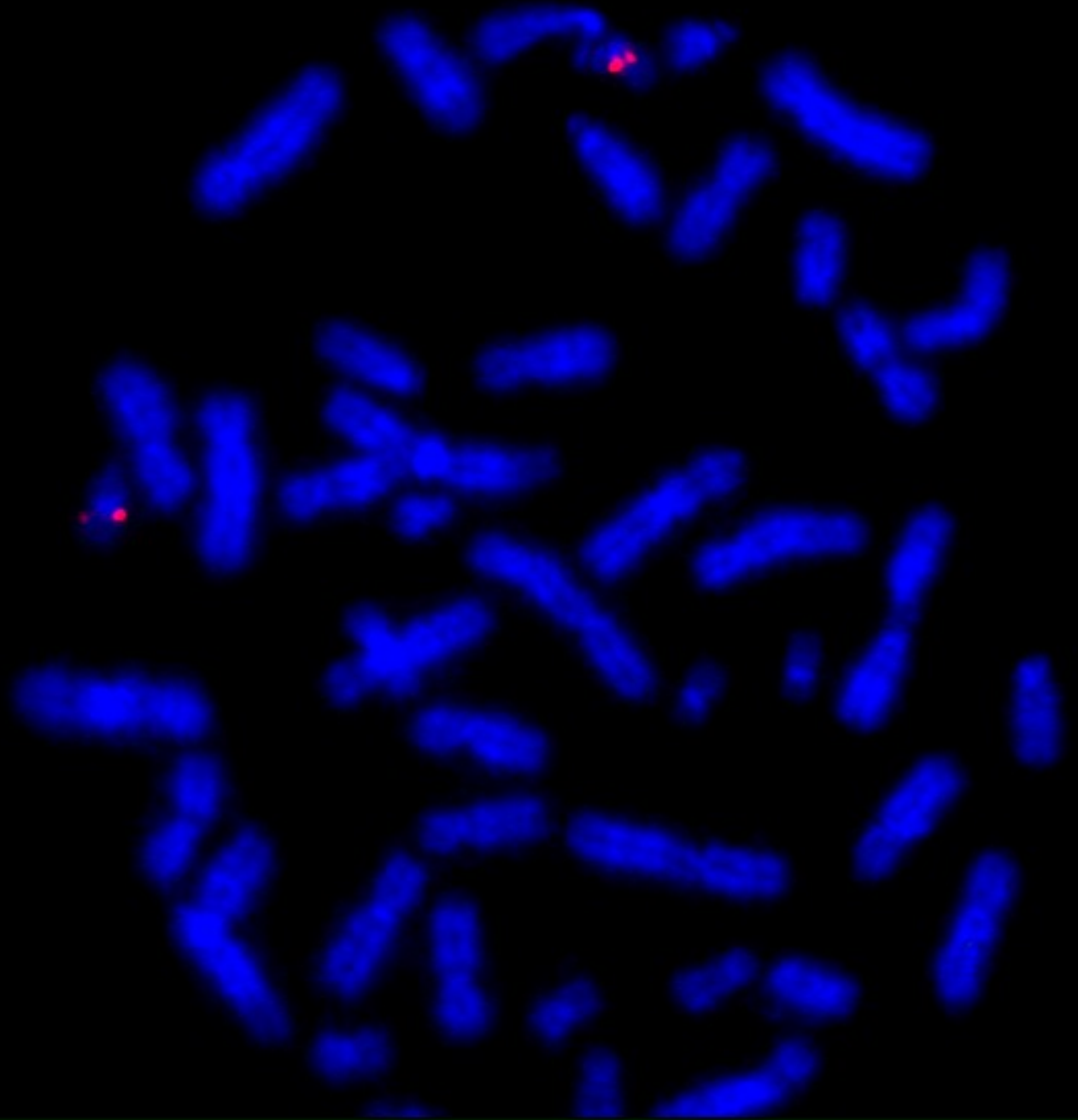
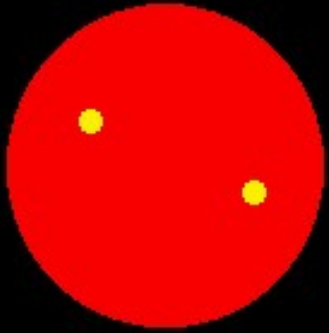
- plazmidové (500pb-5 kb)
- kosmidové (20-50 kb)
- bakteriofág lambda (8-15 kb)
- YAC klony (50-1000 kb)

Značení DNA sond

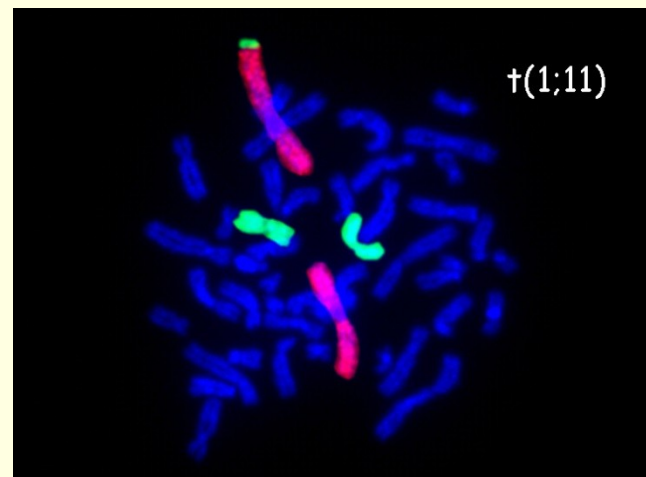
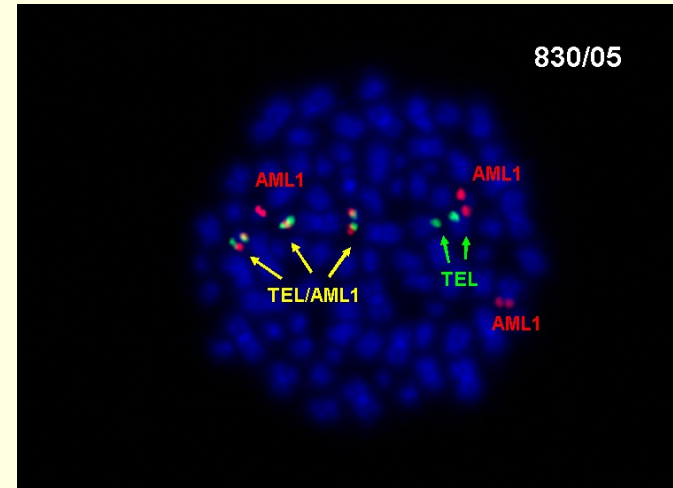
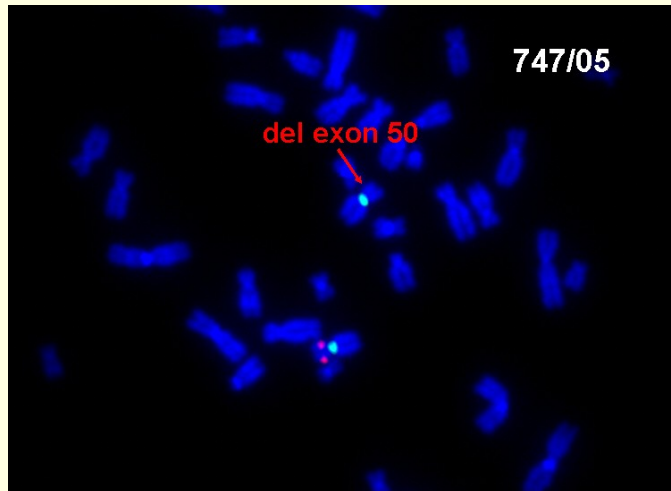
- **fluorochromy**, Texas Red, Spectrum Green, Spectrum Orange, FITC, TRITC, SpectrumAqua, SpectrumGold, aj







FISH : Přítomnost, počet a poloha signálů



Mnohobarevná FISH (M FISH)

Spektrální karyotypování (SKY)

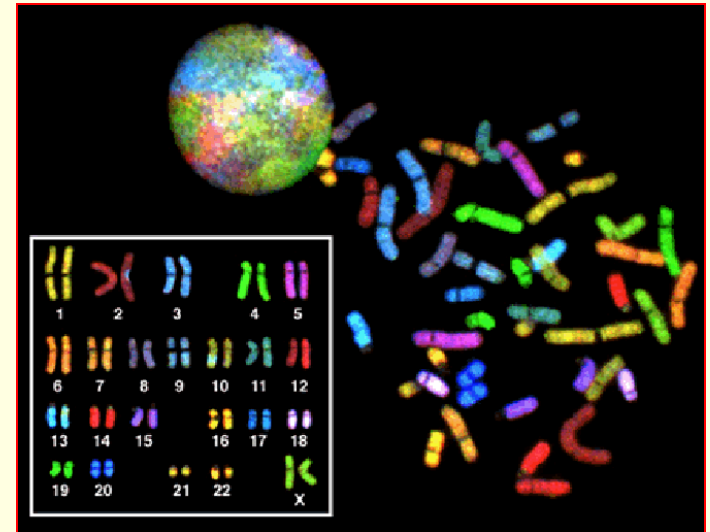
vícebarevné FISH techniky – detekce více značených sond na jednom preparátu

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

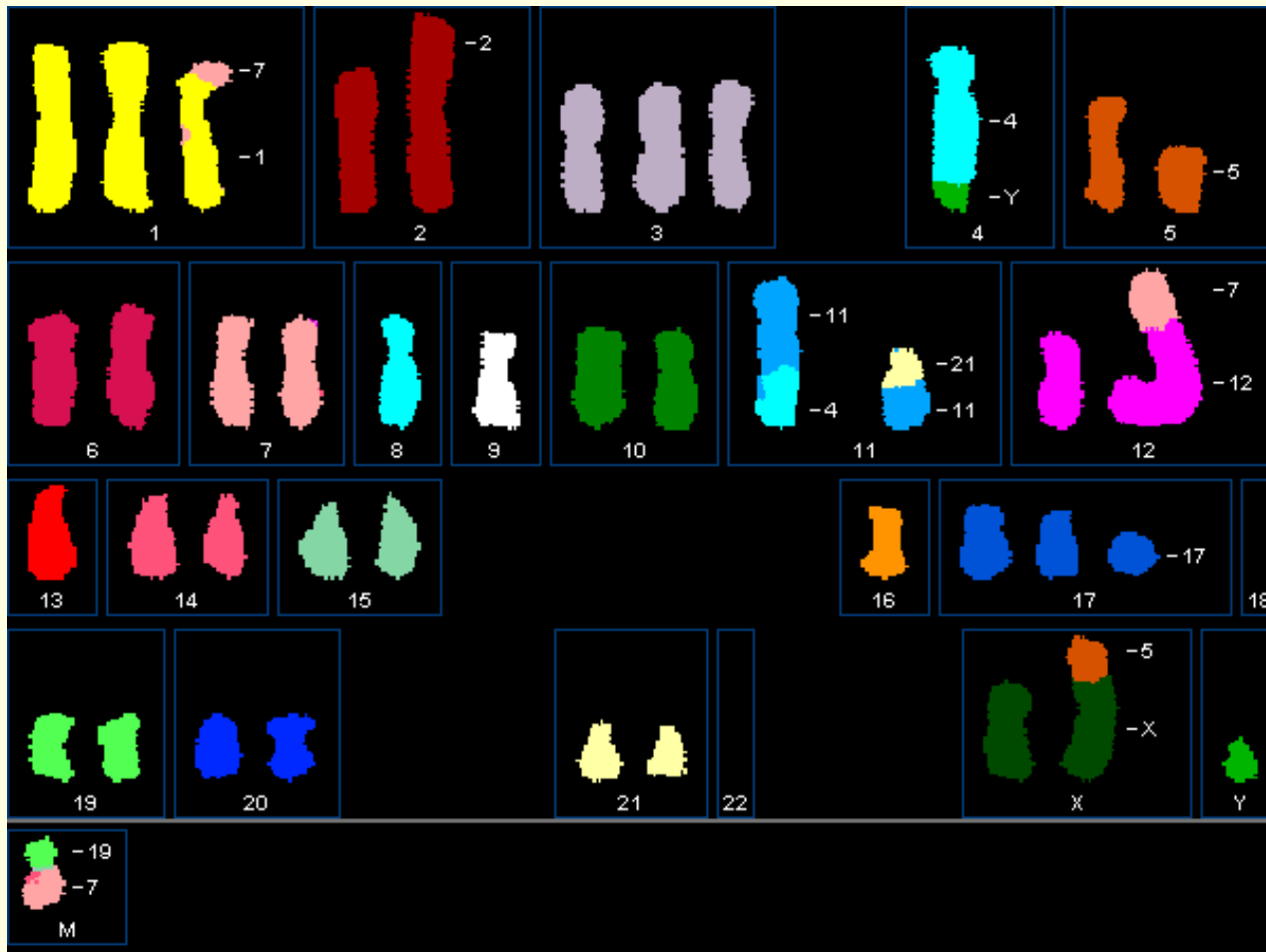
Spectrum
 556
 500 600 700
 Reference: A B C D E F
 Markers: a b c d e f g
 Under the Cursor Normalization

