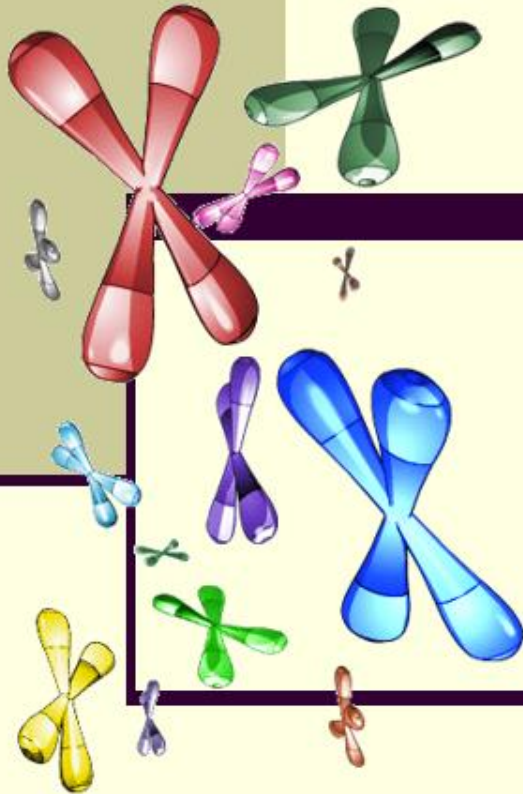


# Metody molekulární cytogenetiky

Mgr. Hana Filková



Oddělení lékařské genetiky  
FN Brno



# Indikace k molekulárně cytogenetickému vyšetření

- Páry s poruchou reprodukce (více než rok, SA,..)
- Zátěž v rodě (VCA,...)
- Pacienti s intelektuálním postižením (neurovývojovými poruchami, vývojovými poruchami intelektu), poruchami autistického spektra, vrozenými vývojovými vadami, stigmatizací...
- Prenatální indikace z důvodu abnormálního průběhu gravidity (abnormální prenatální screening)
- Onkologická onemocnění



# Cytogenetika v medicíně dnes...

V ČR jsou cytogenetické laboratoře součástí Oddělení lékařské genetiky (velké nemocnice – Praha, Brno, Olomouc, Ostrava, Plzeň, Hradec Králové, České Budějovice...)

- soukromá pracoviště (laboratoře)
- **20 – 30 cytogenetických laboratoří v ČR...**

Cytogenetická laboratoř/cytogenetická diagnostika:

- a) prenatální cytogenetika
- b) postnatální cytogenetika
- c) nádorová cytogenetika



- Lékařská genetik
- Onkologie
- Reprodukční medicína
- Pediatrie
- Kardiologie
- Patologie
- Kožní
- Neurologie
- aj

# Materiál pro cytogenetické vyšetření

---

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

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

# I. Metody molekulární cytogenetiky

**FISH** (fluorescenční in situ hybridizace)

detekce balancovaných i nebalancovaných změn

**Mnohobarevná FISH – M FISH;**

detekce balancovaných i nebalancovaných změn v genomu

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

Agilent's Human CGH Microarray Kit

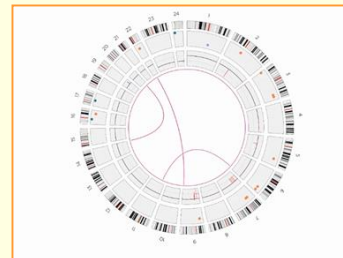
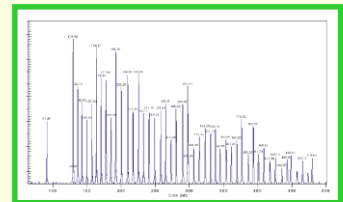
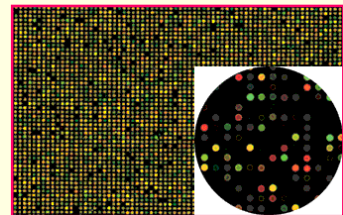
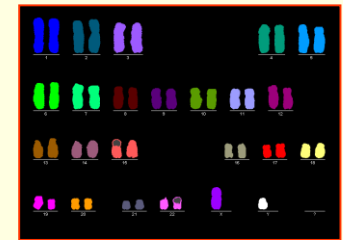
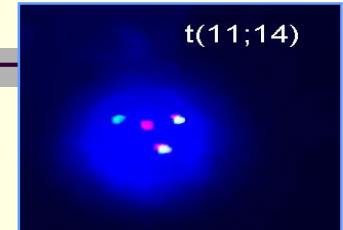
detekce nebalancovaných změn v celém genomu

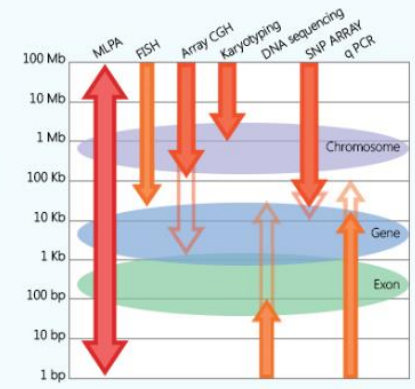
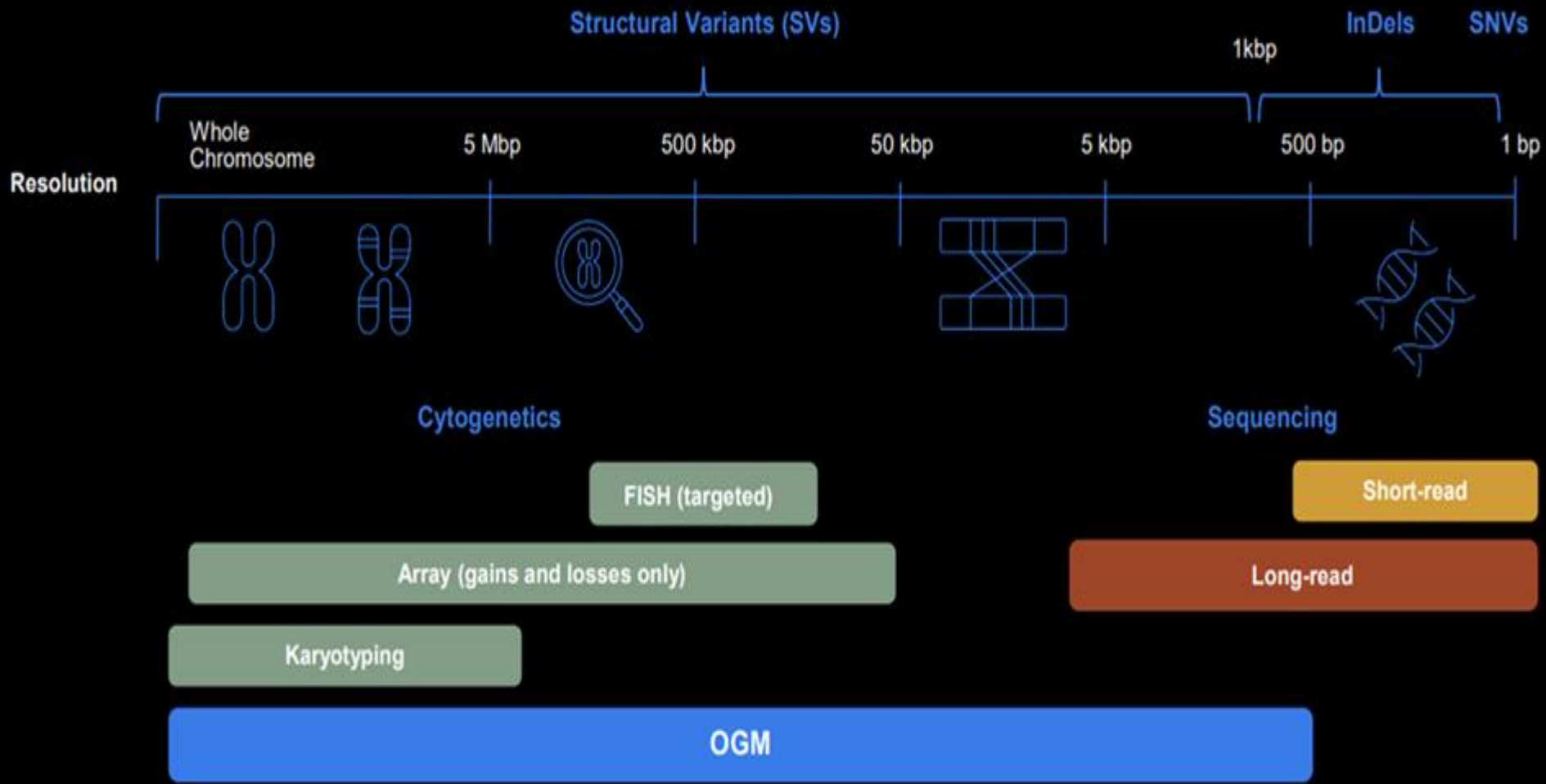
**MLPA** (Multiple Ligation-dependent Probe Amplification)

detekce nebalancovaných změn

**OGM**(Optical Genome Mapping)

detekce balancovaných i nebalancovaných změn v celém genomu



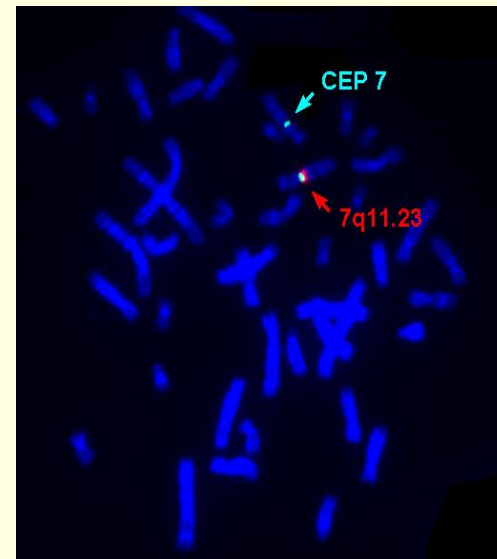
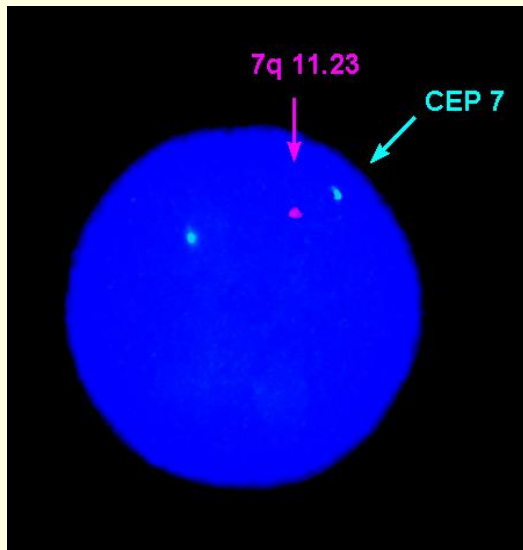


# FISH = fluorescenční *in situ* hybridizace

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

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

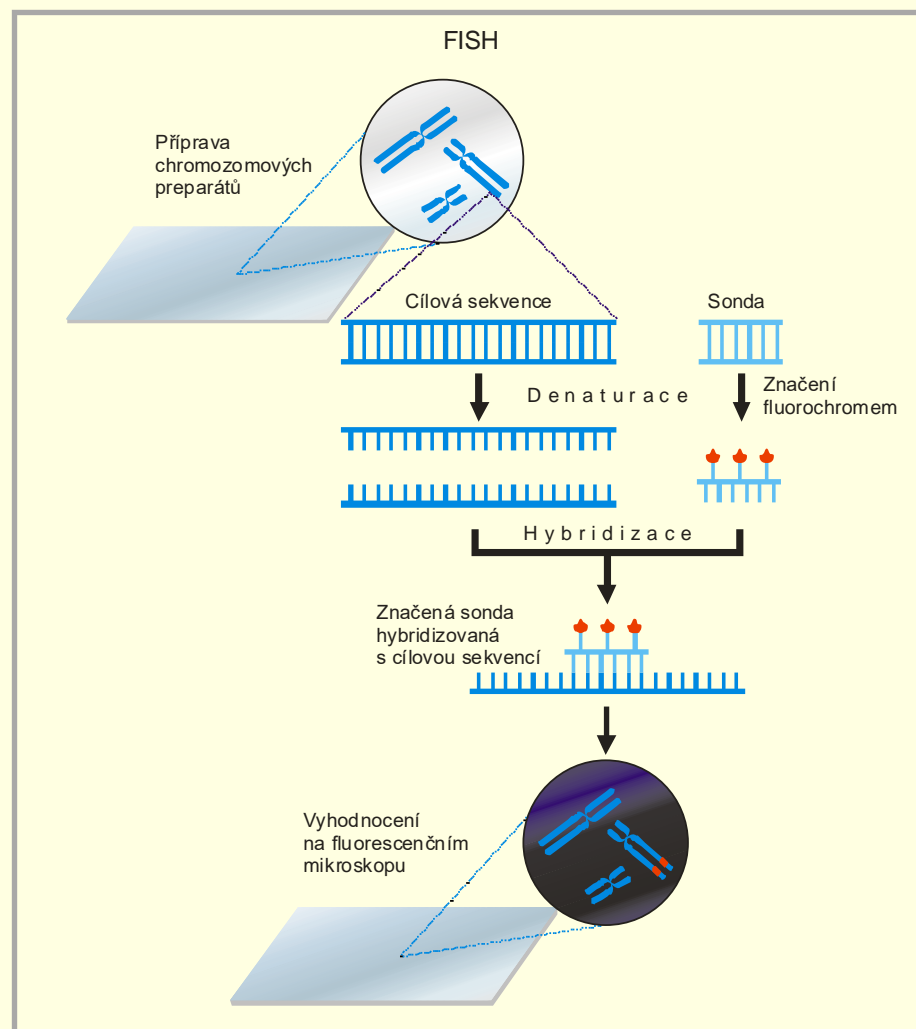
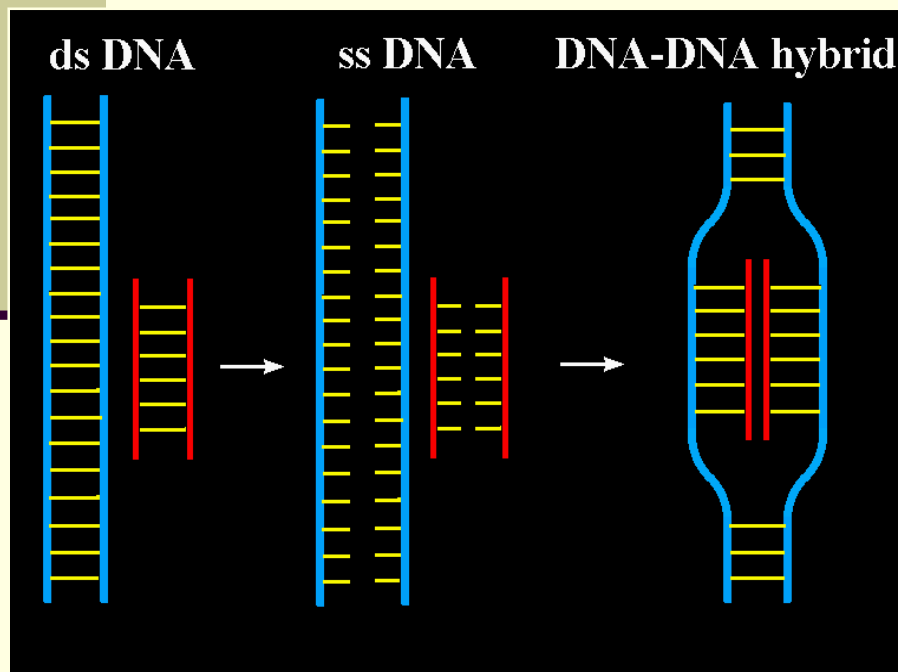
Hybridizace sondy (značené fluorescenčním barvivem) s chromozómy na cytogenetickém preparátu