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

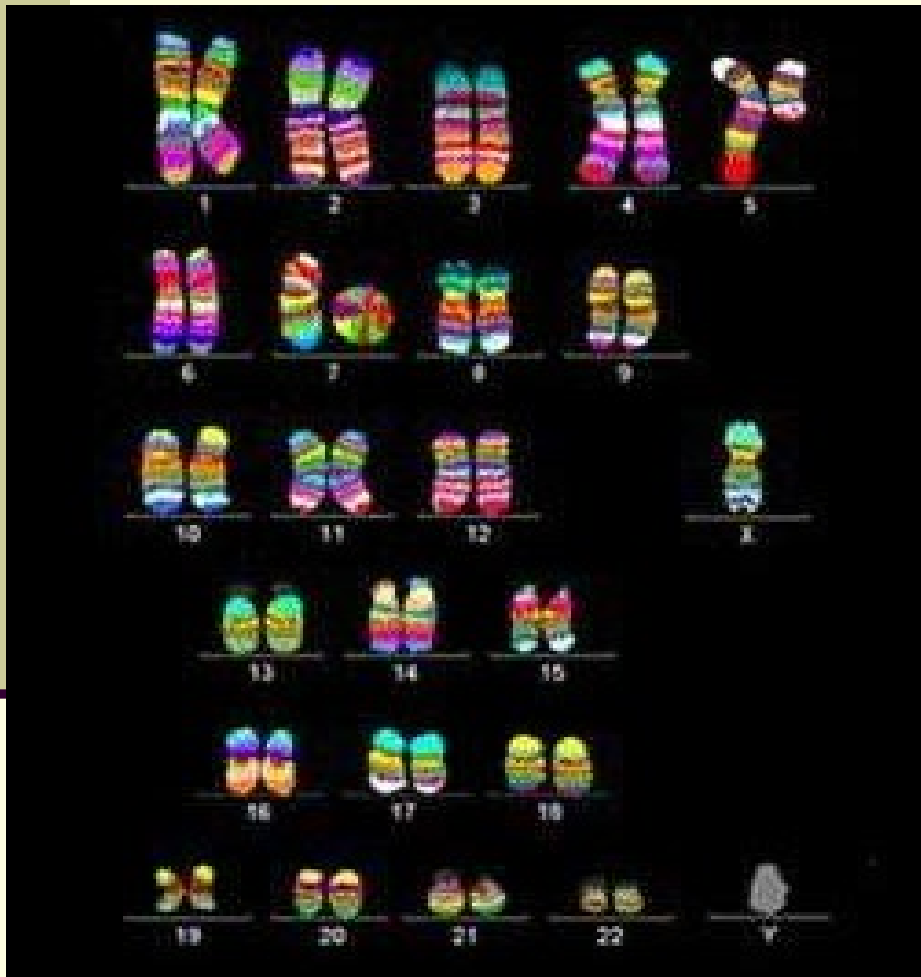
For Help, press F1
 0%
Chromosomes: 46
Out of image 88%

SKY - komplexní karyotyp

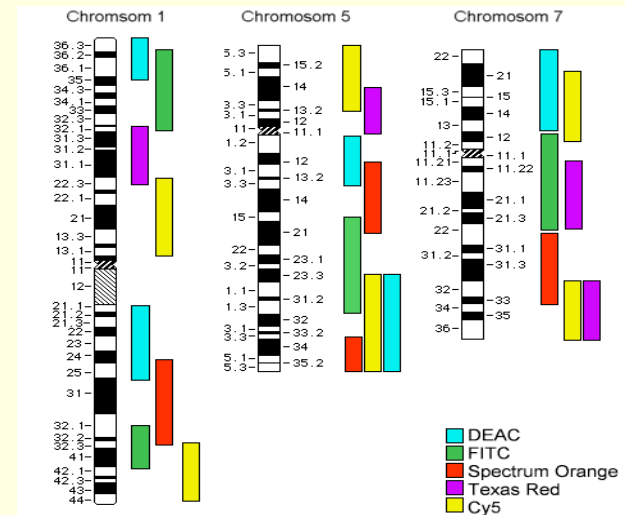


Obr. 10 (Dokumentace OLG FN Brno)

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

Array CGH

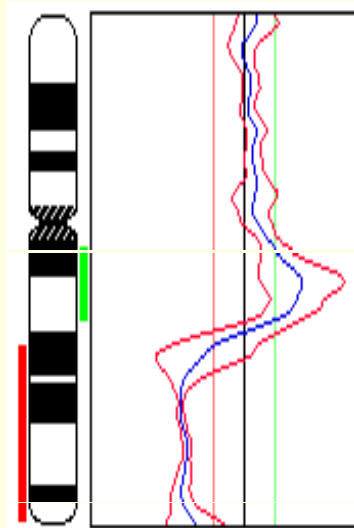
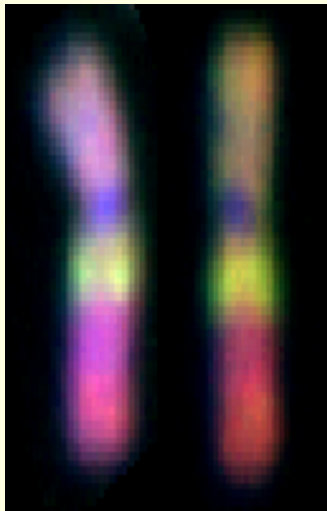
Materiál:

- **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)

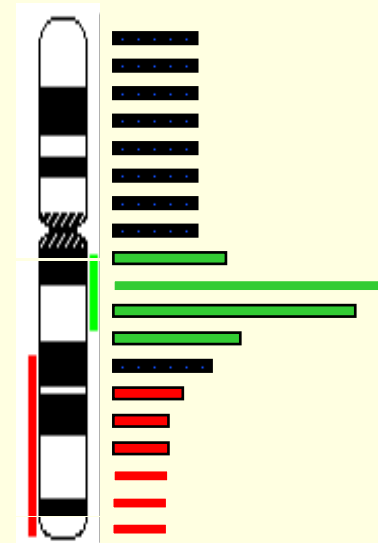
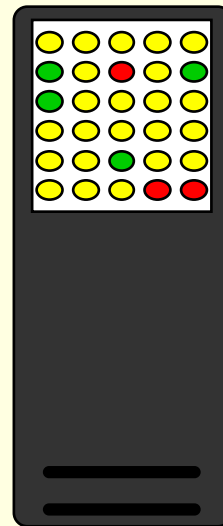
Původ metody array-CGH

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

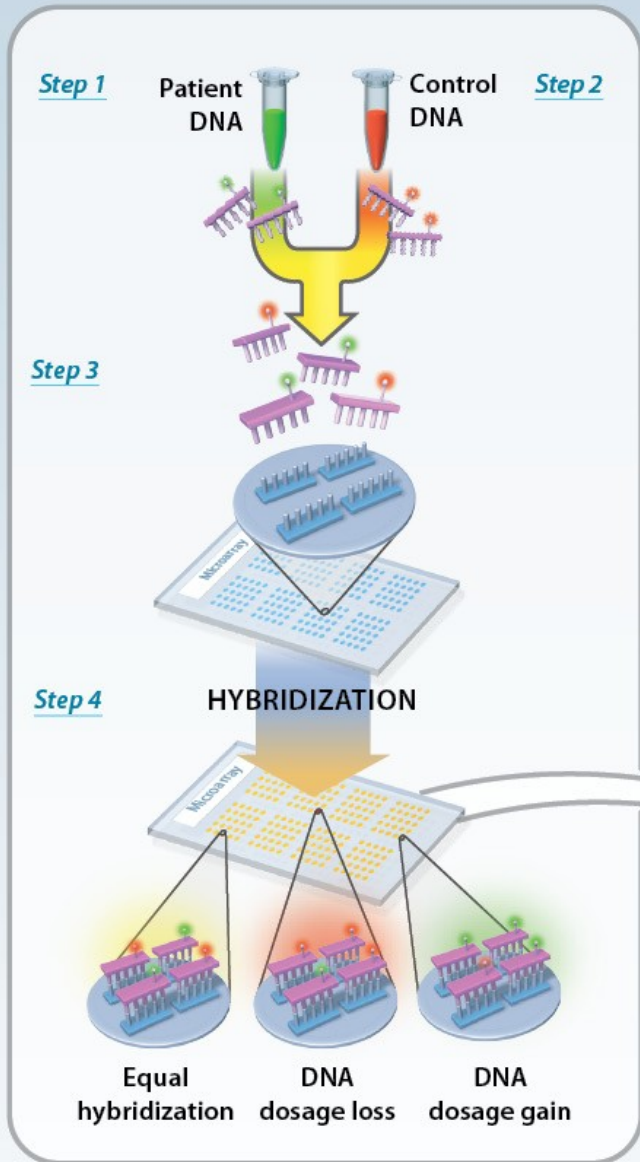
CGH



Array-CGH



Array CGH: proces

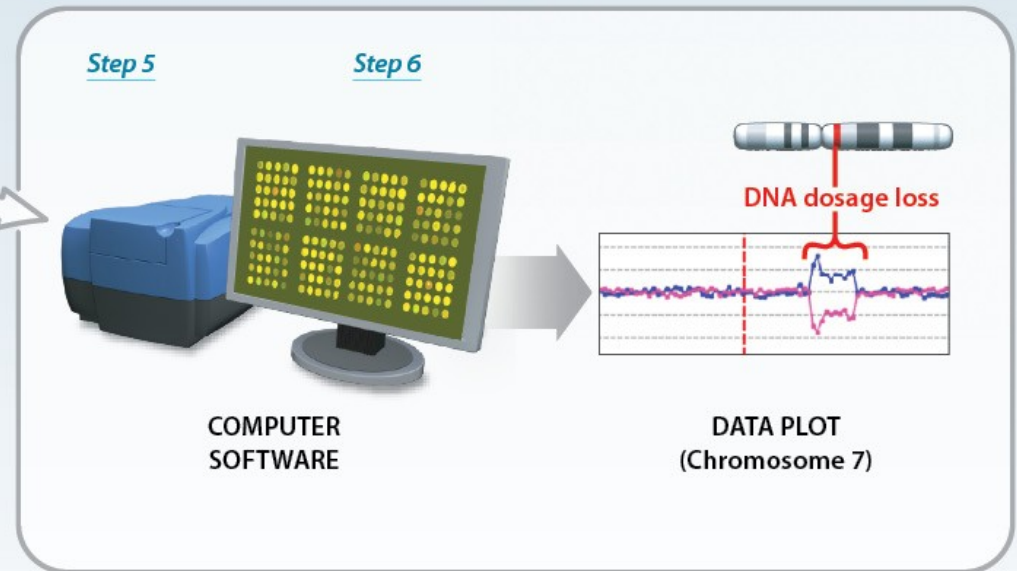


Krok 1-3: DNA pacienta a DNA reference jsou fluorescenčně značeny a aplikovány na mikročip

Krok 4: Kompetitivní hybridizace DNA na mikročip

Krok 5-6: Intenzita signálů je měřena pomocí skeneru mikročipů

Krok 7: Počítačový software analyzuje data a generuje profily



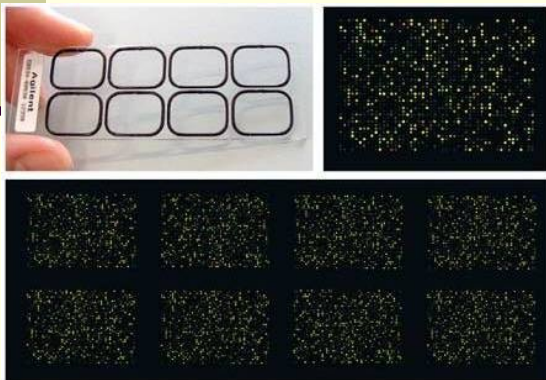
Agilent Human CGH Microarray

Oligo arrays

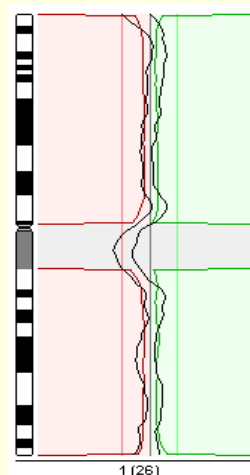
- 8x15K custom chip
- 4x44K 43 kb rozlišení
- 2x105K 21 kb rozlišení
- 1x244K 9 Kb rozlišení

Nové typy – Sure Print G3 Human

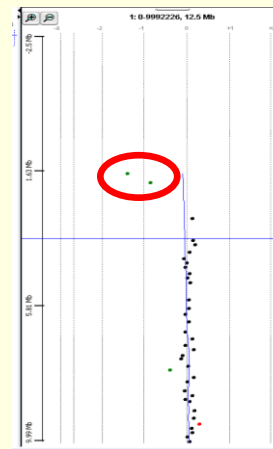
- 8x60K 41 Kb rozlišení
- 4x180K 13 Kb rozlišení
- 2x400K 5 Kb rozlišení
- 1x1M 2 Kb rozlišení



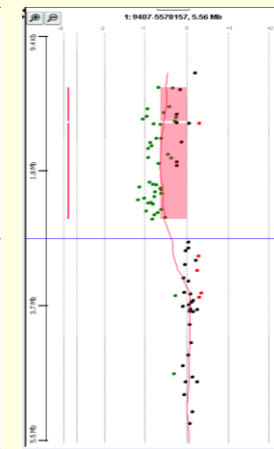
del(1)(p36), cca 3 Mb



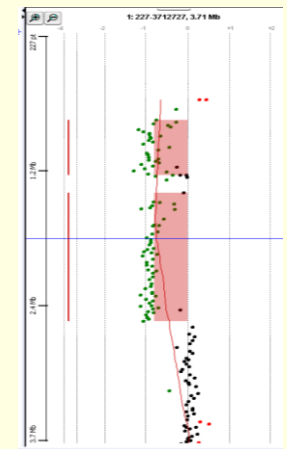
HRCGH
negativní



8x15K
negativní



4x44K
del(1)(p36)



2x105K
del(1)(p36)

Výhody a nevýhody metody array-CGH

- + Celogenomový screening nebalancovaných submikroskopických chromosomových aberací
- + Rozlišení dáno parametry použitého mikročipu
- + Nevyžaduje přítomnost mitóz
- + Možnost detekce mozaiek (< 30 % dle kvality vyšetření)

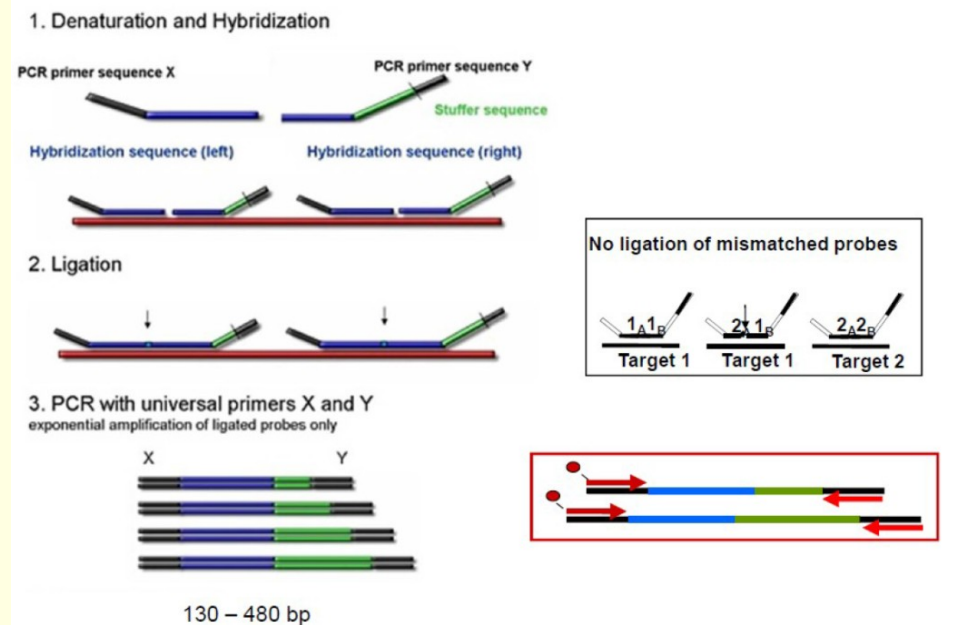
- Genomová DNA o dostatečné koncentraci a integritě
- Není možné detekovat balancované přestavby chromosomů, ani změny ploidie
- Vyšší cenové náklady
- Zkušenosti s interpretací vzácných nálezů - práce s databázemi, literaturou

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...)

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification - MLPA

- jedná se o speciální formu multiplex PCR, při které se amplifikují MLPA sondy a ne zkoumaná DNA
- **detekuje změny počtu kopií (především rozsáhlejších delecí/duplikací) až 50 specifických sekvencí v jedné PCR reakci**
- dokáže odlišit sekvence lišící se v jediném nukleotidu;
- další aplikace – stanovení SNP, metylace v promotorové oblasti



MLPA princip

Citlivá:

jen 20 ng DNA

Specifická:

MLPA je schopná odlišit sekvence lišící se v jediném nukleotidu

Jednoduchá:

MLPA reakci je možné uskutečnit v jedné zkumavce

Relativně levná metoda:

Kit obsahuje všechny potřebné reagenty, potřebné vybavení je běžnou součástí všech molekulárně-biologických laboratoří

MLPA princip

**Syntetický oligonukleotid
50-60 bp**

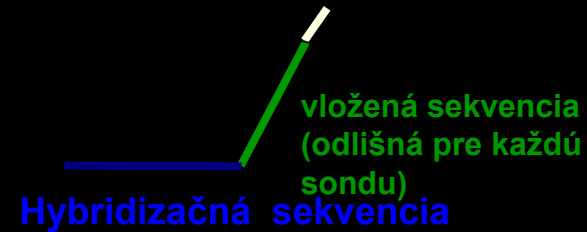
PCR primer Y



Hybridizačná sekvencia

**M13-derivovaný oligonukleotid
60-450 bp**

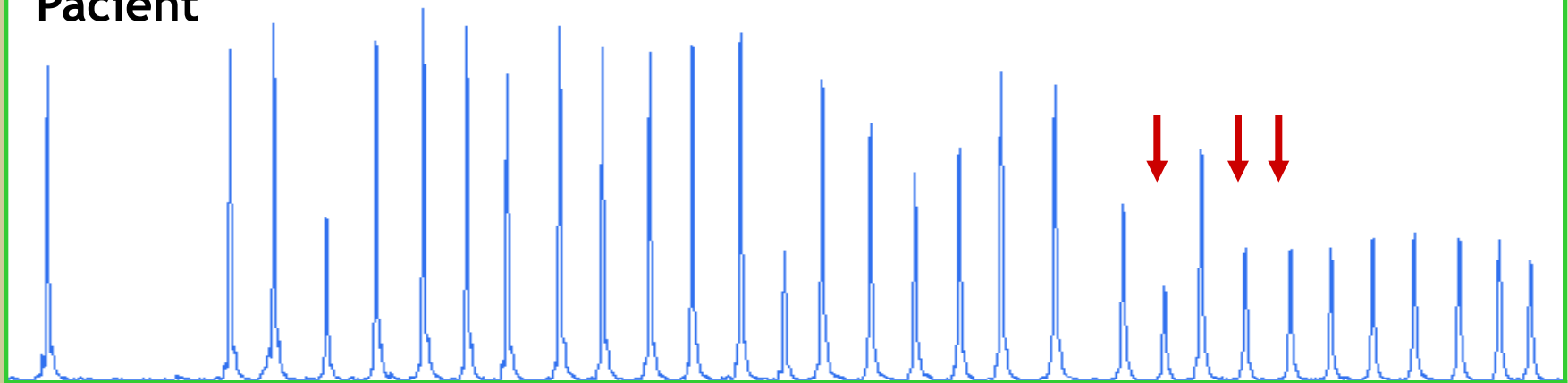
PCR primer X



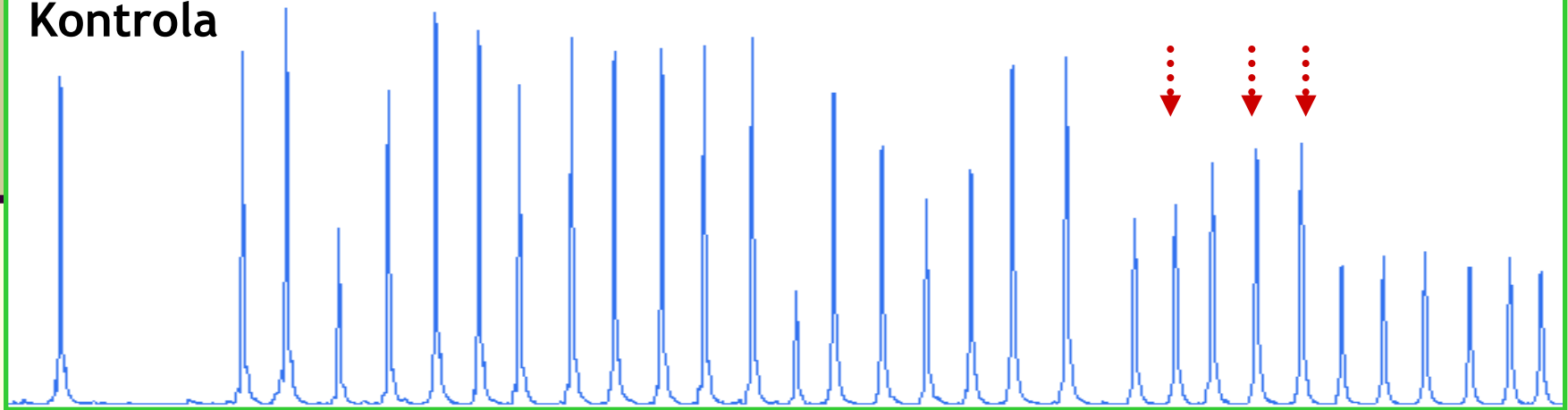
Hybridizačná sekvencia

MLPA princip

Pacient



Kontrola



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

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

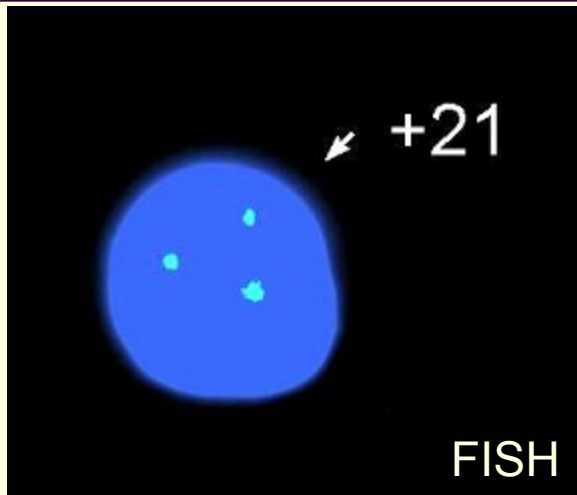
Detekce strukturních změn:

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

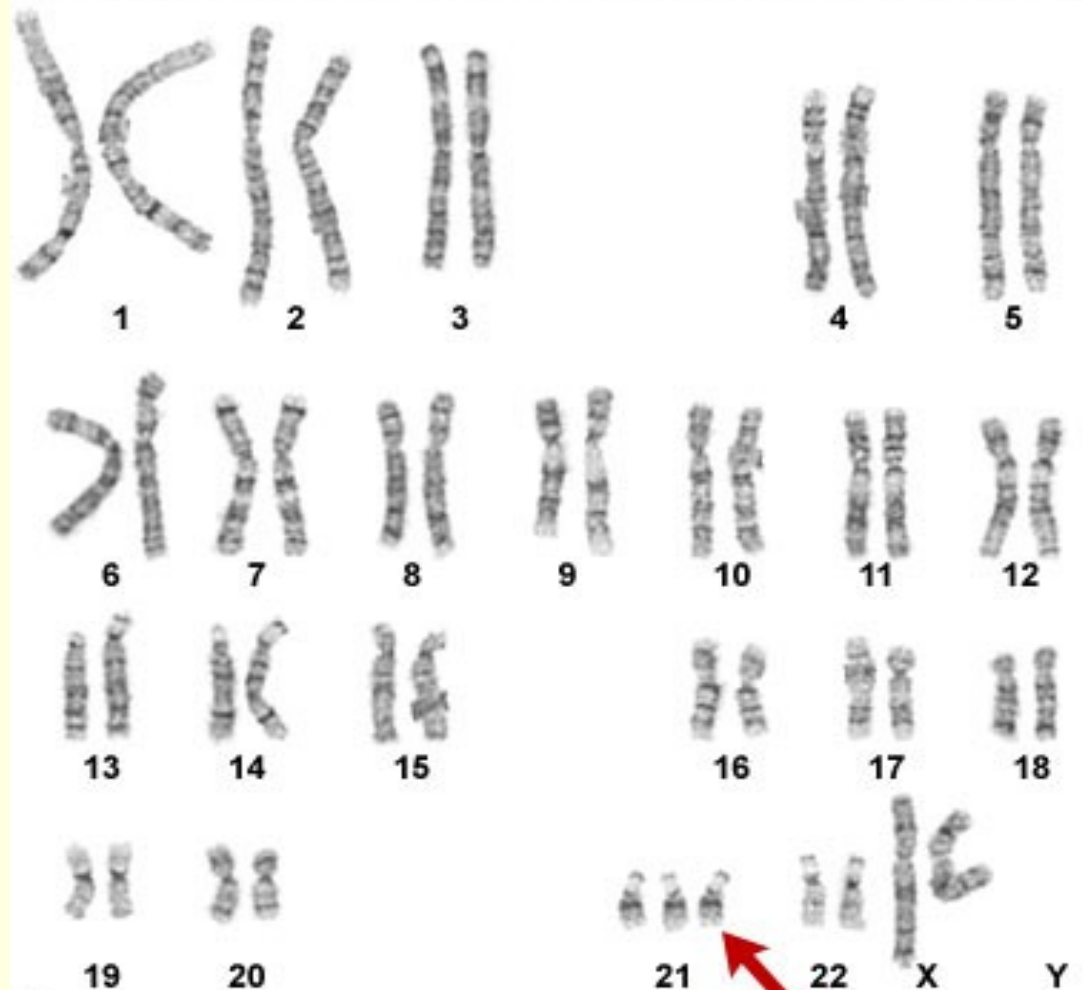
Detekce LOH, UPD

Využití metod molekulární cytogenetiky (příklady)

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



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



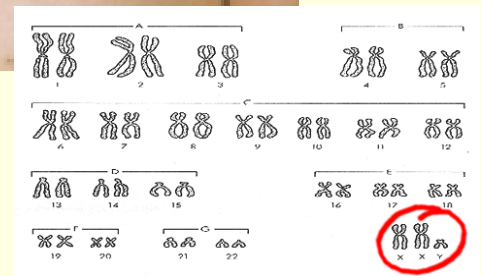
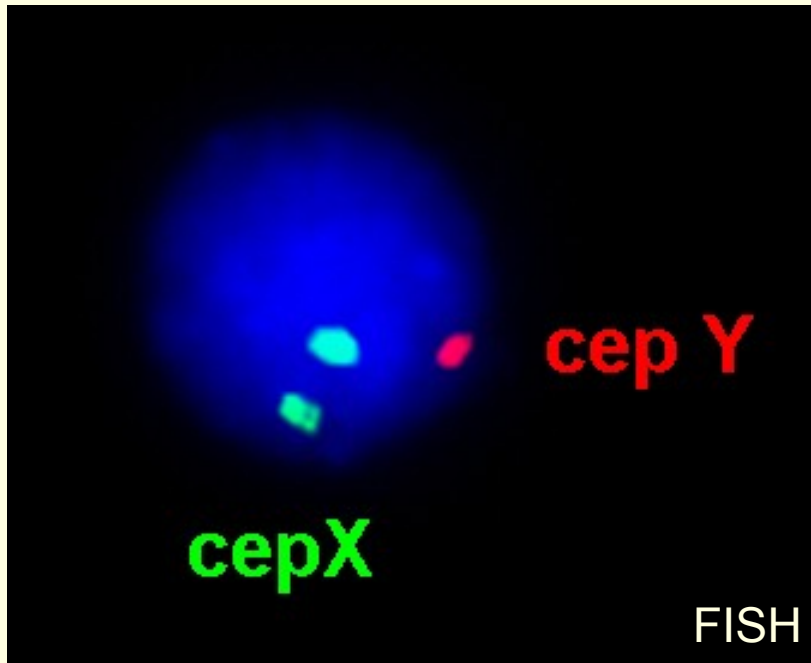
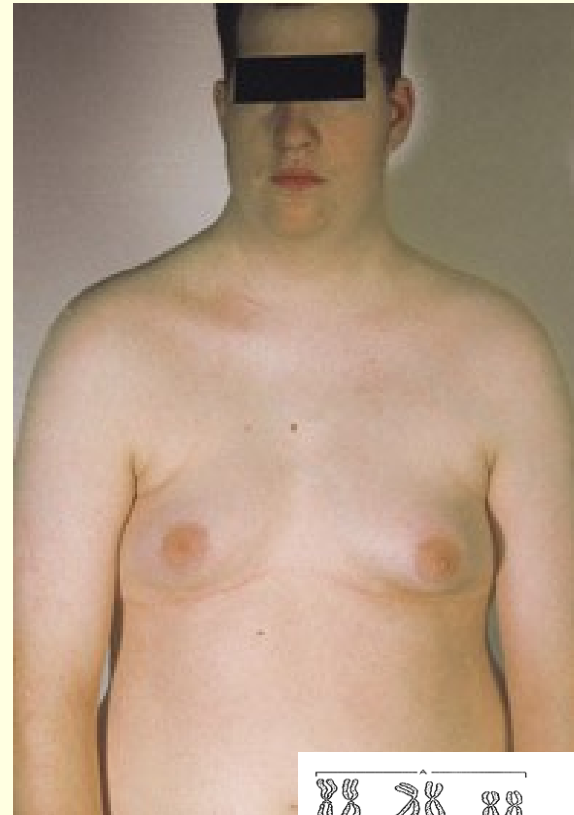


Využití metod molekulární cytogenetiky

(příklady)

numerické změny: Klinefelterův syndrom

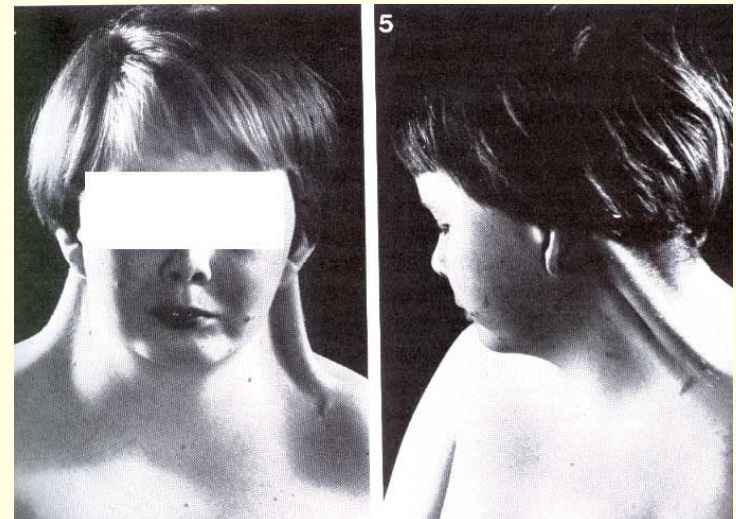
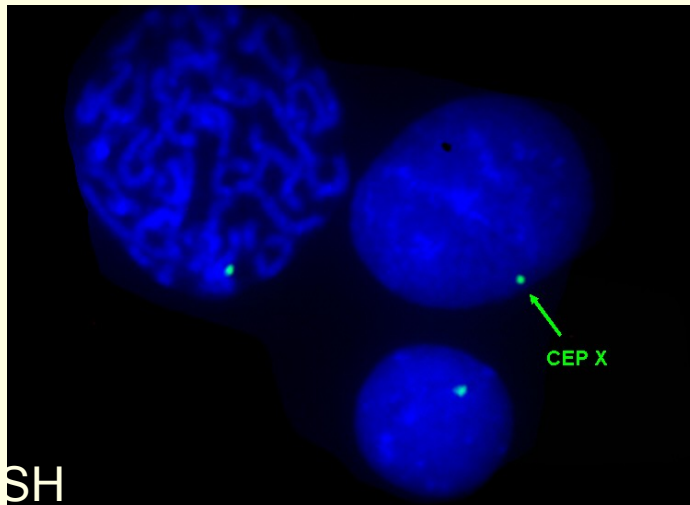
- **47,XXY**
- vysoká postava, porucha růstu vousů, ženská distribuce podkožního tuku, PMR



Využití metod molekulární cytogenetiky (příklady)

numerické změny: Turnerův syndrom

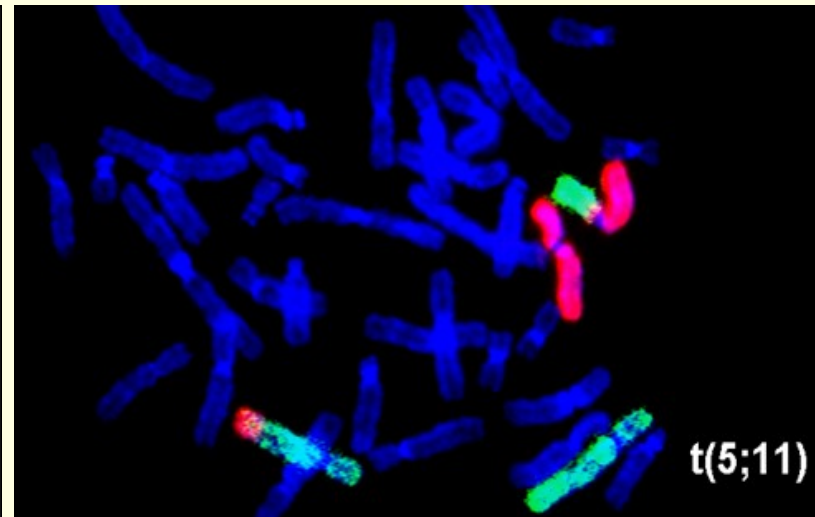
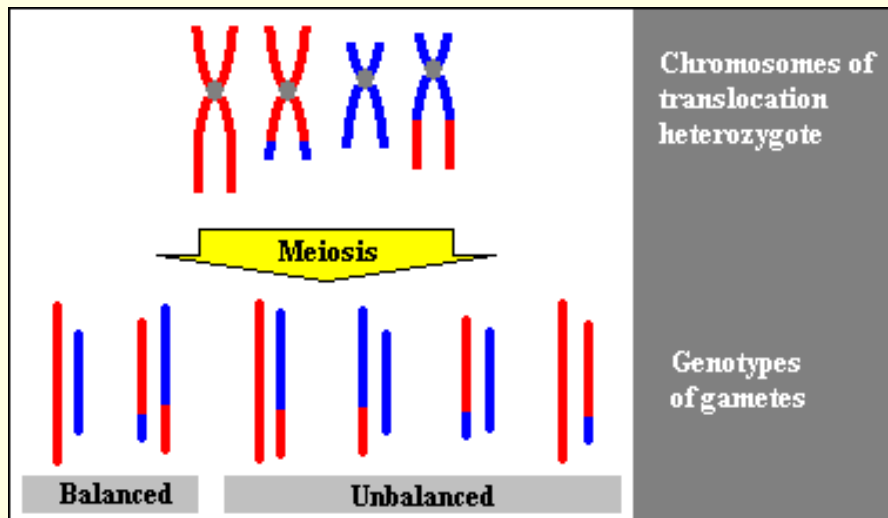
- **45,X**
- chybí jeden chromozom X
- 1/2500 dívek
- 95 % SA
- malá postava, chybí vaječníky až sterilita