# Postup FISH

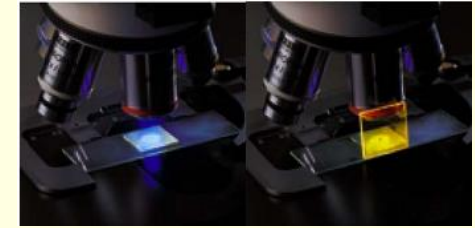
## Zhotovení kvalitních preparátů

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

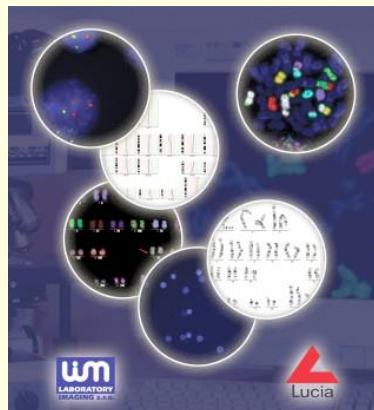
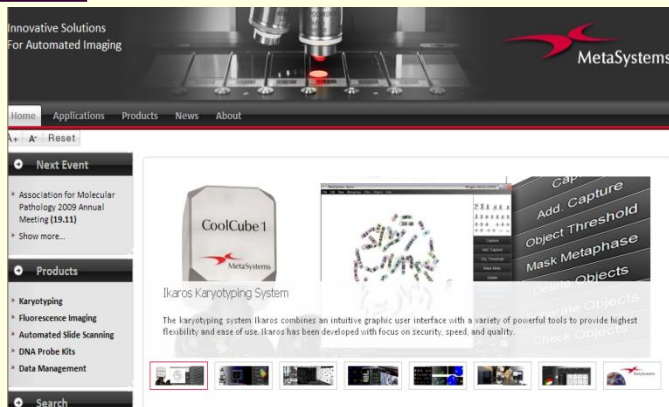
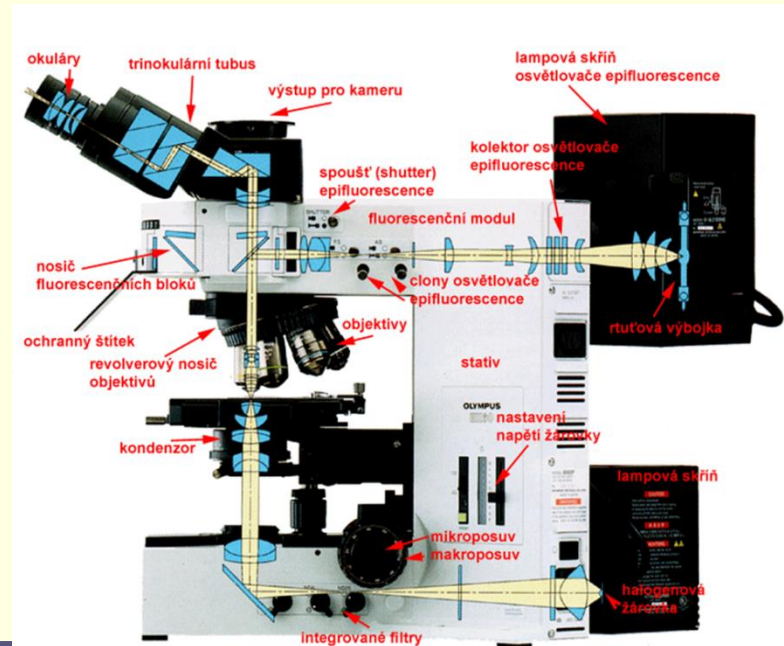




# FISH Vybavení



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

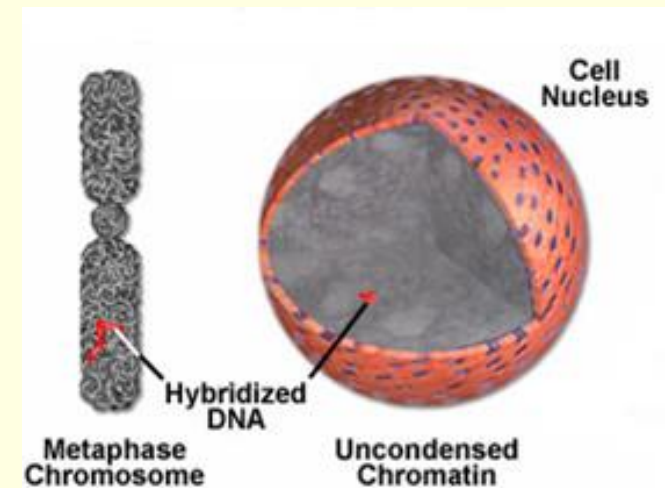
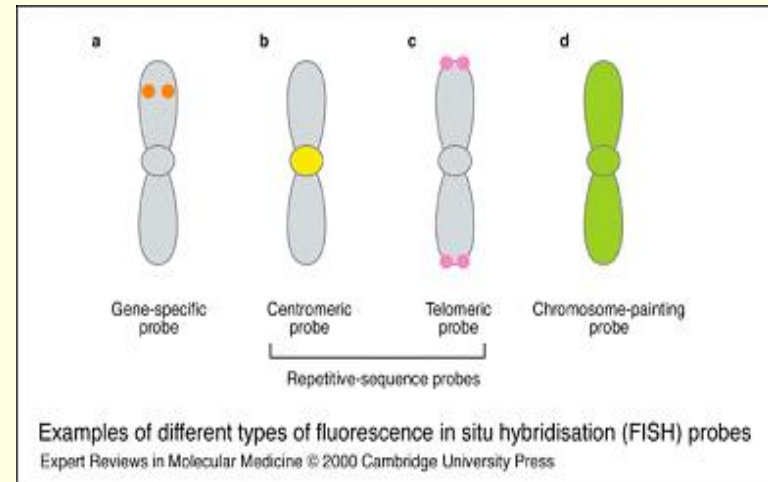


# FISH : Typy sond

- Celochromozomové
- Centromerické
- Sondy subtelomerické
- Sondy lokus specifické

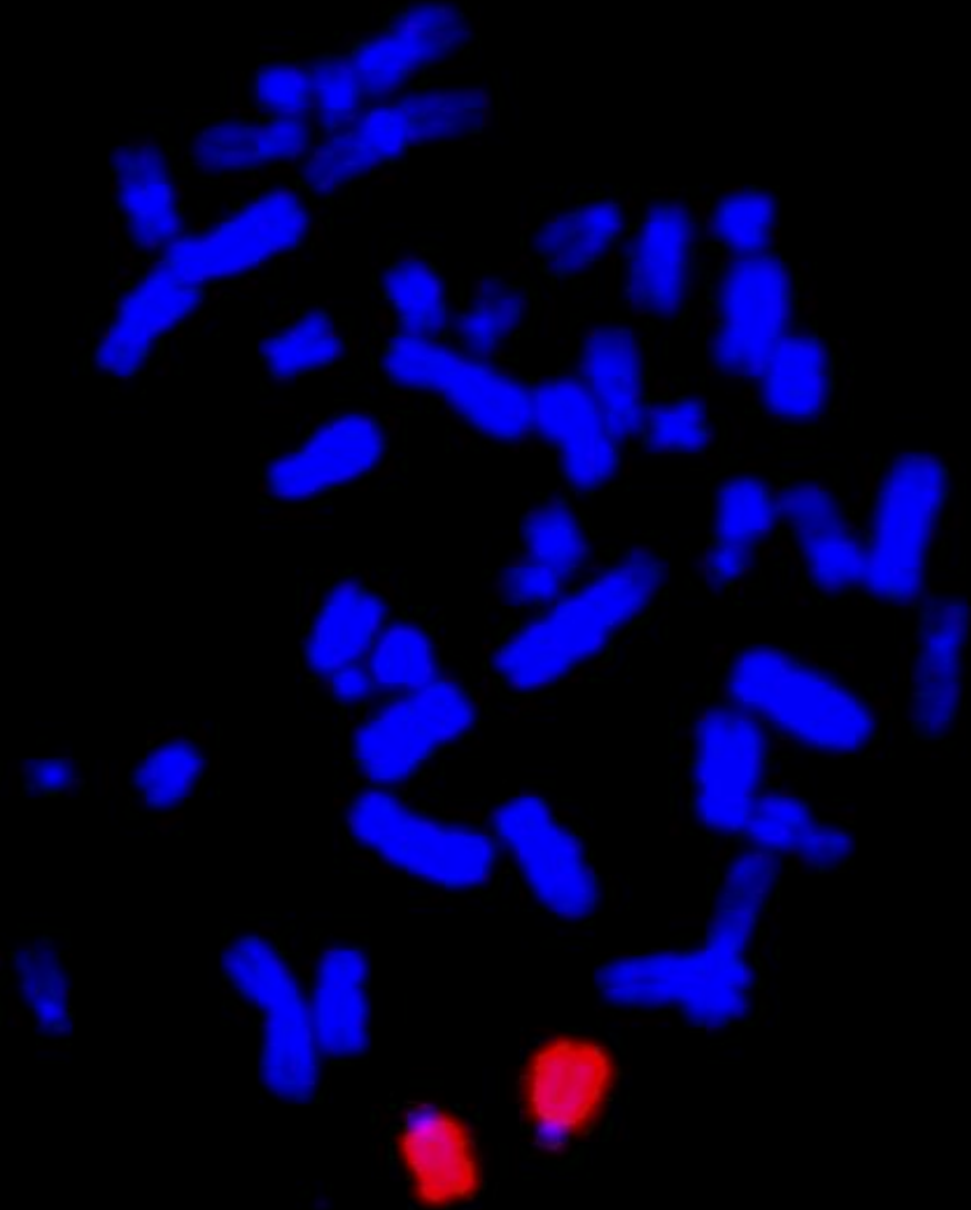
## Sondy pro jedinečné sekvence:

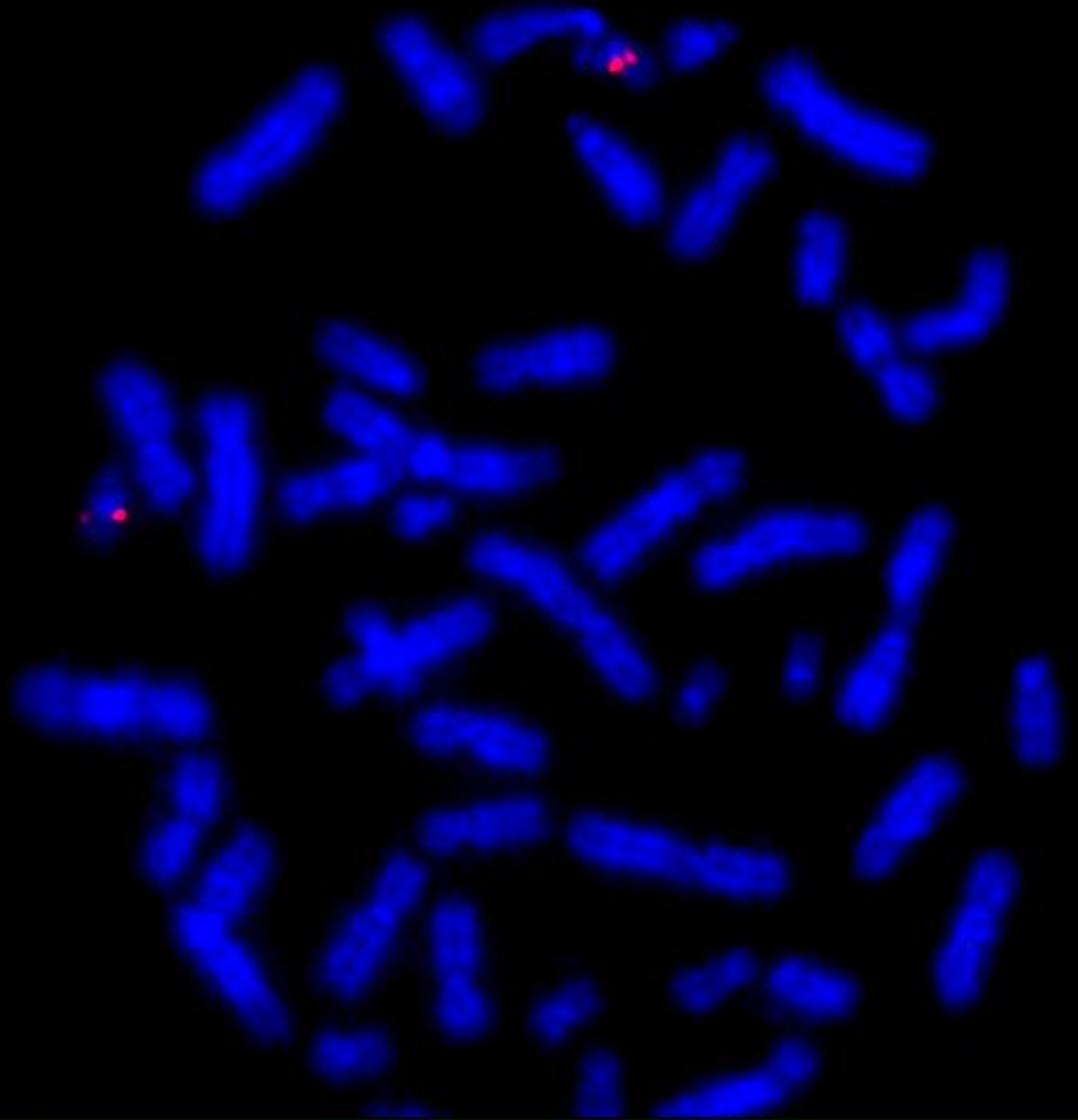
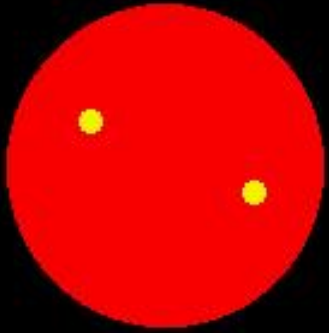
- a) plazmidové (500pb-5 kb)
- b) kosmidové (20-50 kb)
- c) bakteriofág lambda (8-15 kb)
- d) YAC klony (50-1000 kb)