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**

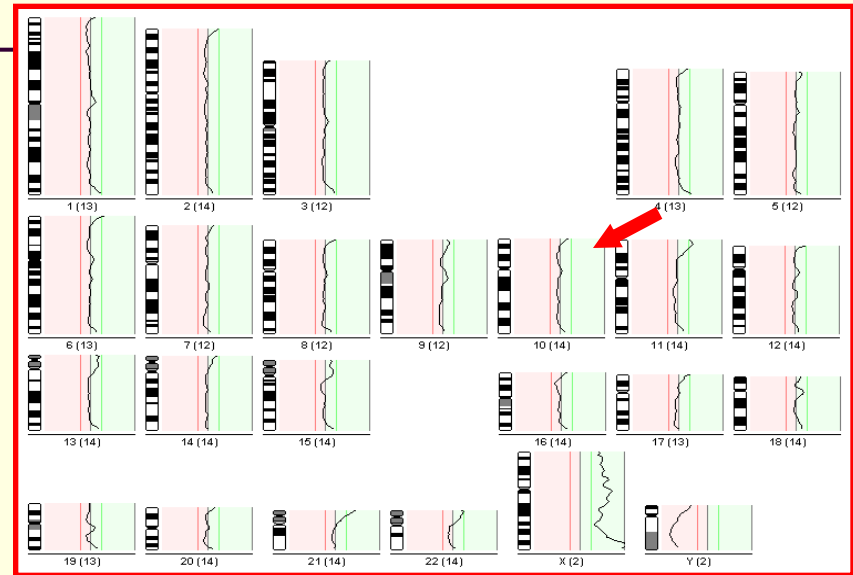


Využití metod molekulární cytogenetiky

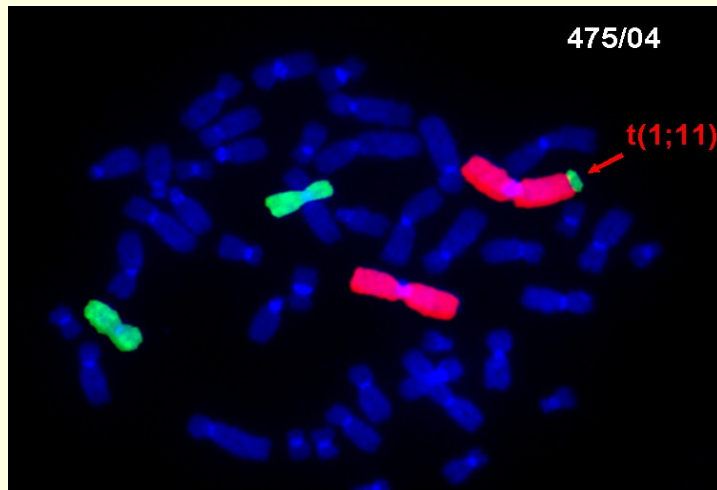
strukturní změny: nebalancované translokace



1. Karyotyp 46,XX,add(1)



2. CGH: rev ish enh (11p15-pter)



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

Využití metod molekulární cytogenetiky

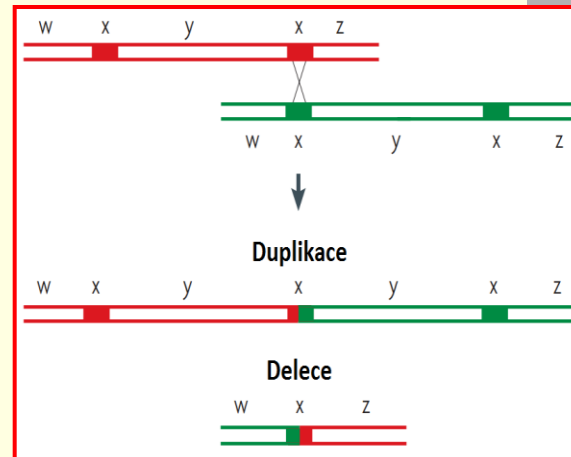
strukturní změny: Mikrodeleční syndromy

- 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 ...

Mikrodeleční syndromy:

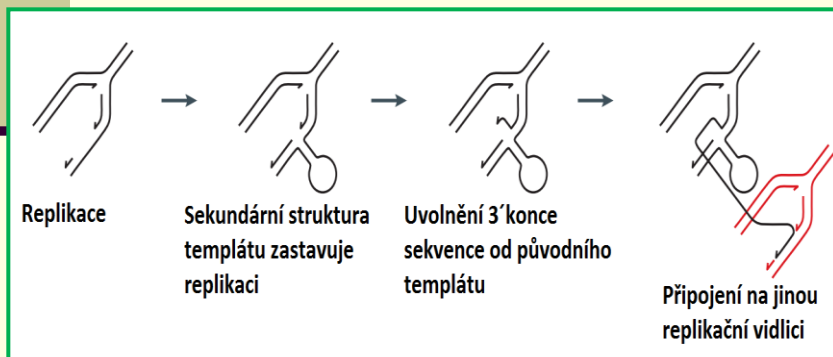
Nejčastější mechanismy vzniku rekurentních a non-rekurentních mikrodelečních/duplikačních syndromů

Rekurentní mikrodelece

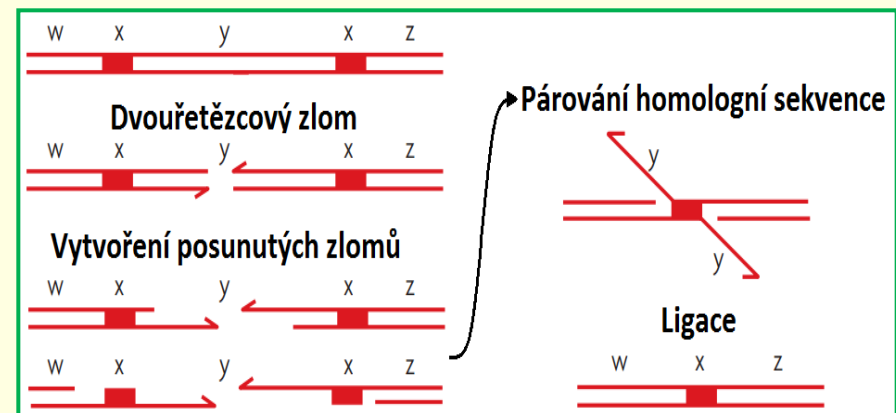


Nerovnoměrná homologní rekombinace

Non-rekurentní mikrodelece



Zastavení replikační vidlice a přeskok na odlišný templát



Spojení nehomologních konců

Mikrodeleční syndromy

Jsou způsobeny mikrodeleci úseku chromozomu – většinou 2 – 4 Mb

Nejčastější rekurentní mikrodeleční syndromy:

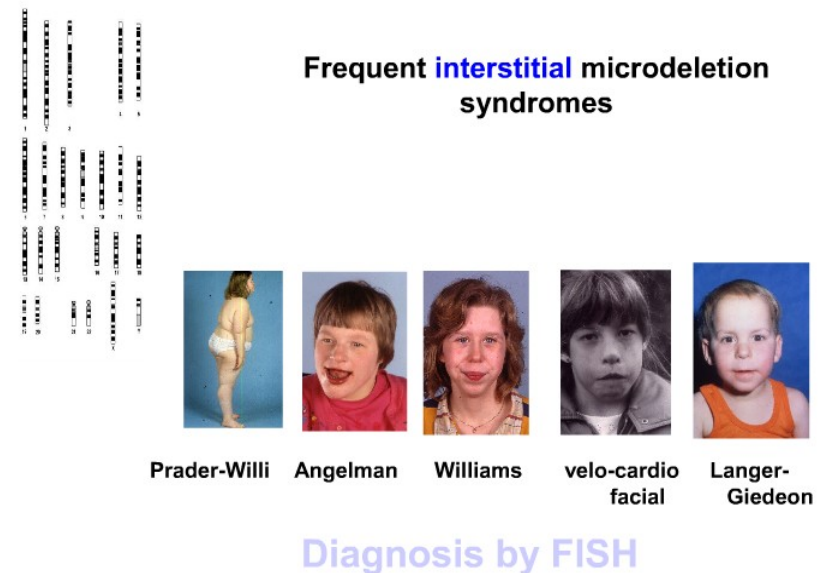
DiGeorgeův/Velokardiofaciální syndrom

Prader-Williho a Angelmanův syndrom

Williamsův-Beurenův syndrom

Obecné příznaky:

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

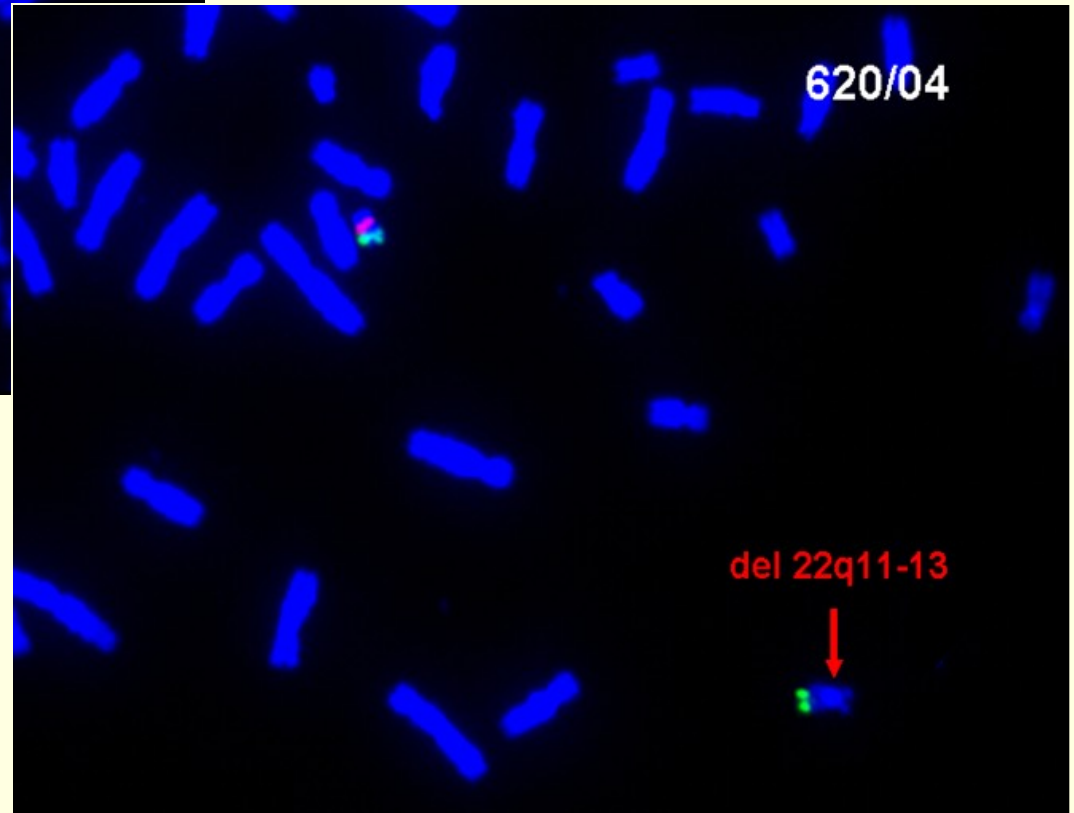
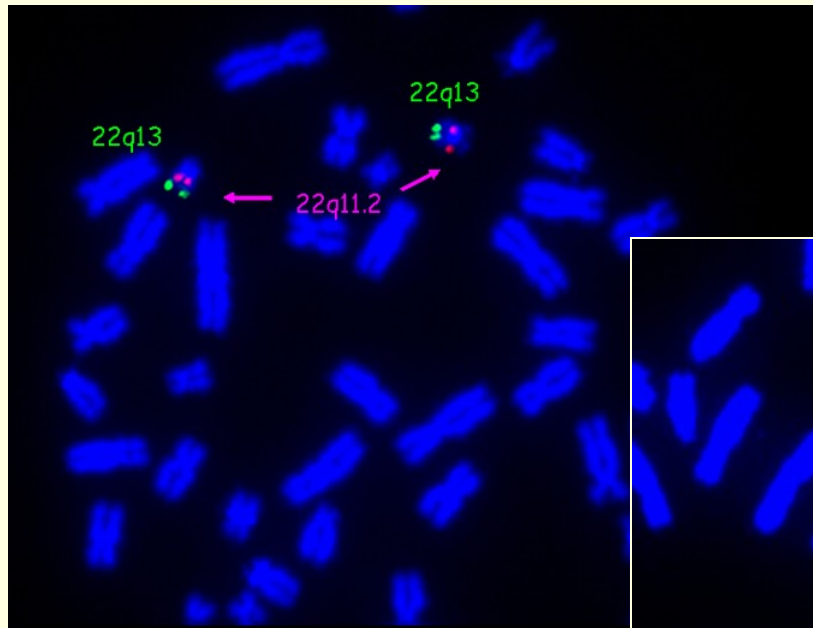


Mikrodeleční syndrom	Lokalizace	Nejčastější velikost přestavby [kb]	Četnost v populaci
DiGeorgeův syndrom/ Velokardiofaciální syndrom	22q11	3 000	1:4 000
Williamsův-Beurenův syndrom	7p11.23	2 000	1:10 000
Smith-Magenisův syndrom	17p11.2	5 000	1:25 000
Prader-Williho syndrom/ Angelmanův syndrom	15q11-q13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

Využití metod molekulární cytogenetiky

FISH: detekce mikrolečních syndromů

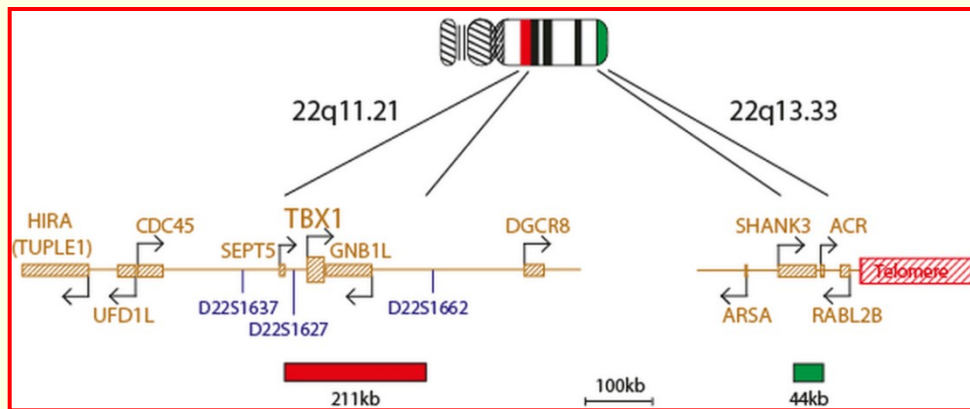
– např. del 22q11 **DiGeorge syndrom**



- SRDEČNÍ VADY
- ANOMÁLIE TVÁŘE
- PORUCHY IMUNITY

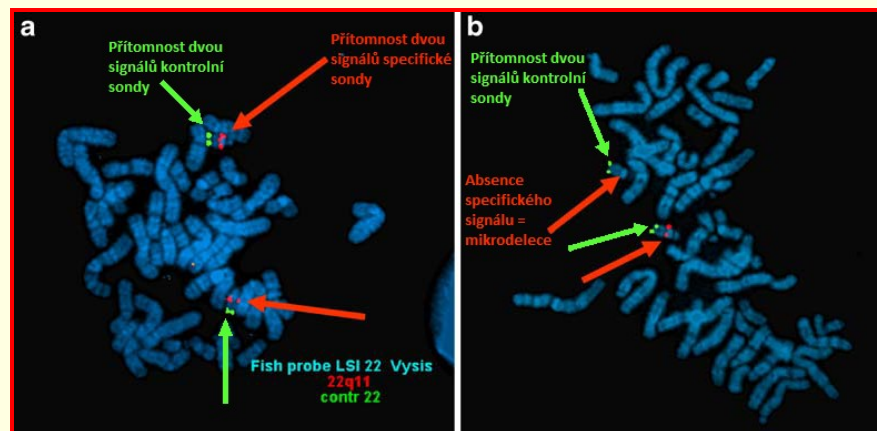
Využití metod molekulární cytogenetiky

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.

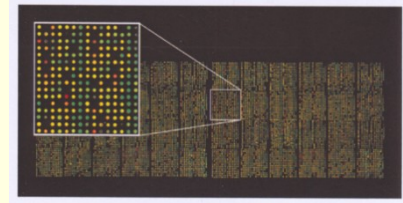
FRSS (n=7)	Probe target info	AllSamples				Reference ...
		MLPA DG 12...	MLPA DG 12...	MLPA DG 17...	MLPA DG kn...	
CAS (n=5)	FMRS	100%	100%	100%	100%	
	PSLP - Relati...	70%	45%	60%	85%	
	FSLP - Relati...	OK	OK	OK	OK	
	RSQ - Referen...	OK	OK	OK	OK	
	RPO - Referen...	Bad	Bad	Bad	Bad	
	RPO - Referen...	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	0.98	0.97	1	
	HIRA-25	0.7	0.98	0.97	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	1.01	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	
	SMARCB1-9	0.85	0.84	0.94	1	
	SMARCB1-1	0.94	1.07	1.08	1	
	SNRPD3-2	0.9	0.86	0.93	1	
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 region...	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

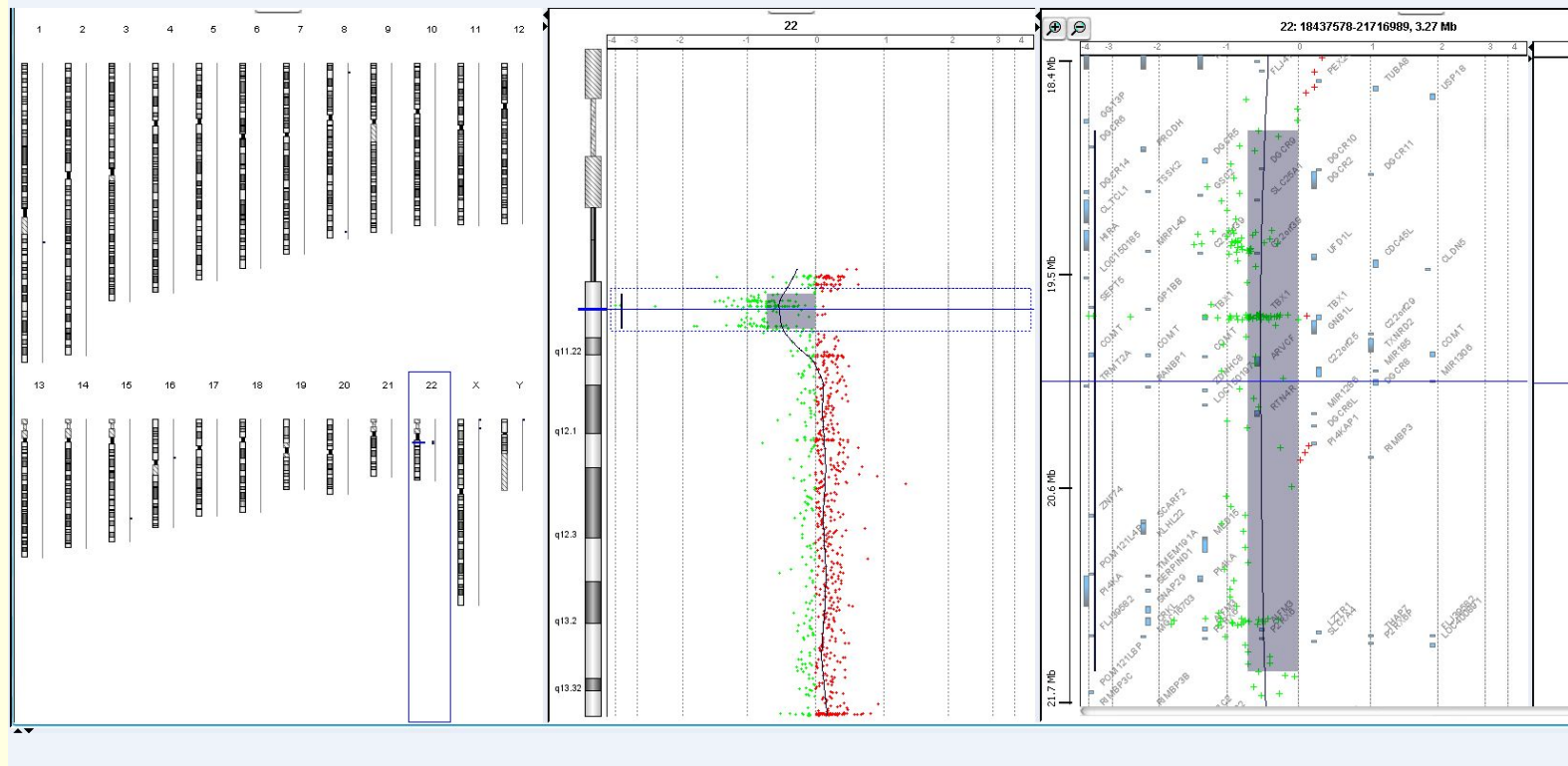
Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position other	22q11
64-70-76-82	Q-fragments (Only visible with <100 ng sample DNA)		
88-92-96	D-fragments (Low signal of 88 or 96 fragment indicates incomplete denaturation)		
100	X-fragment (X chromosome specific)		
105	Y-fragment (Y chromosome specific)		
129	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 mikrolece



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

ISCN: $\text{arr}[\text{GRCh37}] 22\text{q}11.21(18818376_21540347)\times 1$

Využití metod molekulární cytogenetiky

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

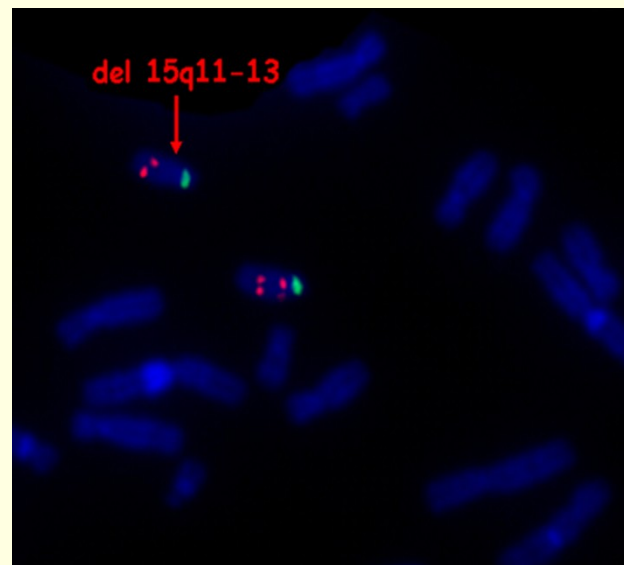
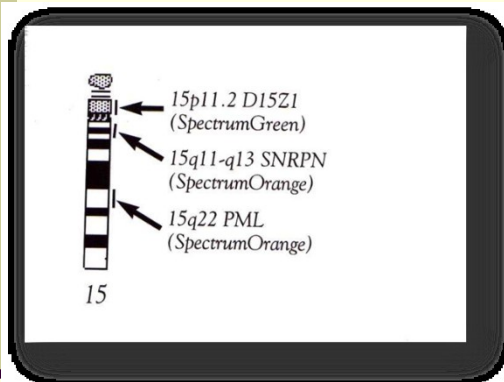
del 15q11-13