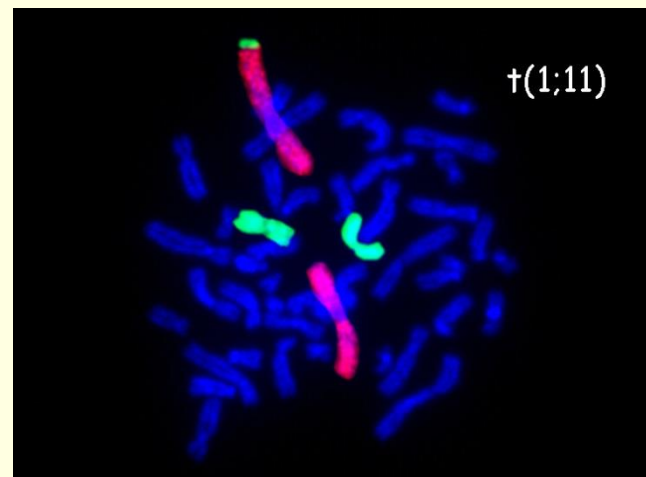
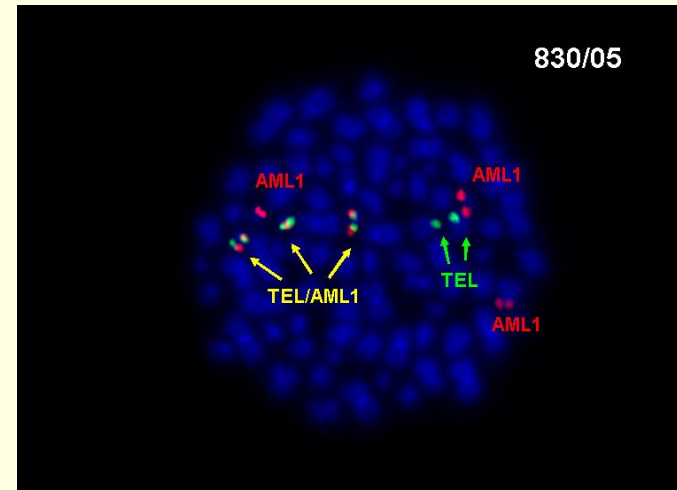
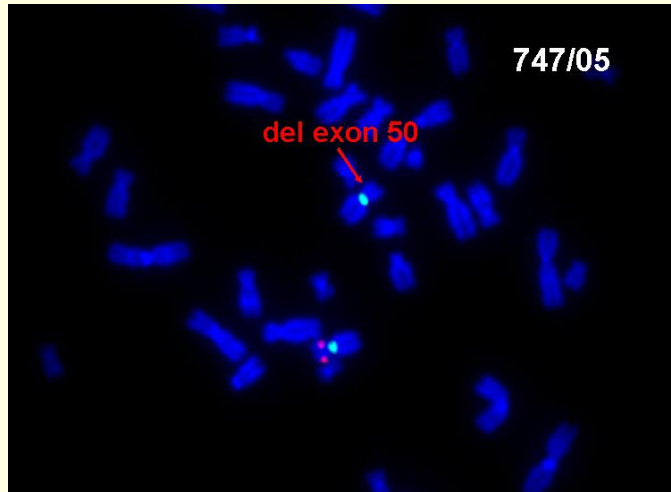
## Značení DNA sond

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





# FISH : Přítomnost, počet a poloha signálů



# Mnohobarevná FISH (M FISH)

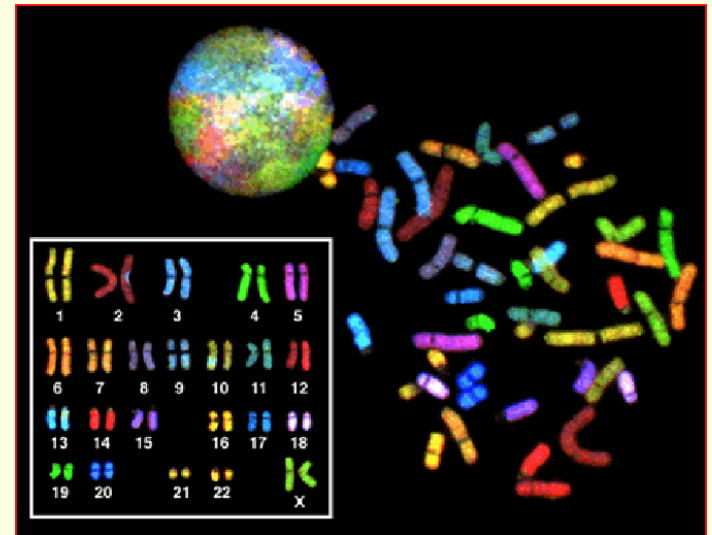
vícebarevné FISH techniky – detekce více značených sond na jednom preparátu

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

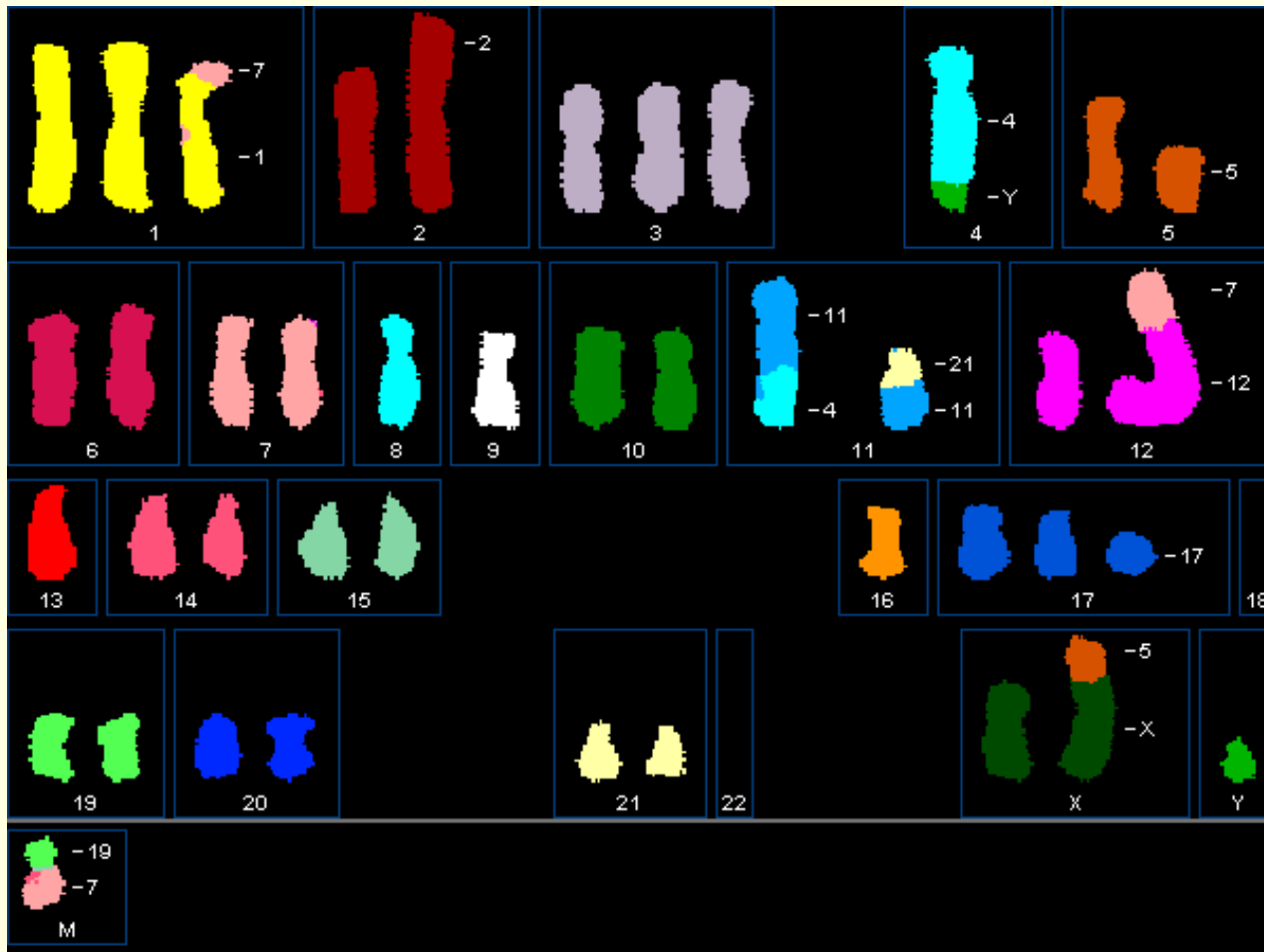
Spectrum  
 556  
 500 600 700  
 Reference: A B C D E F  
 Markers: a b c d e f g h i  
 Under the Cursor     Normalization

Karyotype Table

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

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

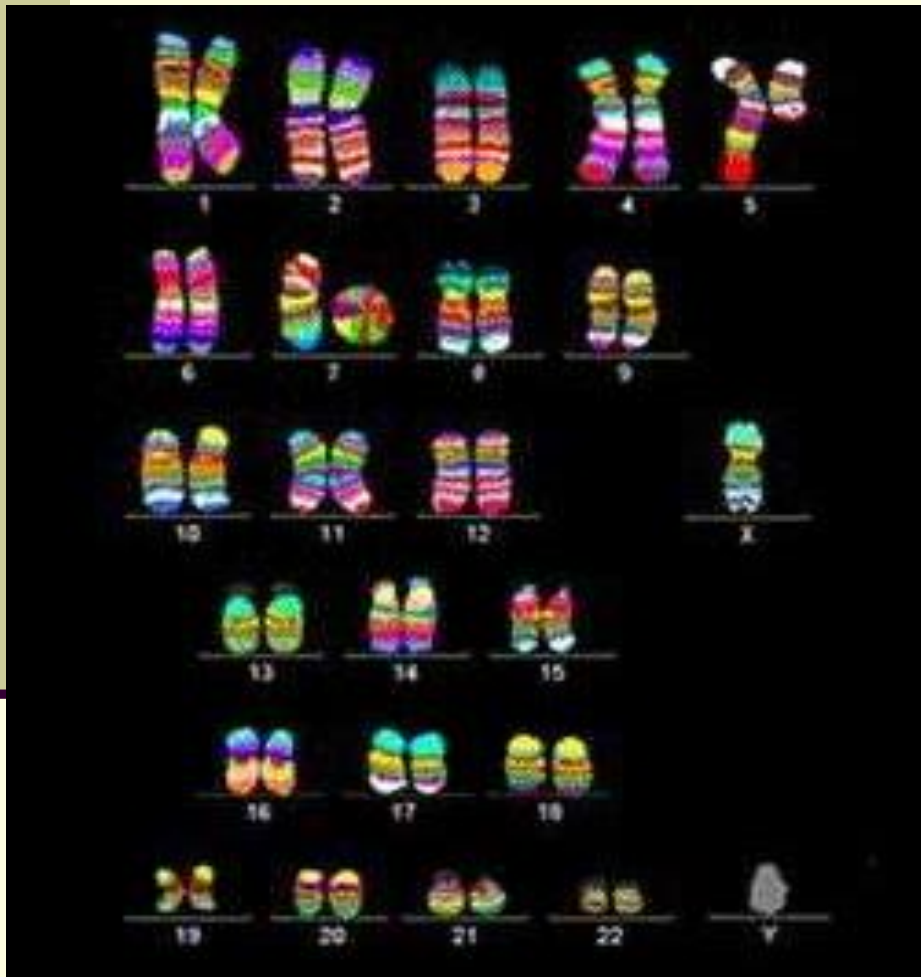
# M FISH - komplexní karyotyp



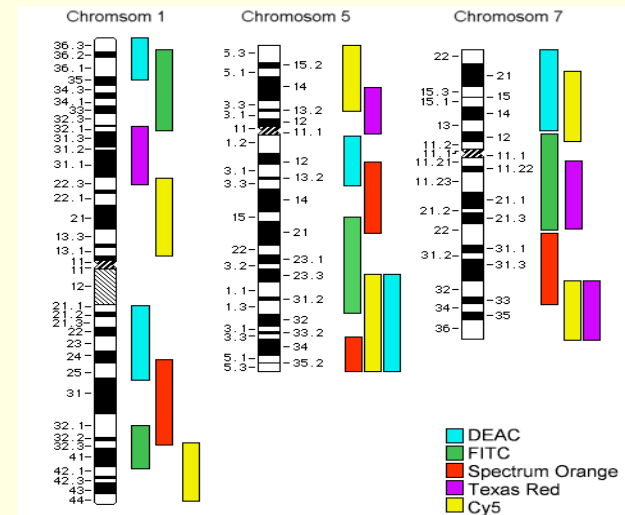
Obr. 10 (Dokumentace OLG FN Brno)



# Mnohobarevné pruhování (M-banding)

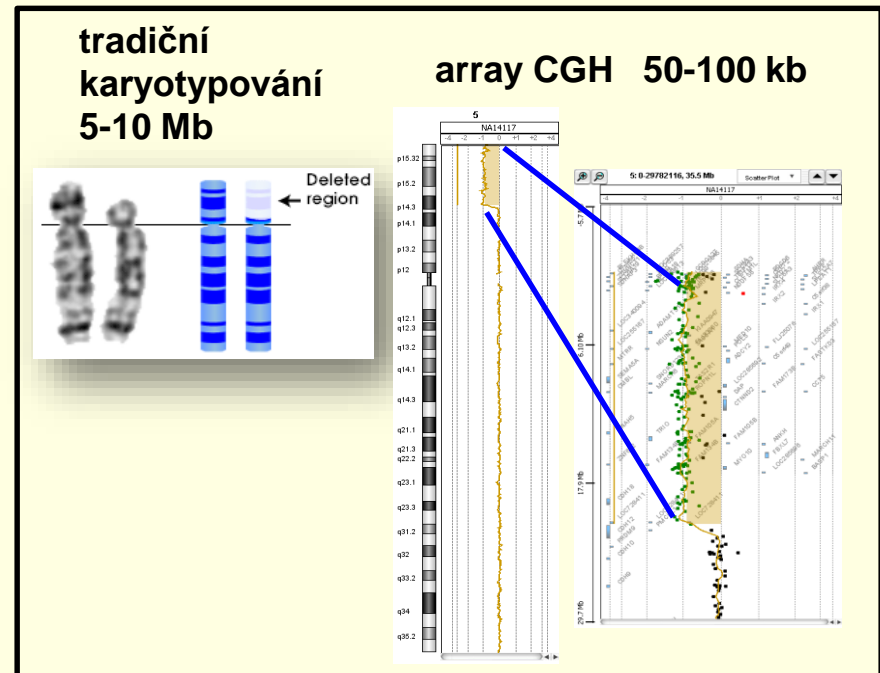
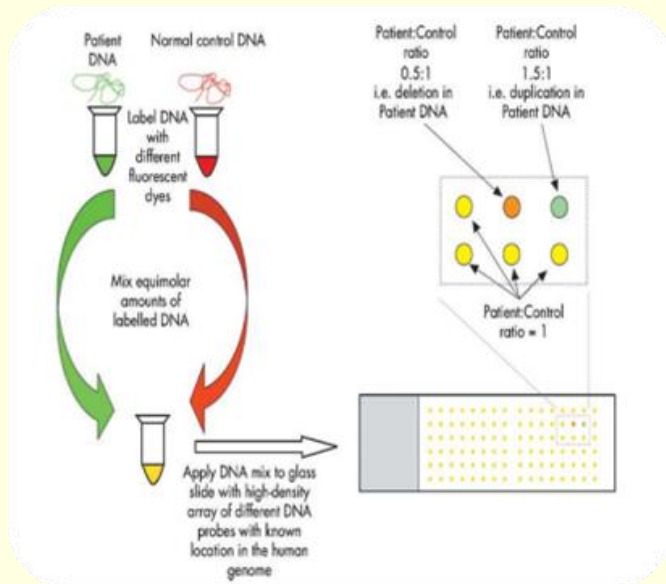


- parciální malovací sondy ze specifických oblastí chromozomů
- fluorescenční signály jednotlivých sond se podél sledovaného chromozomu částečně překrývají a dochází k jejich kombinaci
- umožňuje rozlišení intrachromozomových přestaveb (inverzí)

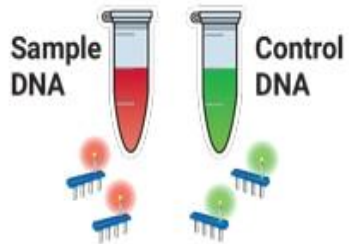


# Komparativní genomová hybridizace na čípech (array-CGH)

- 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 .

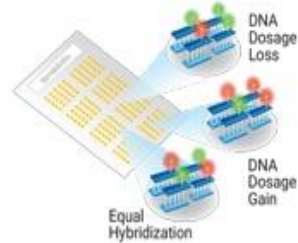


## Extract & Label DNA



Extract genomic DNA from a test and a reference sample and label one with a red fluorescent dye and the other a green fluorescent dye.

## Hybridize & Wash



Mix and hybridize to a microarray printed with thousands of oligonucleotide probes then wash.

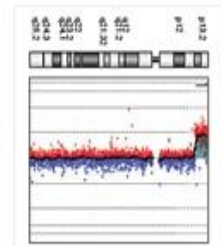
## Scan



Detect red and green signals using a fluorescence scanner.

## Analyze Data

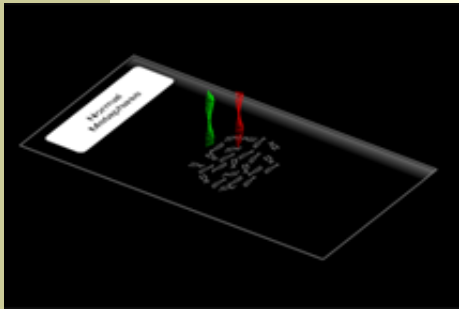
CytoGenomics Software



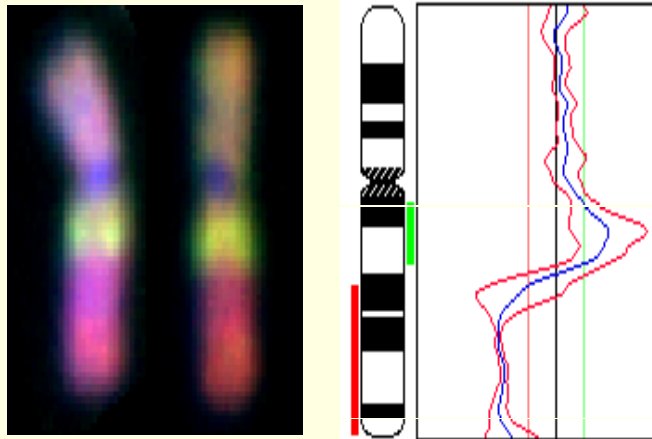
Compute and report gains or losses in the test DNA using software.

# Původ metody array-CGH

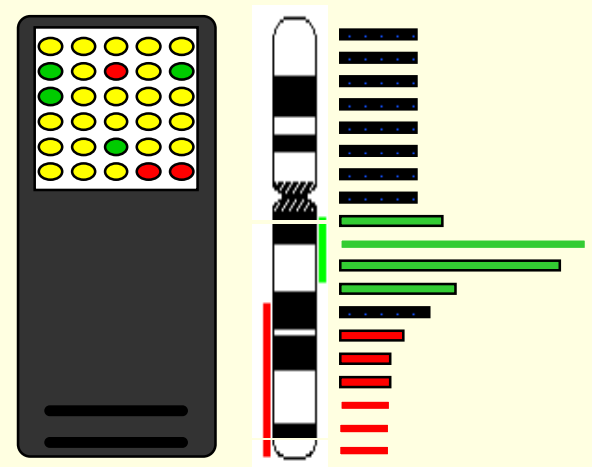
- *Solinas-Toldo a kol., 1997*
- vyhází z principu klasické (chromosomální) CGH
- nahrazení chromozomů separovanými klony (BAC, c-DNA klony, oligonukleotidy)



CGH



Array-CGH



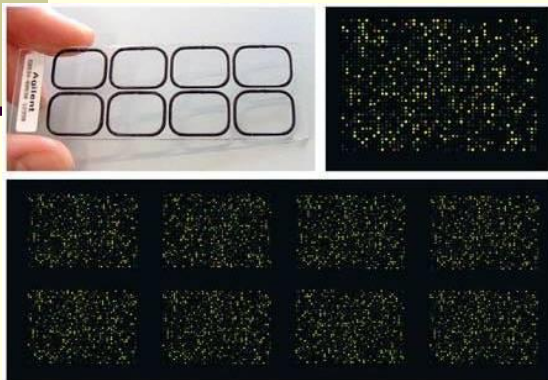
# Agilent Human CGH Microarray

## Oligo arrays

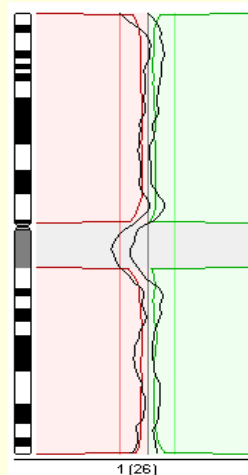
- 8x15K custom chip
- 4x44K 43 kb rozlišení
- 2x105K 21 kb rozlišení
- 1x244K 9 Kb rozlišení

## Nové typy – Sure Print G3 Human

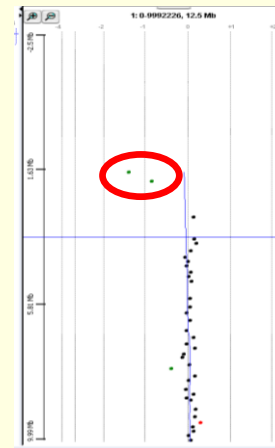
- 8x60K 41 Kb rozlišení
- 4x180K 13 Kb rozlišení
- 2x400K 5 Kb rozlišení
- 1x1M 2 Kb rozlišení



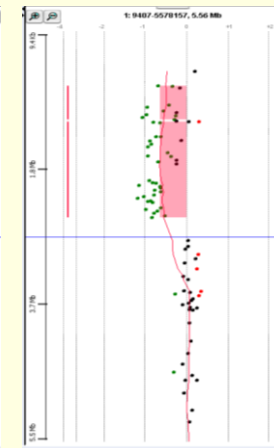
## del(1)(p36), cca 3 Mb



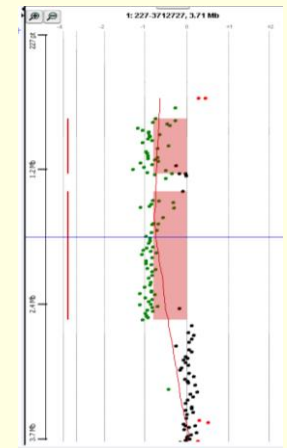
**HRCGH**  
negativní



**8x15K**  
negativní



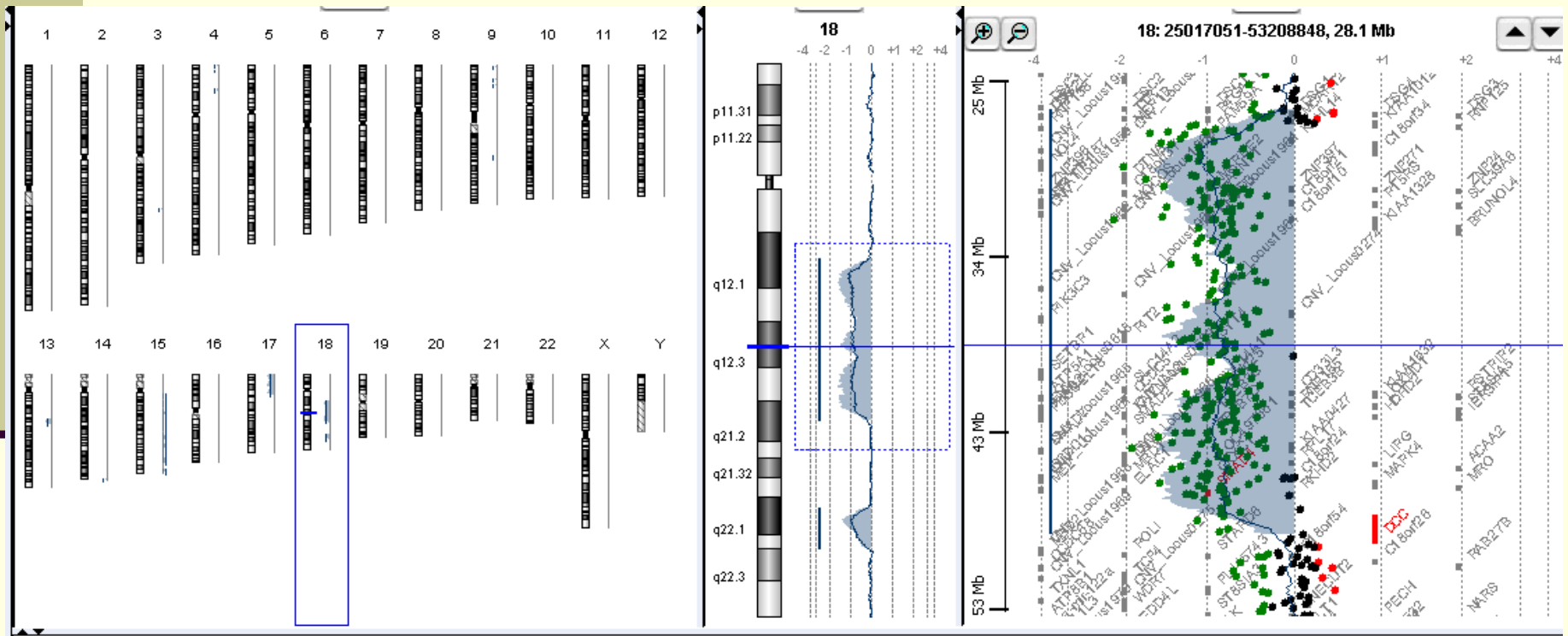
**4x44K**  
**del(1)(p36)**



**2x105K**  
**del(1)(p36)**

# Array CGH : vyhodnocení

aCGH Analytics Software, Agilent Technologies



# Interpretace nálezů CNVs musí probíhat vždy v kontextu s:

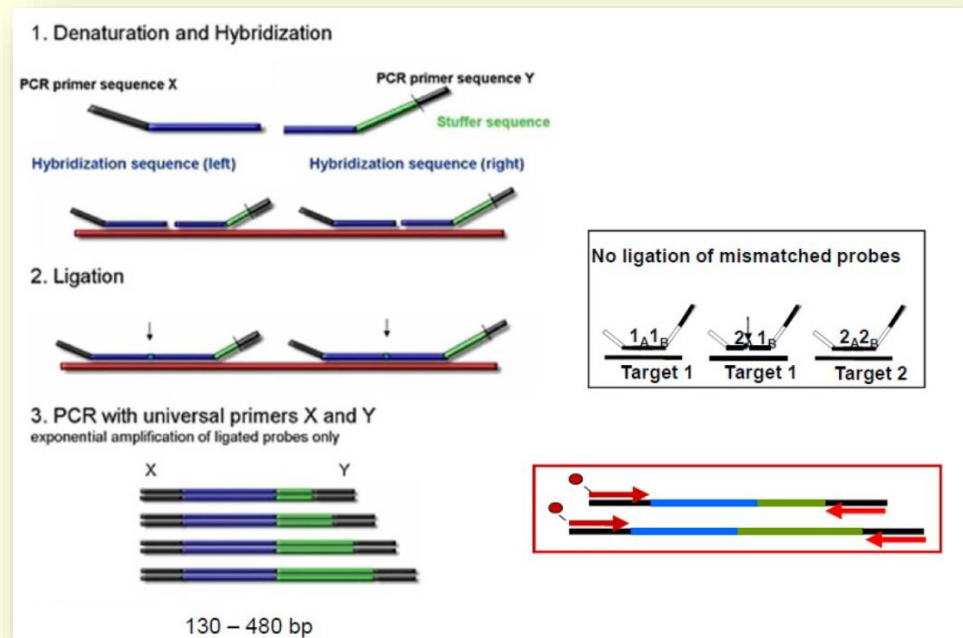
---

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

**Array CGH: ~ 1000-krát větší rozlišení nebalancovaných změn než klasická cytogenetika, ale nedokáže detekovat balancované přestavby chromozomů...!!!**

# Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification - MLPA

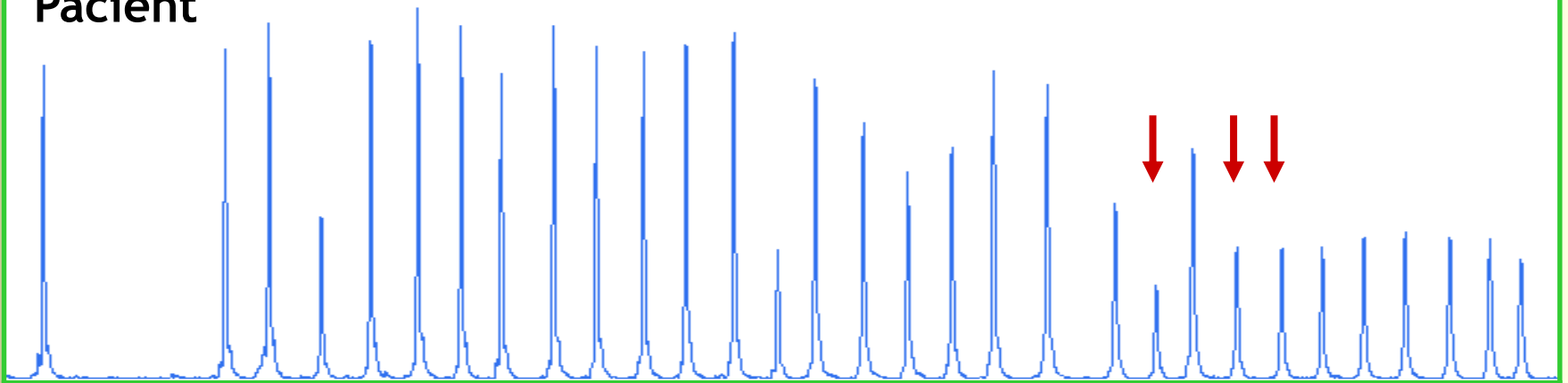
- jedná se o speciální formu multiplex PCR, při které se amplifikují MLPA sondy a ne zkoumaná DNA
- **detekuje změny počtu kopií ( především rozsáhlejších delecí/duplikací ) až 50 specifických sekvencí v jedné PCR reakci**
- dokáže odlišit sekvence lišící se v jediném nukleotidu;
- další aplikace – stanovení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