Metody pro stanovení diagnózy PWS a AS

Cytogenetické : karyotyp - translokace

Molekulárně cytogenetické : FISH - mikrodelece

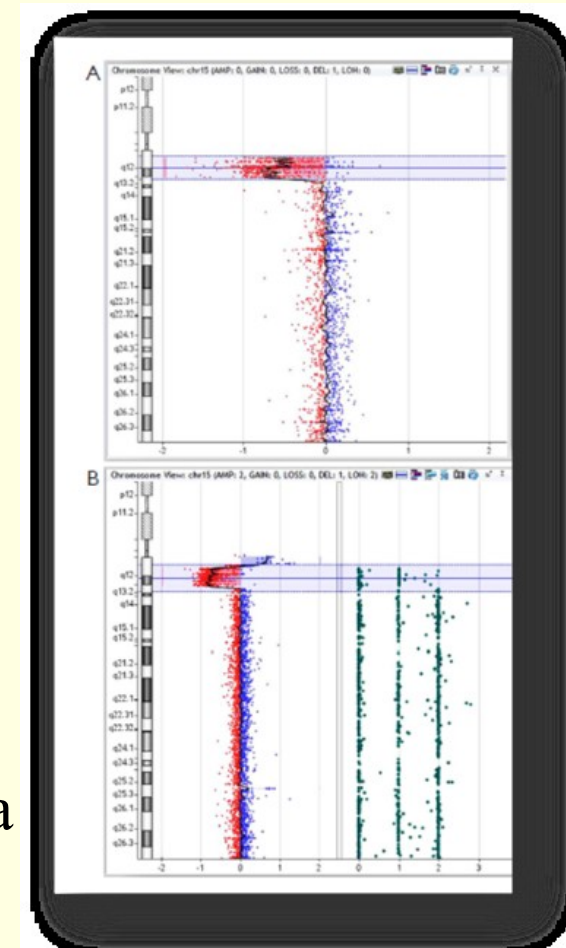
15q11-13 DNA sonda



MLPA, array-CGH

Molekulárně genetické:

PCR - uniparentální disomie, Metylační analýza



Využití metod molekulární cytogenetiky

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 %)

Prader-Williho syndrom



Hlavní klinické příznaky:

- Snížená aktivita plodu
- Neprospívání kojenců
- Hypotonie novorozenců (do 9 měs.)
- **Obesita**
- **Hyperfagie**, neukojitelný hlad
- Hypogenitalismus, hypogonadismus
- **PMR**
- **Malá postava**
- **Akromikrie**
- **Hypopigmentace**
- **Problémy s chováním**

Angelmanův syndrom – „Happy Puppet“

Výskyt : frekvence není přesně známá –
- odhad asi **1: 15 000- 1: 30 000**



Hlavní klinické příznaky

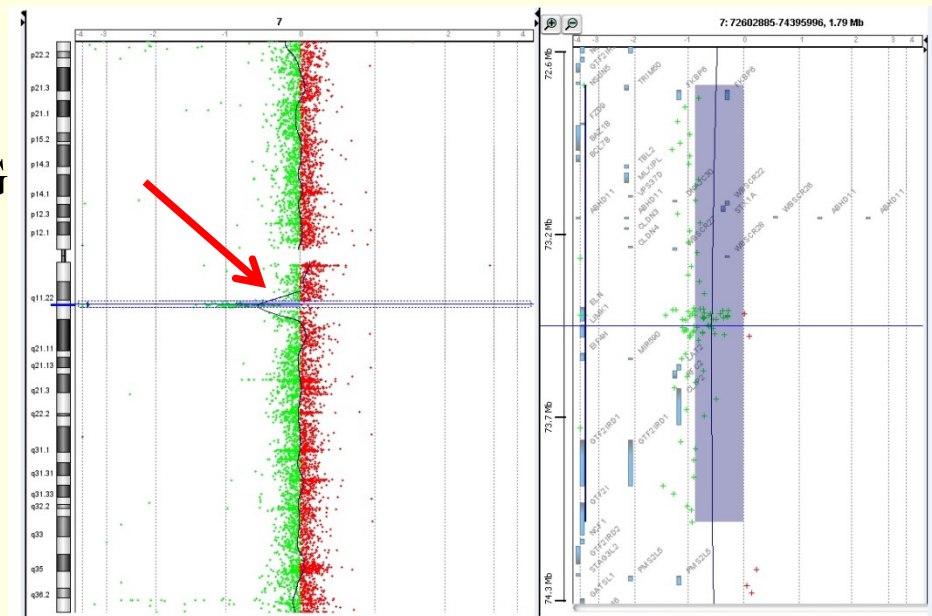
- Vážná PMR
- Tuhá nemotorná chůze
- Trhavé pohyby, špatná rovnováha
- Absence řeči
- Šilhání
- Výbuchy smíchu, šťastná povaha
- Hypotonie
- Epilepsie
- Abnormální tvar lebky
- Hypopigmentace

Využití metod molekulární cytogenetiky

mikrodeleční syndrom: Williams-Beurenův syndrom

del7q1123

- **autozomálně dominantní** onemocnění s variabilní expresivitou, výskyt zpravidla *de novo*
- riziko stejného postižení je pro děti probanda 50%
- výskyt **1:20 000** živě narozených dětí
- příčina vzniku: **del (7)(q11.23)**, deletovaná oblast o velikosti kolem 1,5 Mb zahrnuje **nejméně 17 genů**, nejvýznamnější je ELN gen kódující elastin
- detekce: FISH DNA sonda
Vysis ELN 7q11.23 SO/7q31 SG
- MLPA, aCGH



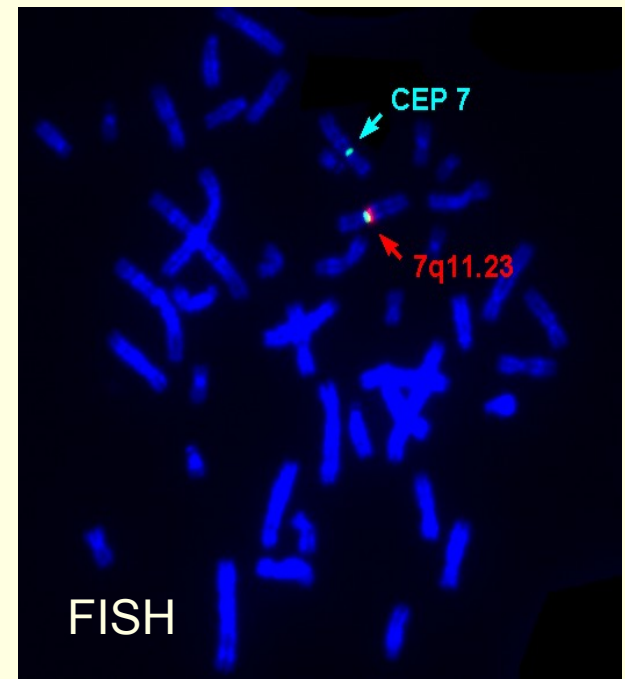
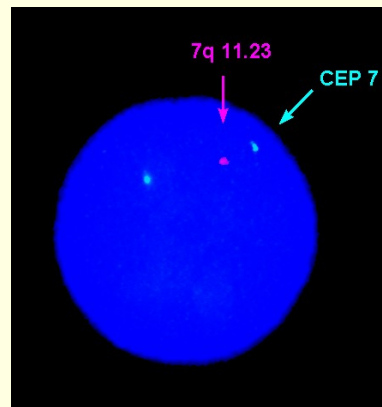
profil array-CGH s mikrodelecí 7q11.23

Využití metod molekulární cytogenetiky

mikrodeleční syndrom: Williams-Beurenův syndrom

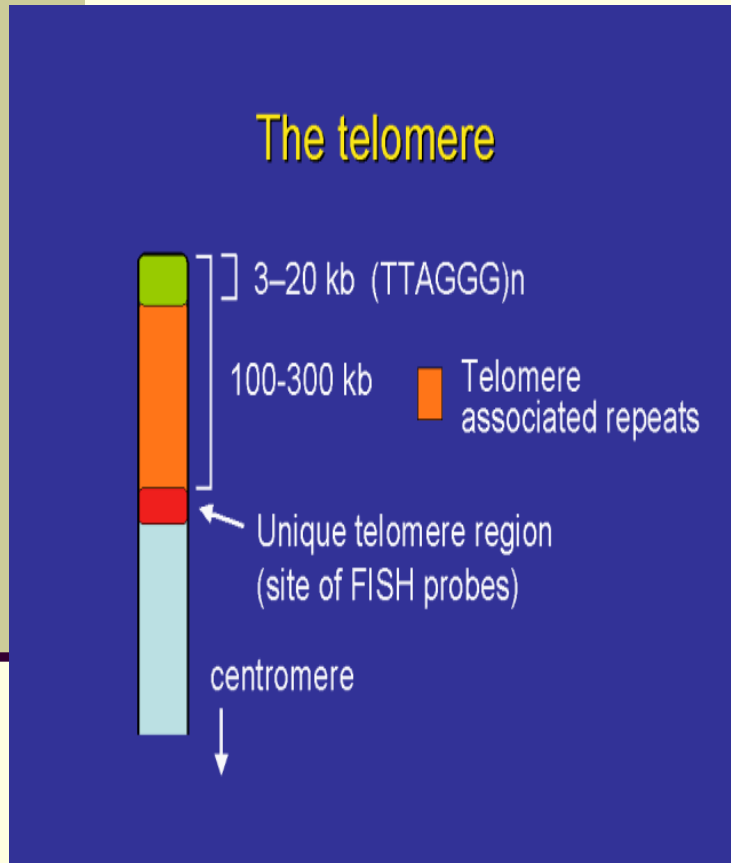
del7q1123

- **„skřítkovitý obličej“** – široké čelo, nízký kořen nosu, krátké oční štěrby, velká ústa, malá brada
- malá, drobná postava, mikrocefalie
- vadný skus, chybné postavení zubů, hypoplastické zuby
- **lehké až středně těžké** duševní postižení (IQ mezi 35-70)
- VCC- cévní stenózy
- hyperkalcemie
- přátelská povaha, hyperaktivita, hrubý hlas



Využití metod molekulární cytogenetiky

Přestavby subtelomerických oblastí (delece/ duplikace)



- Telomery - fyzické konce chromozomů
- úplné konce tvořeny proteiny a tandemovými repeticemi DNA (TTAGGG) 3-20 kb (společné pro všechny chromozomy)
- TAR – doprovodné repetitivní sekvence subtelomerické oblasti 100-300 kb

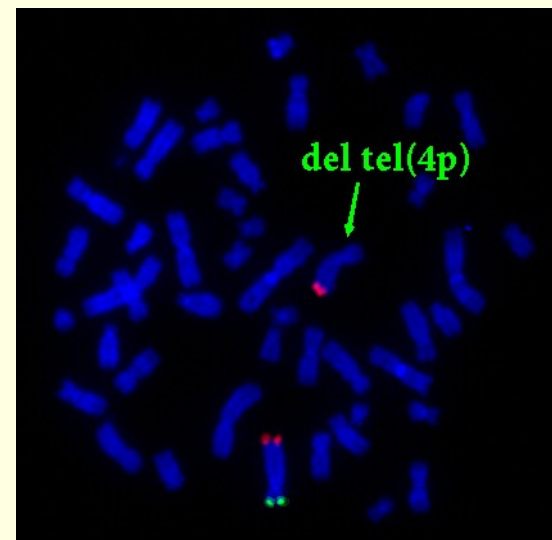
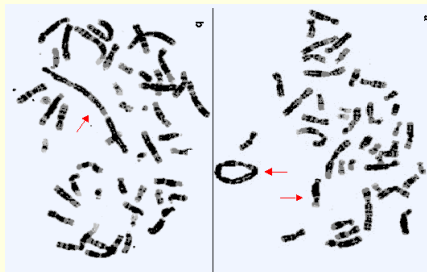
Využití metod molekulární cytogenetiky

Delece/ duplikace subtelomerických oblastí

- subtelomerické oblasti na chromozomech – největší hustota genů v genomu!
- aberace v této oblasti - příčina spontánních abortů, VVV a mentálních retardací
- nebalancované translokace mohou být také příčinou subtelomerických přestaveb
- **7 % pacientů** s dysmorfii a MR - mikrodelece subtelomerických oblastí chromozomů !!!

příklady:

- **Wolf-Hirschhornův syndrom (4p-),**
- **1p36 syndrom,**
- **Cri-du-chat syndrom (5p-),**
- **9p- syndrom,**
- **13q- syndrom,**
- **18p- syndrom**





Využití metod molekulární cytogenetiky

Syndrom kočičího křiku (Cri du chat - delece 5p-)

J. Lejeune

- 1 : 15 000- 50 000
- 5 – 40 Mb
- různý rozsah delece
- - del 5p15.2 až celé p rameno
- 78 % terminální delece
- 10 – 15 % potomci přenašečů translokace
- typický křik novorozence
- laryngomalacie
- kulatá hlava
- mikrocefalie
- PMR, srdeční vady
- epicanthi
- hypotonie