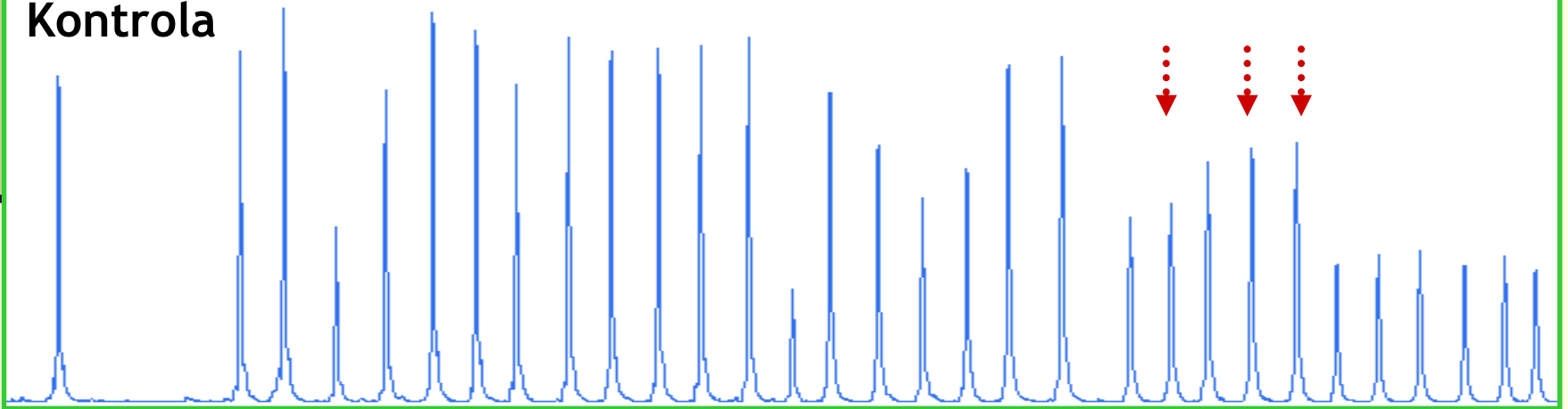


# MLPA princip

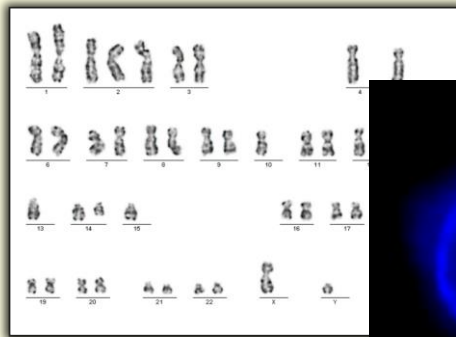
Pacient



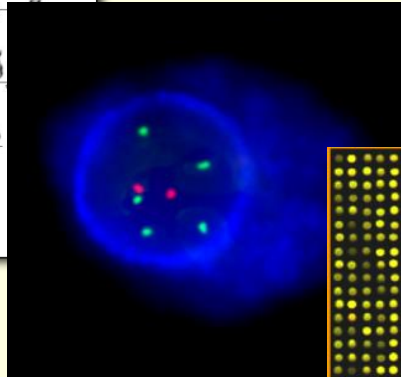
Kontrola



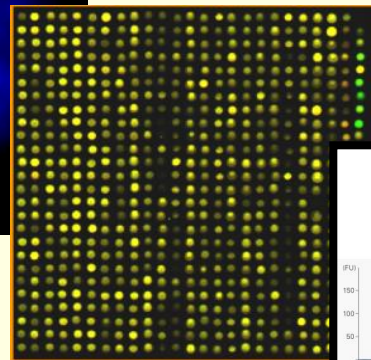
# Vývoj nových cytogenetických technik pro detekci chromozomových změn



1971 G-pruhování (5 – 10 Mb)

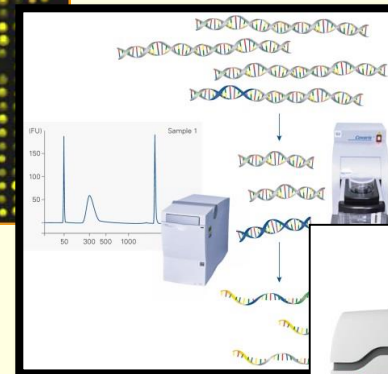


1986 Molekulární cytogenetika  
FISH (100 kb)

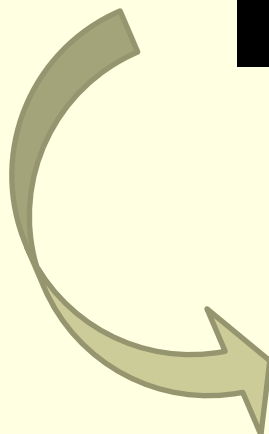


1997 array-CGH (oligo 0,06 kb)

2000 NGS

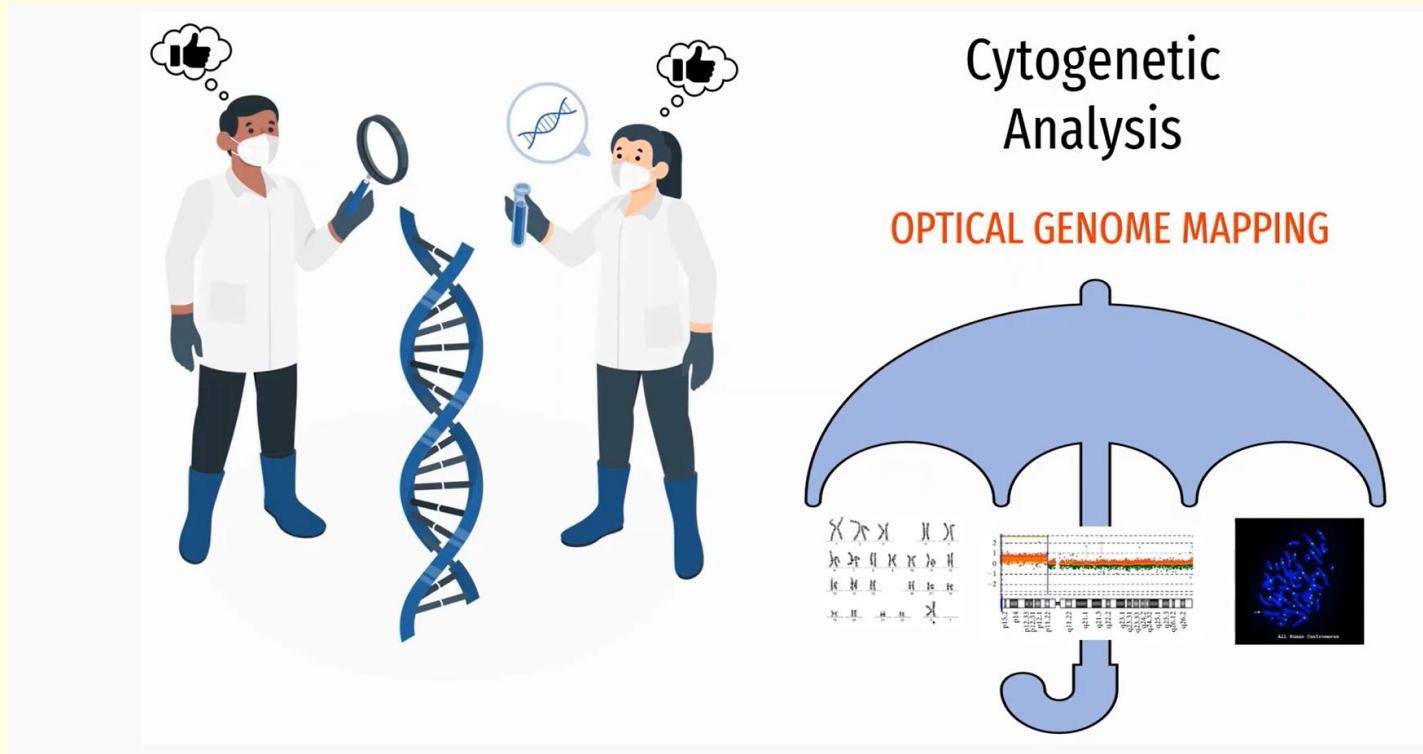


2010 Optical mapping



Od chromozomů  
...k analýzám DNA

# Existuje univerzální metoda, která by nahradila vše?



<https://bionano.com/videos/saphyr-ogm-technology-overview-video/>

# Optical mapping for clinical structural variant detection

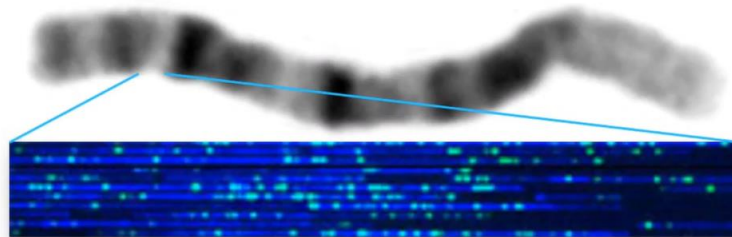
Alexander Hoischen

Associate Professor Genomic Technologies & Immuno-Genomics  
Scientific Director Radboud Genomics Technology Center

Departments of Human Genetics and Internal Medicine  
Radboud University Medical Center,  
Nijmegen, The Netherlands



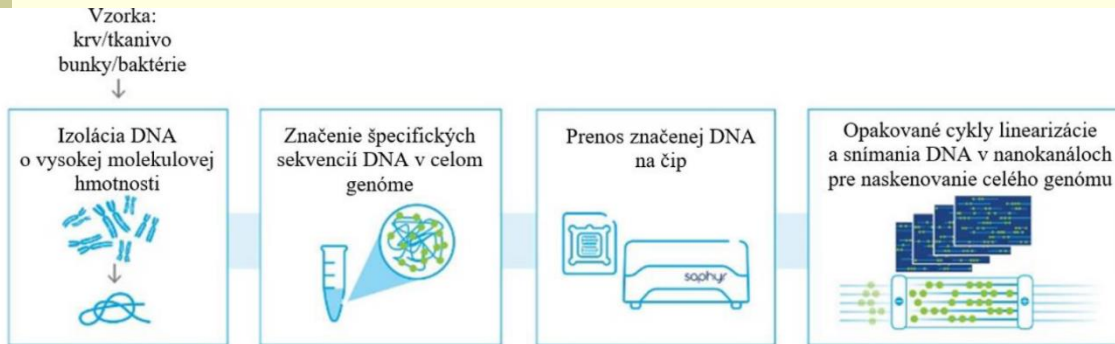
## Next generation cytogenetics



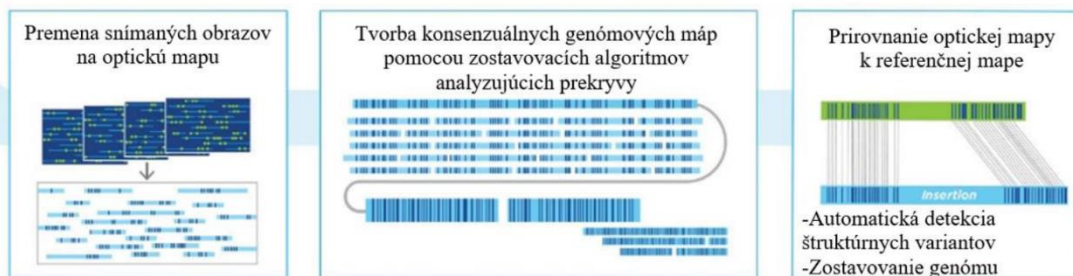
**Cytogenetics with 500,000 'bands' i.e. labels ~10,000 improved sensitivity!**

- Genomewide analysis
- Positional information
- Single molecule resolution

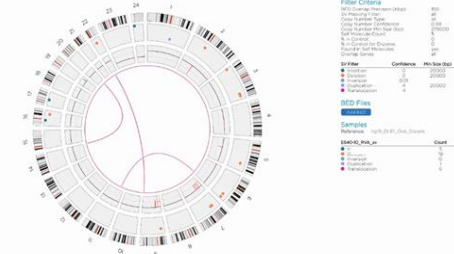
# Optické mapování genomu - postup



Efektívne snímanie molekúl DNA o dĺžke niekoľko megabáz s vysokým rozlíšením



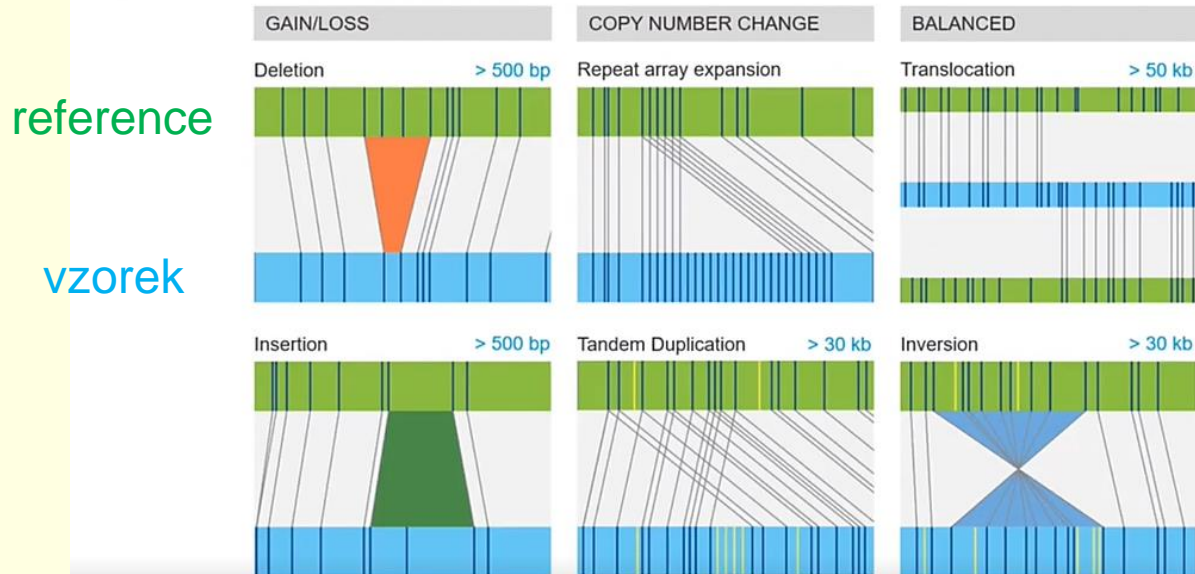
Visualize and Manipulate Maps and Structural Variants



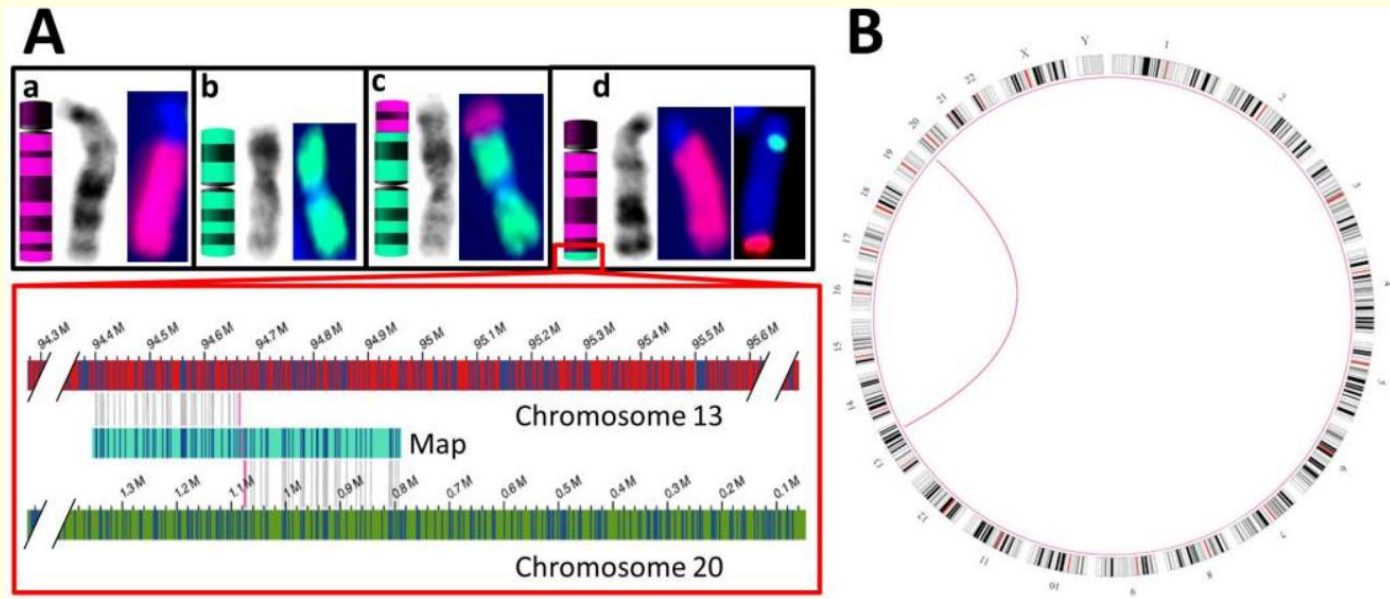
Bionano Genomics (<https://bionanogenomics.com/technology/platform-technology/>)

# Detekce chromozomových aberací pomocí optického mapování

## Structural variant calling by optical mapping



# OGM - příklad translokace (13;20)(q32;p13)



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

---

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

Detekce strukturních změn:

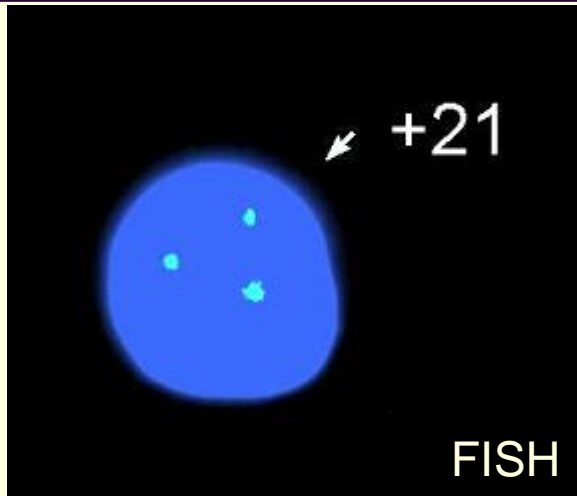
- **balancované**: inverze, reciproké translokace, robertson. translokace,...
- **nebalancované**:
  - Mikrodelece (mikrodeleční/mikroduplikační syndromy, CNV,..)
  - Subtelomerické přestavby
  - Nebalancované translokace
  - Marker chromozomy
  - Izochromozom; ring chromozomy,...

Detekce LOH, UPD

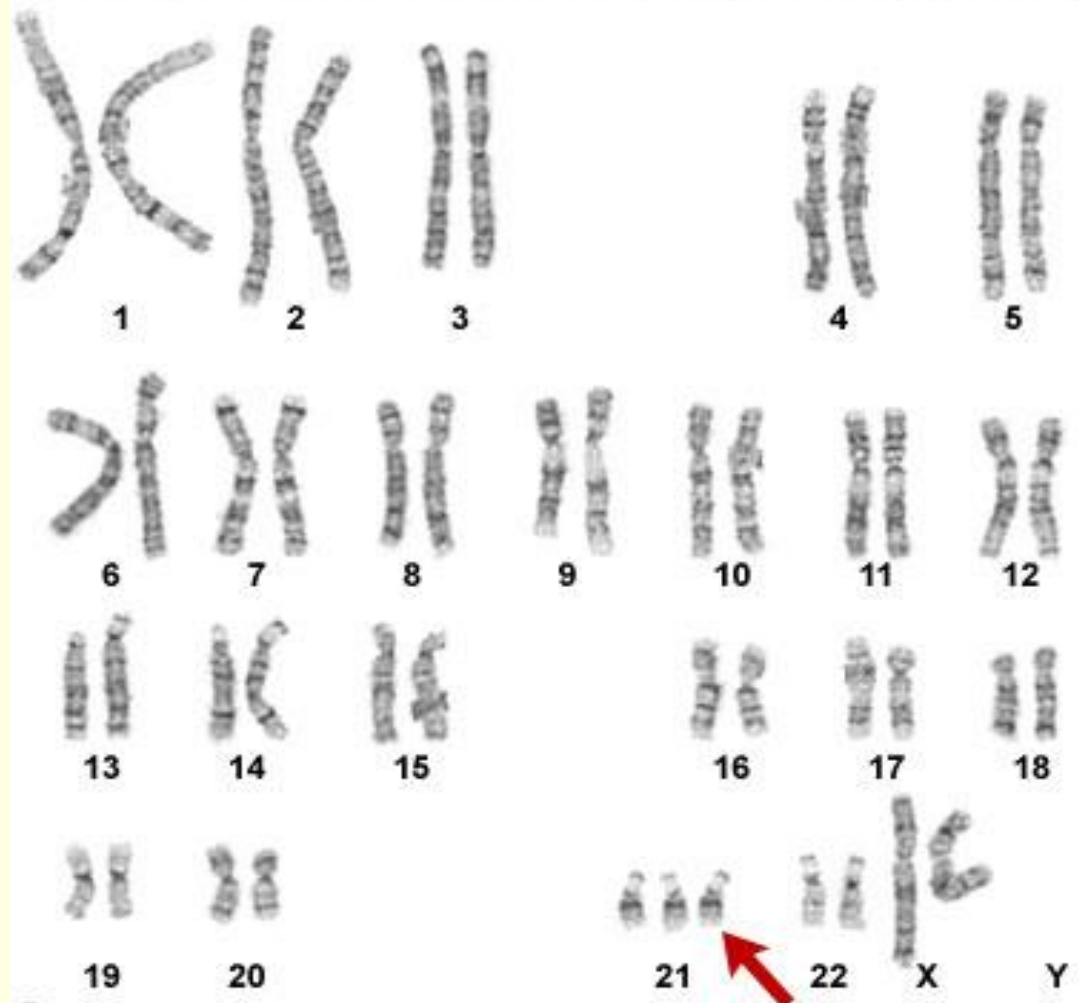


# Využití metod molekulární cytogenetiky (příklady)

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



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



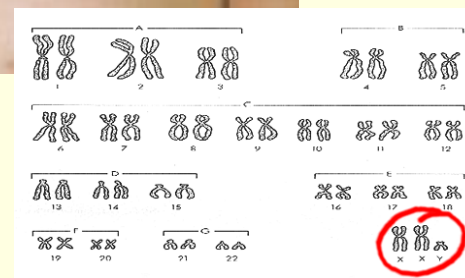
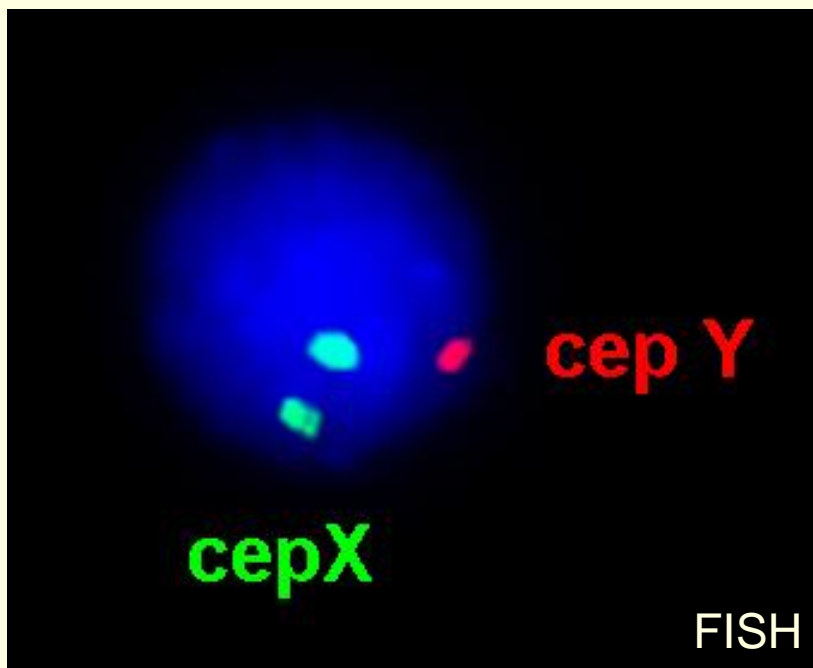


# Využití metod molekulární cytogenetiky

(příklady)

## numerické změny: Klinefelterův syndrom

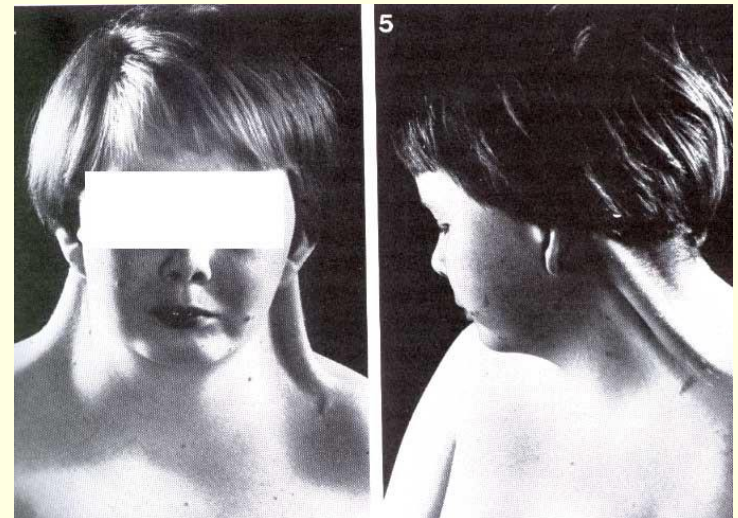
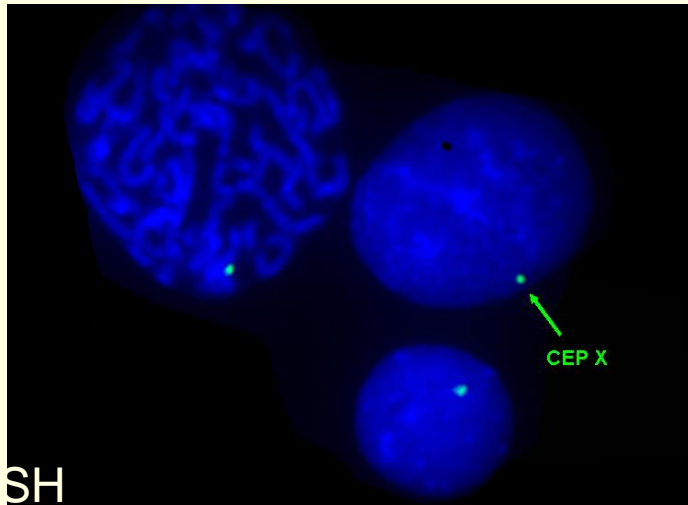
- **47,XXY**
- vysoká postava, porucha růstu vousů, ženská distribuce podkožního tuku, PMR



# Využití metod molekulární cytogenetiky (příklady)

## numerické změny: Turnerův syndrom

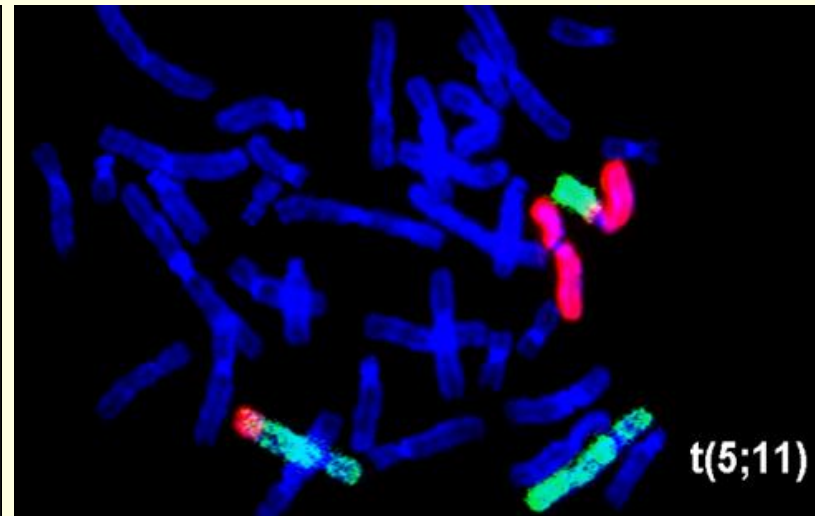
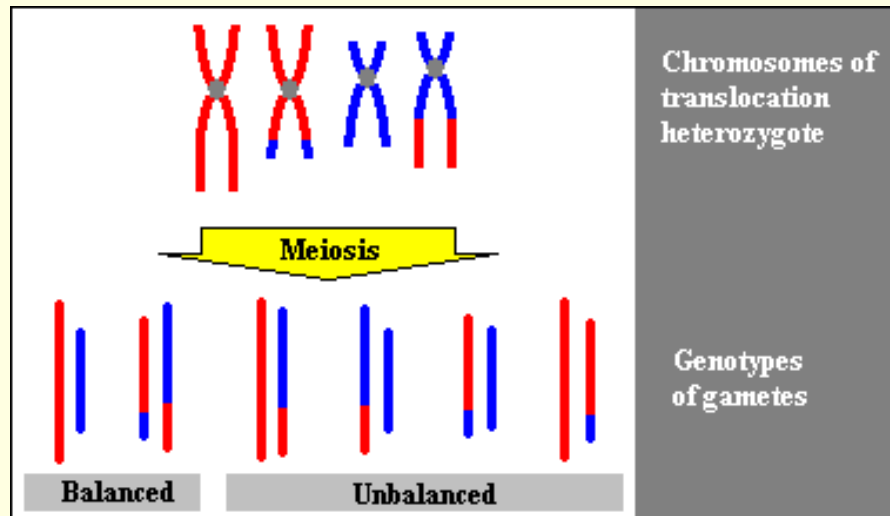
- **45,X**
- chybí jeden chromozom X
- 1/2500 dívek
- 95 % SA
- malá postava, chybí vaječníky až sterilita