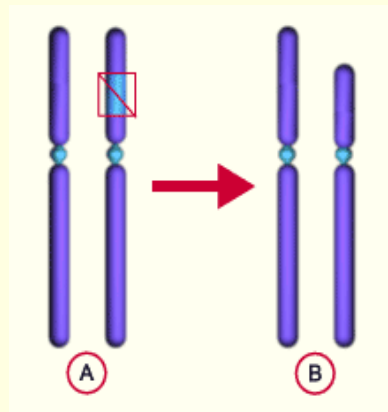
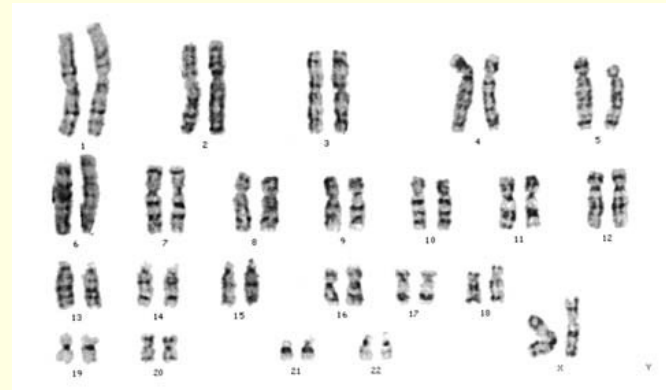


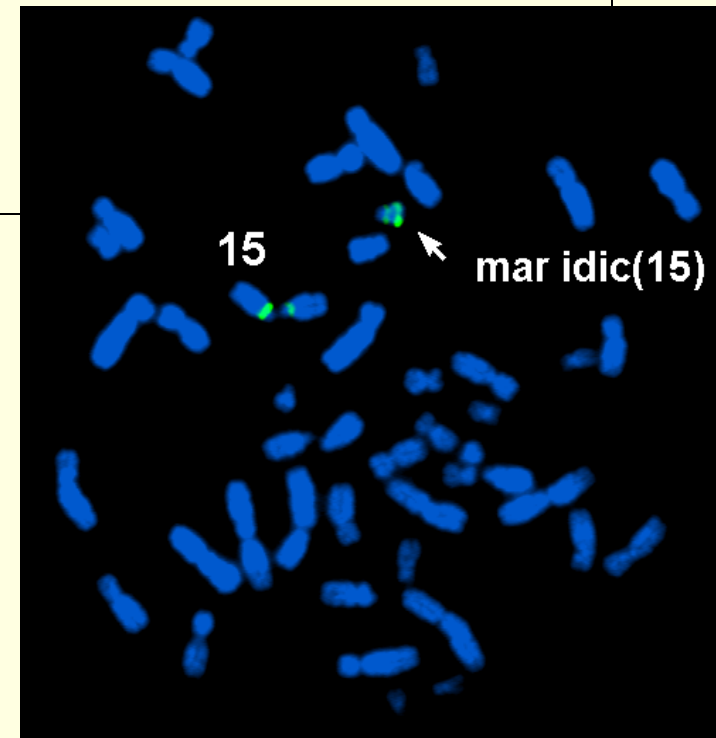
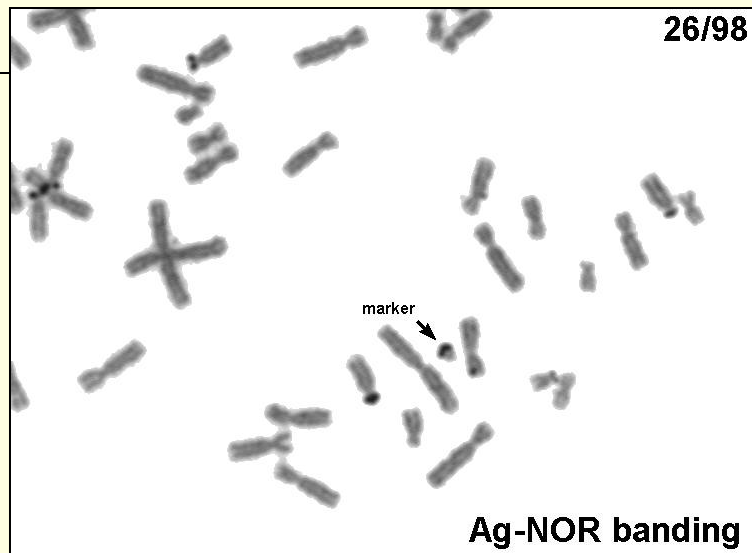
Figure 1

Clinical features of a patient with Cri du Chat syndrome at age of 8 months (A), 2 years (B), 4 years (C) and 9 years 6/12 (D).

Využití metod molekulární cytogenetiky

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;



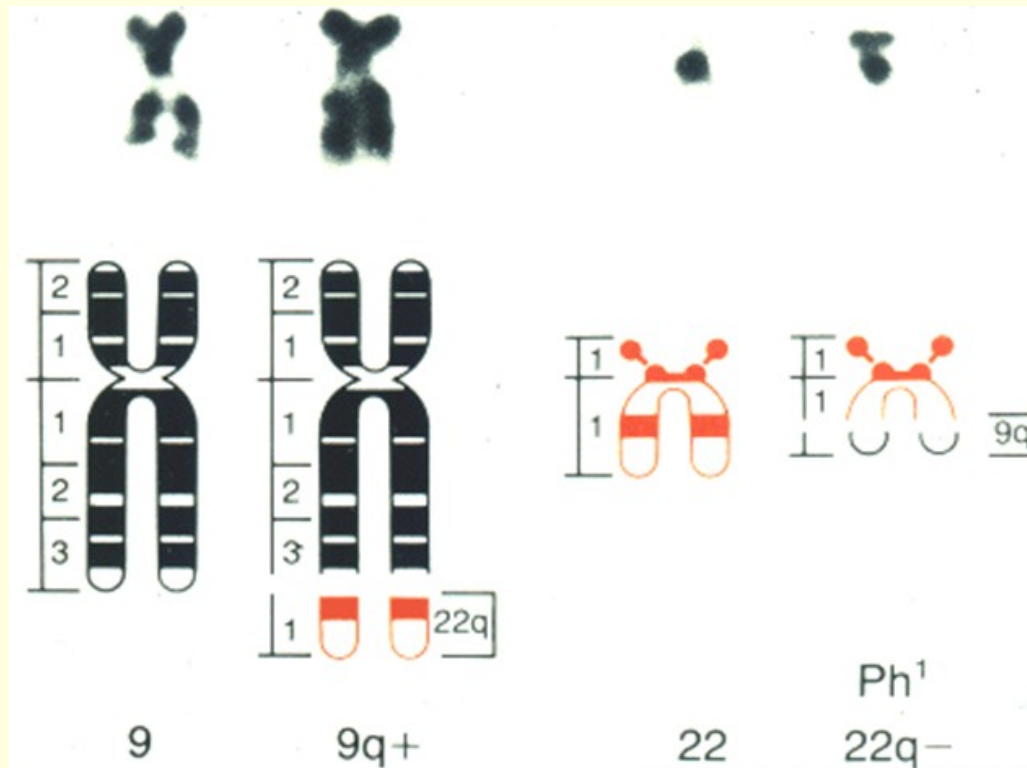
Využití metod molekulární cytogenetiky

onkocytogenetika (příklad reciproké translokace)

Chronická myeloidní leukemie (CML)

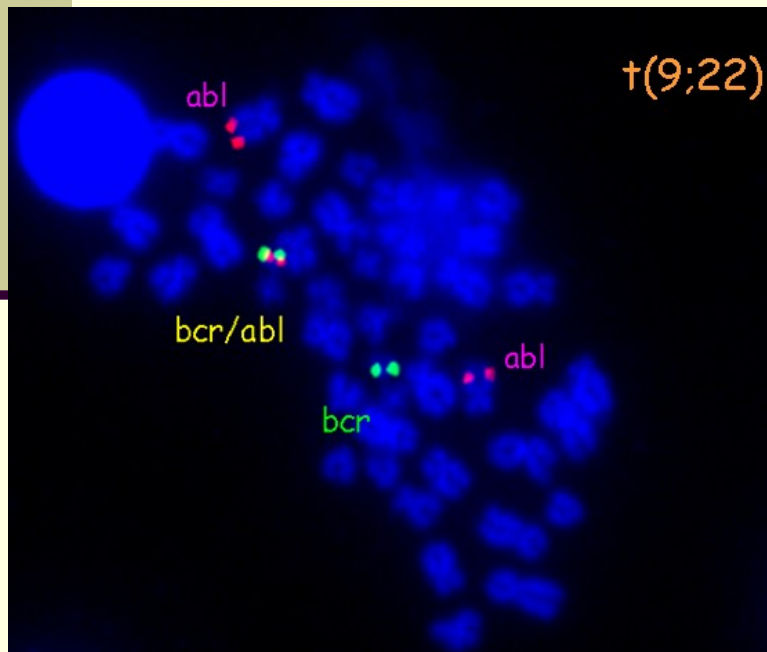
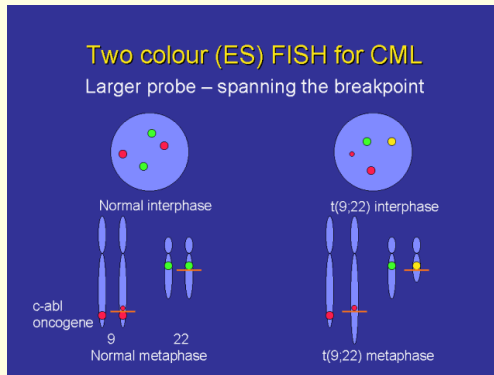
Philadelphský chromozóm

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



Využití metod molekulární cytogenetiky

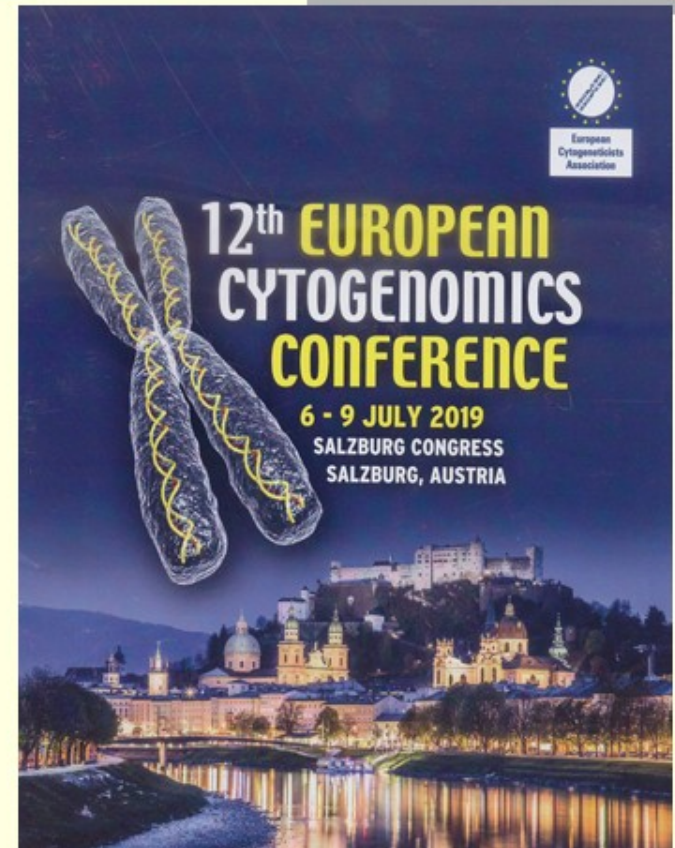
Chronická myeloidní leukemie (CML)



- 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
- FISH detekujeme přestavbu BCR/ABL, specifická sonda umožňuje vyšetřovat i interfázní jádra

Cytogenetika 21. století = cytogenomika

Cytogenomics is used as a general term that encompasses conventional, as well as molecular cytogenetics (fluorescence *in situ* hybridisation (FISH), microarrays) and molecular-based techniques.



Silva et al.: European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. European Journal of Human Genetics (2019) 27:1–16

Využití metod molekulární cytogenetiky

u solidních nádorů : **Neuroblastom**(mimo jiné..)

□ **Cytogenetika:** kultivace tkáně tumoru; vyšetření karyotypu

□ **Molekulární cytogenetika:**

□ I –FISH: amp.MYCN genu 2p24
del 1p36
gain 17q

□ array-CGH

□ SKY, MLPA

□ **Molekulární genetika:**

tyrozinhydroxyláza,
protein PGP 9.5