# 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**



# Kazuistika

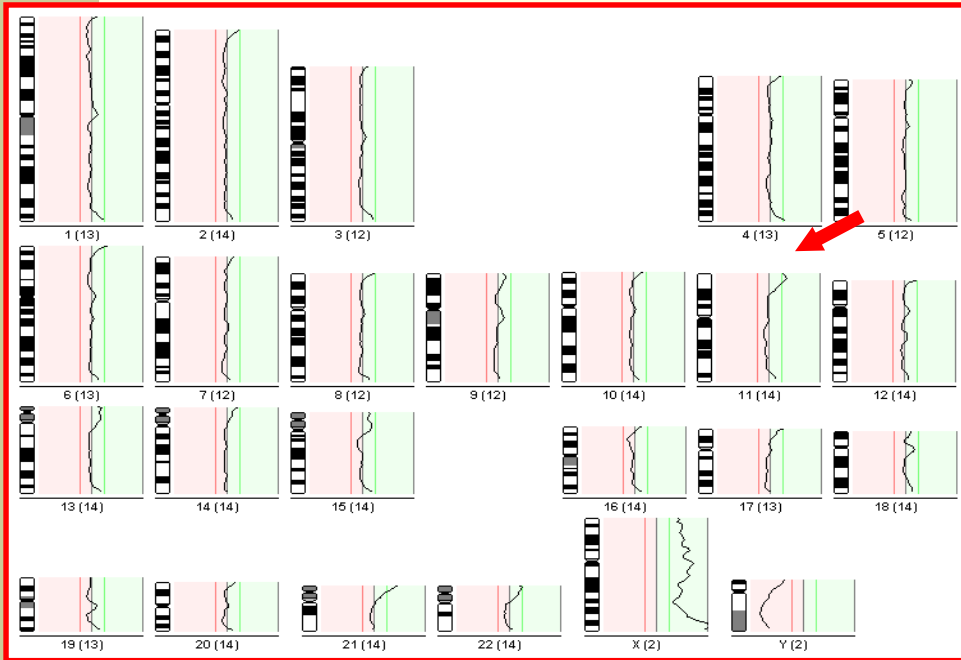
- děvče, rok narození 2002
- dg: stigmata - mongoloidní postavení očí, hyperplastická gingivální sliznice, soudkovitý hrudník, velké rozlité břicho
- matka 46,XX, inv(9), otec 46,XY,add(1)[87]/46,XY[13]



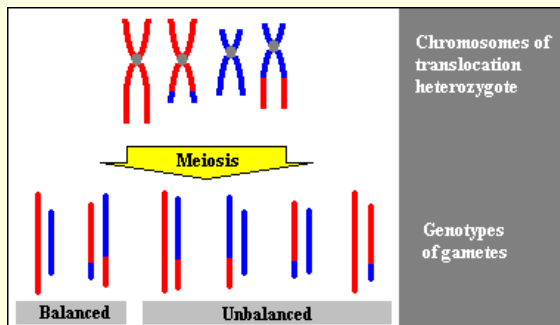
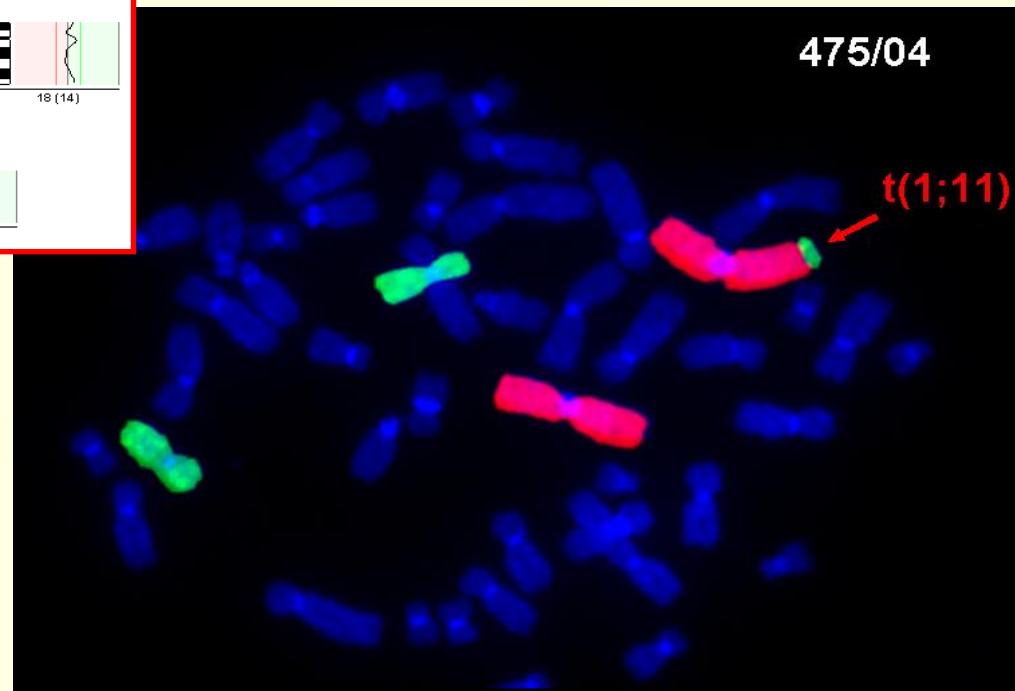
46,XX,add(1)

# Kazuistika

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



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

Jsou způsobeny mikrodelecí úseku chromozomu – většinou 2 – 4 Mb

## Nejčastější rekurentní mikrodeleční syndromy:

DiGeorgeův/Velokardiofaciální syndrom

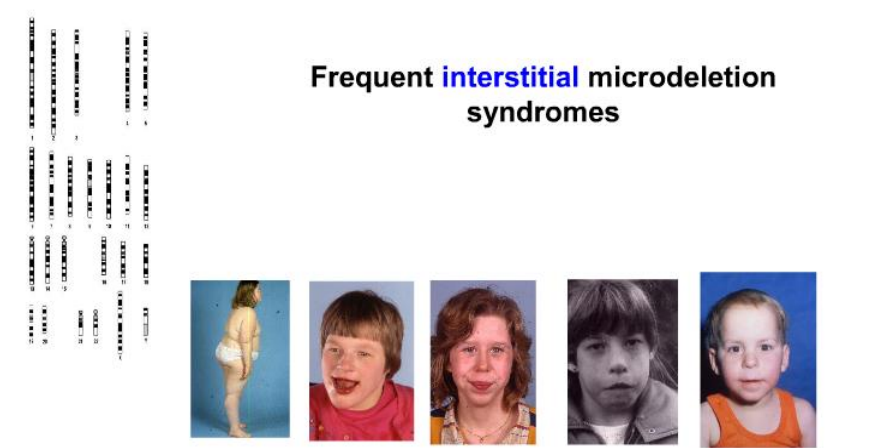
Prader-Williho a Angelmanův syndrom

Williamsův-Beurenův syndrom

## Obecné příznaky:

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

Frequent **interstitial** microdeletion syndromes



Prader-Willi    Angelman    Williams    velo-cardiofacial    Langer-Giedeon

Diagnosis by FISH

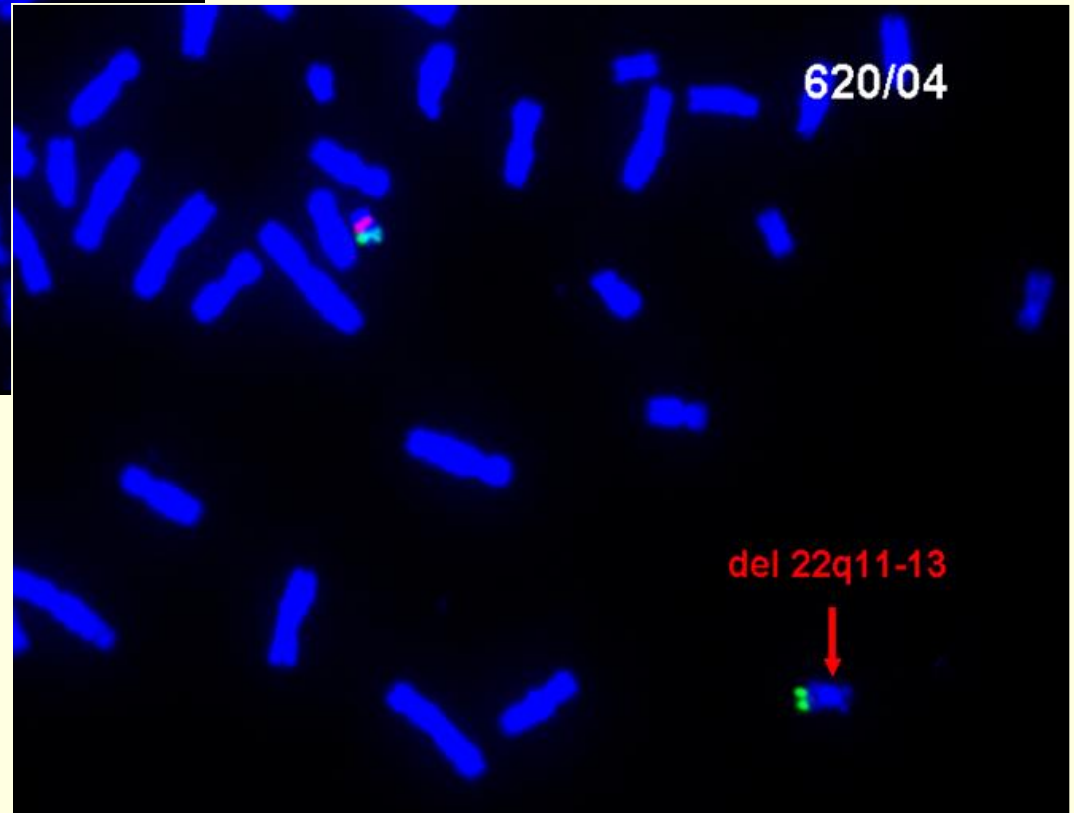
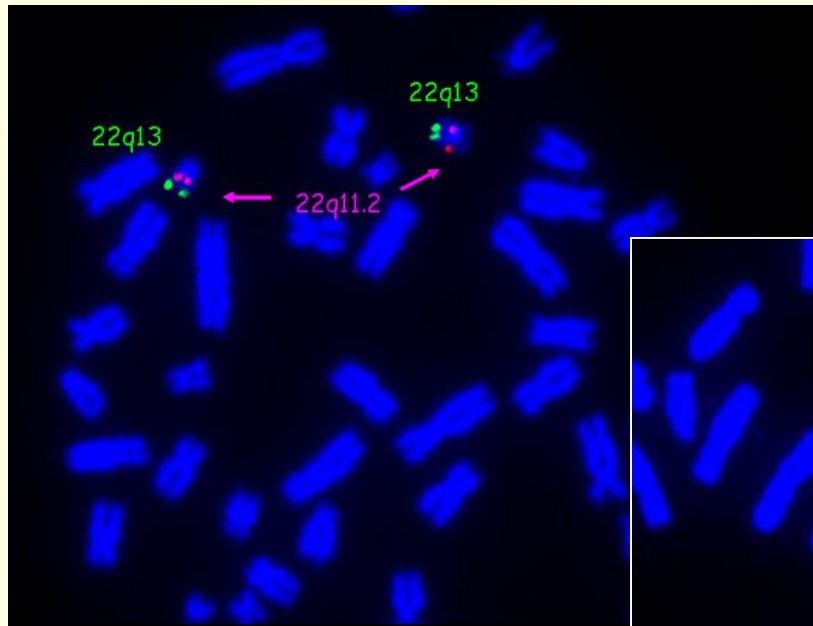
Mikrodeleční syndrom	Lokalizace	Nejčastější velikost přestavby [kb]	Četnost v populaci
DiGeorgeův syndrom/ Velokardiofaciální syndrom	22q11	3 000	1:4 000
Williamsův-Beurenův syndrom	7p11.23	2 000	1:10 000
Smith-Magenisův syndrom	17p11.2	5 000	1:25 000
Prader-Williho syndrom/ Angelmanův syndrom	15q11-q13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



# Využití metod molekulární cytogenetiky

FISH: detekce mikrodelečních syndromů

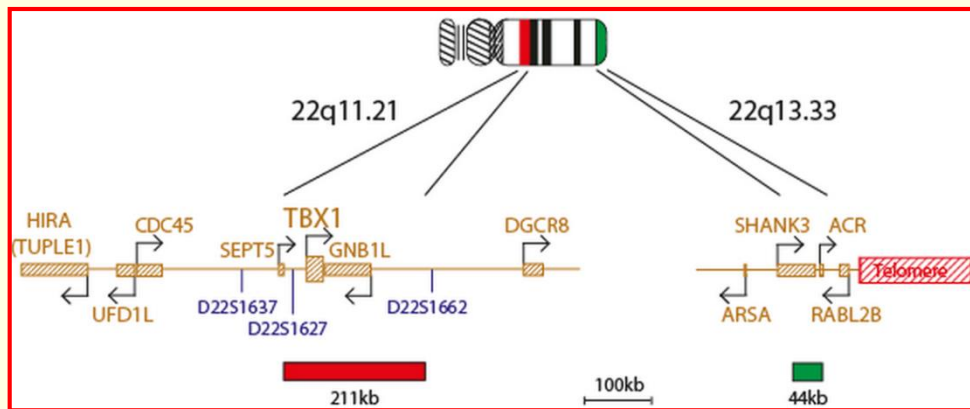
– např. del 22q11 **DiGeorge syndrom**



- SRDEČNÍ VADY
- ANOMÁLIE TVÁŘE
- PORUCHY IMUNITY

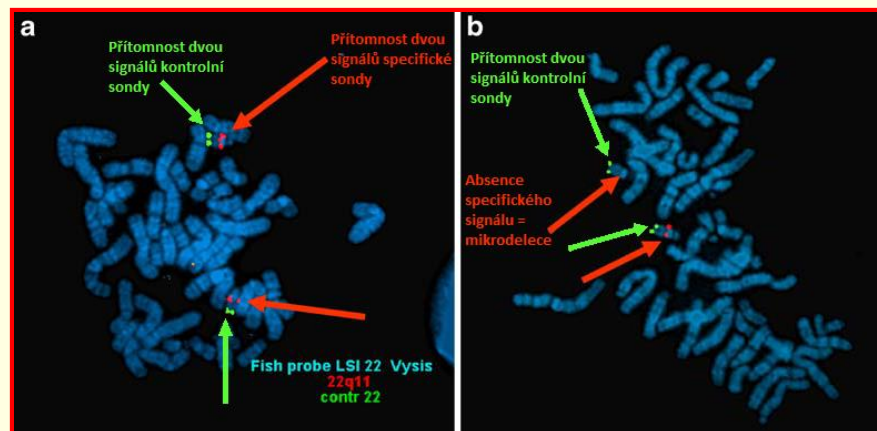
# Využití metod molekulární cytogenetiky

## FISH: DiGeorge syndrom del 22q11



**Obrázek:** Příklad komerčně dostupných sond pro detekci mikrolece 22q11 ([www.cytocell.co.uk](http://www.cytocell.co.uk))

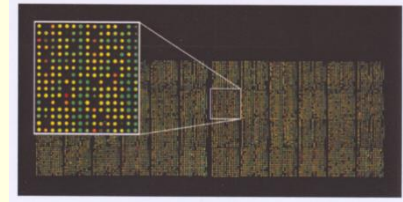
### Dvoubarevná FISH



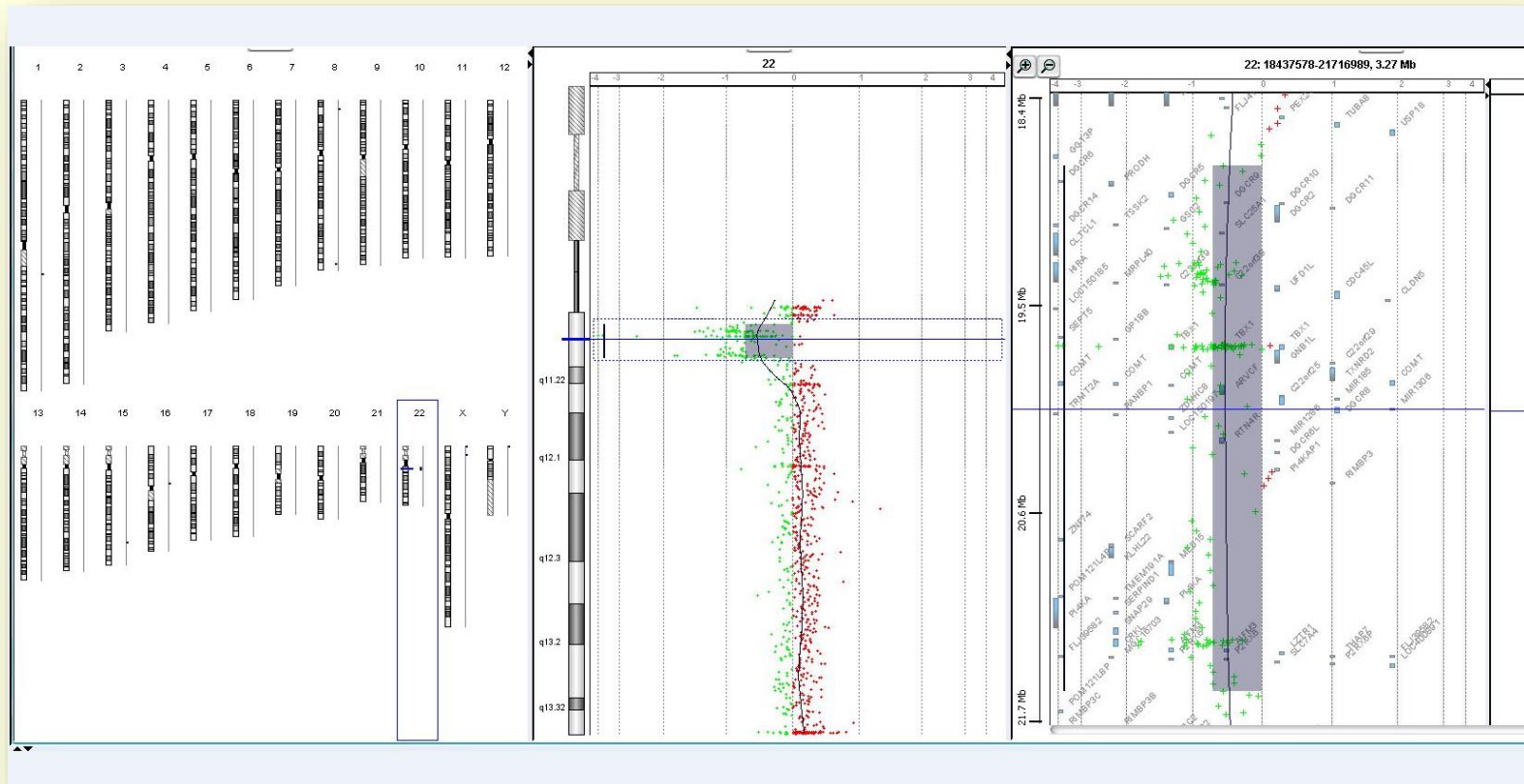
**Obrázek:** Ukázka normální mitózy a mitózy s mikrolecí 22q11 vyšetřená pomocí techniky FISH (de Ravel *et al.*, 2007; upraveno)

# Využití metod molekulární cytogenetiky

## 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: **arr[GRCh37] 22q11.21(18818376\_21540347)x1**

# Využití metod molekulární cytogenetiky

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

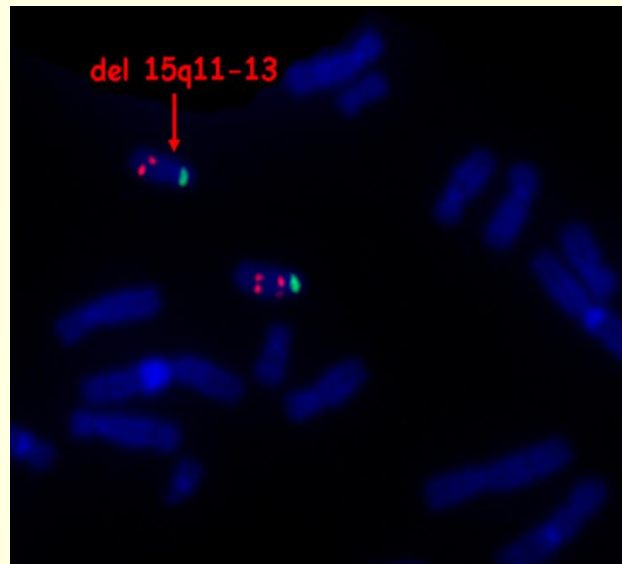
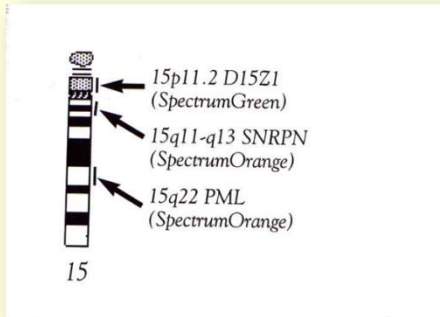
del 15q11-13

## Metody pro stanovení diagnózy PWS a AS

Cytogenetické : karyotyp - translokace

Molekulárně cytogenetické : FISH - mikrodelece

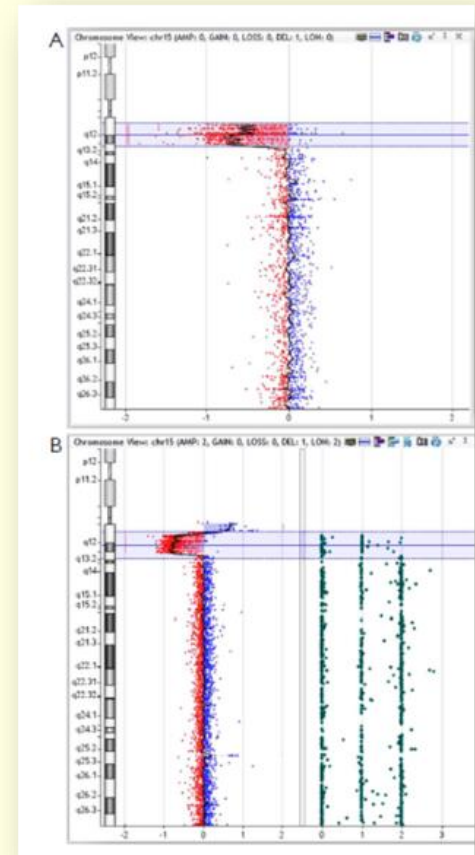
15q11-13 DNA sonda



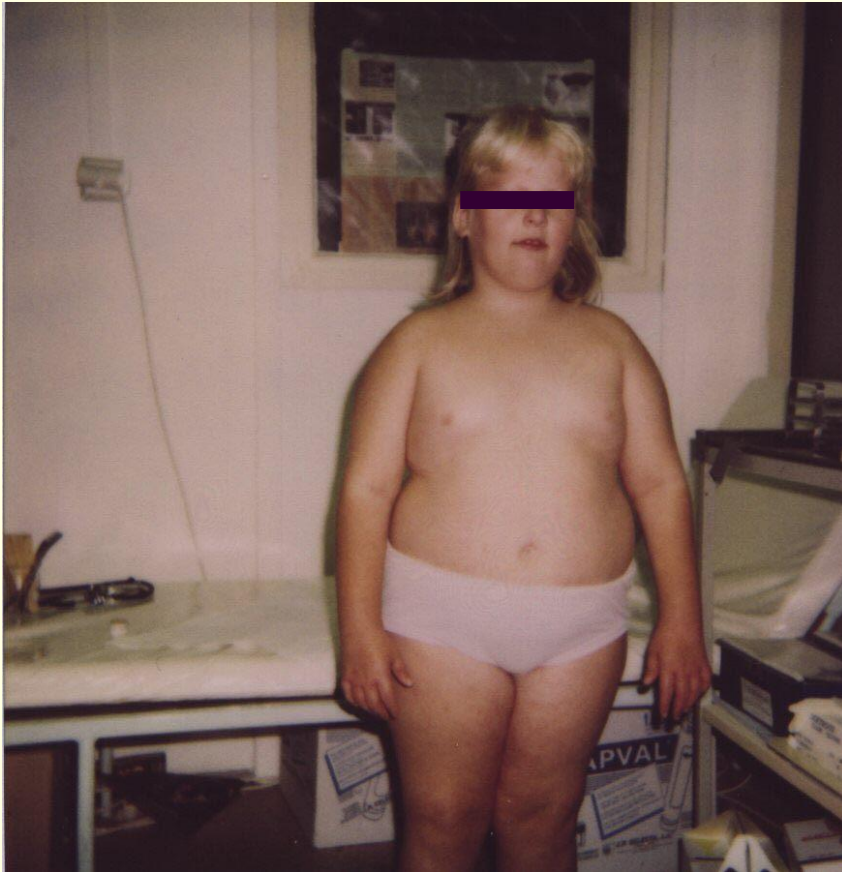
MLPA, array-CGH

Molekulárně genetické:

PCR - uniparentální disomie, Metylační analýza



# 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

## 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 %)

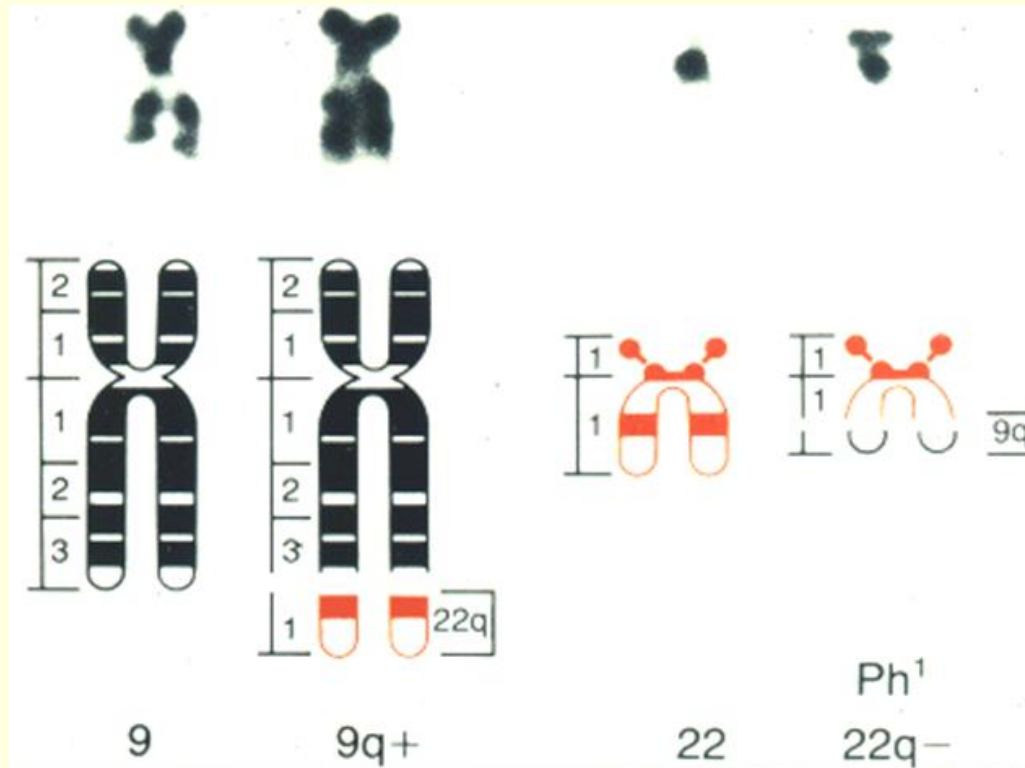
# Využití metod molekulární cytogenetiky

onkocytogenetika (příklad reciproké translokace)

Chronická myeloidní leukemie (CML)

## Philadelphský chromozóm

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





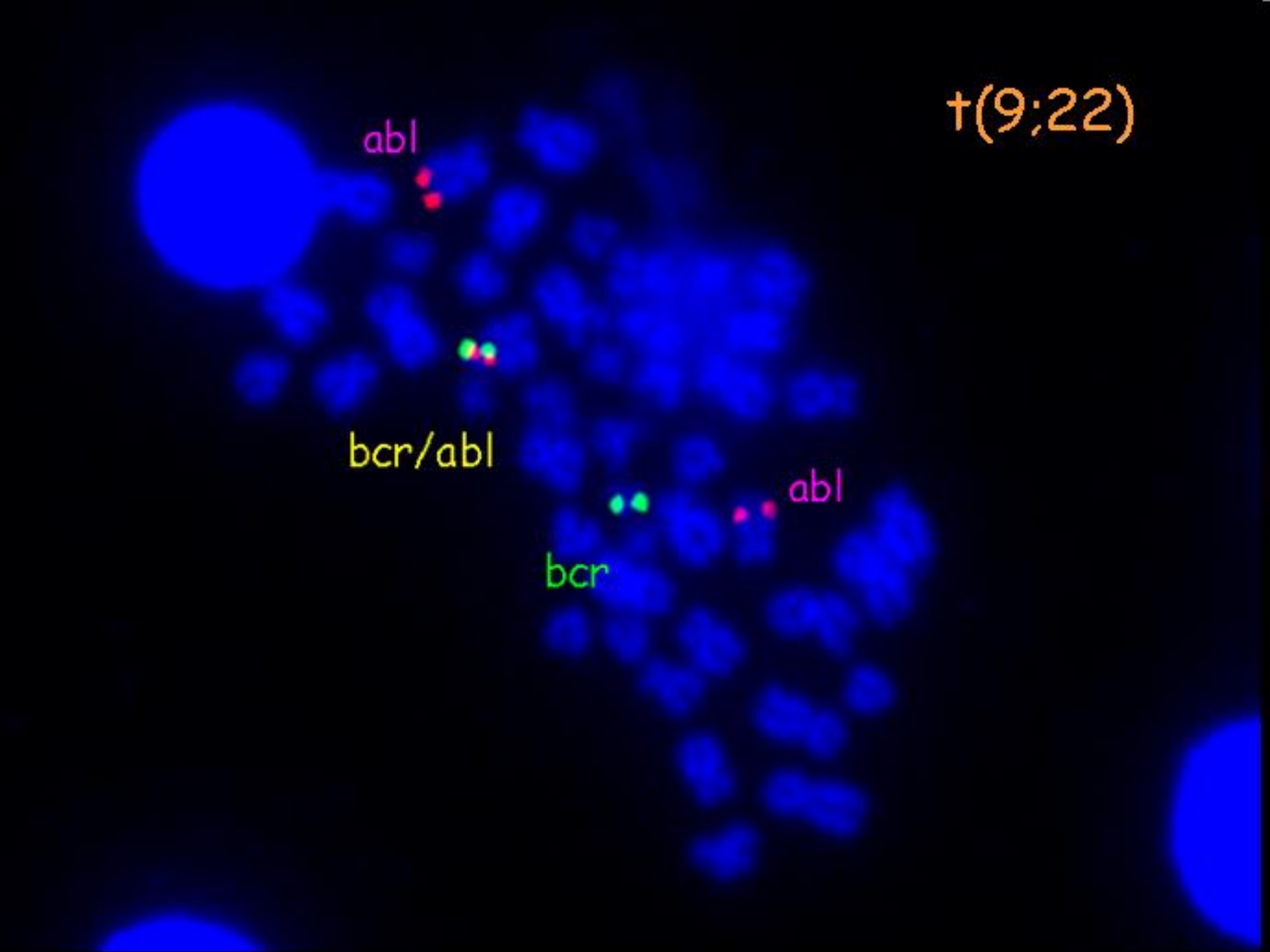
+ (9;22)

abl

bcr/abl

bcr

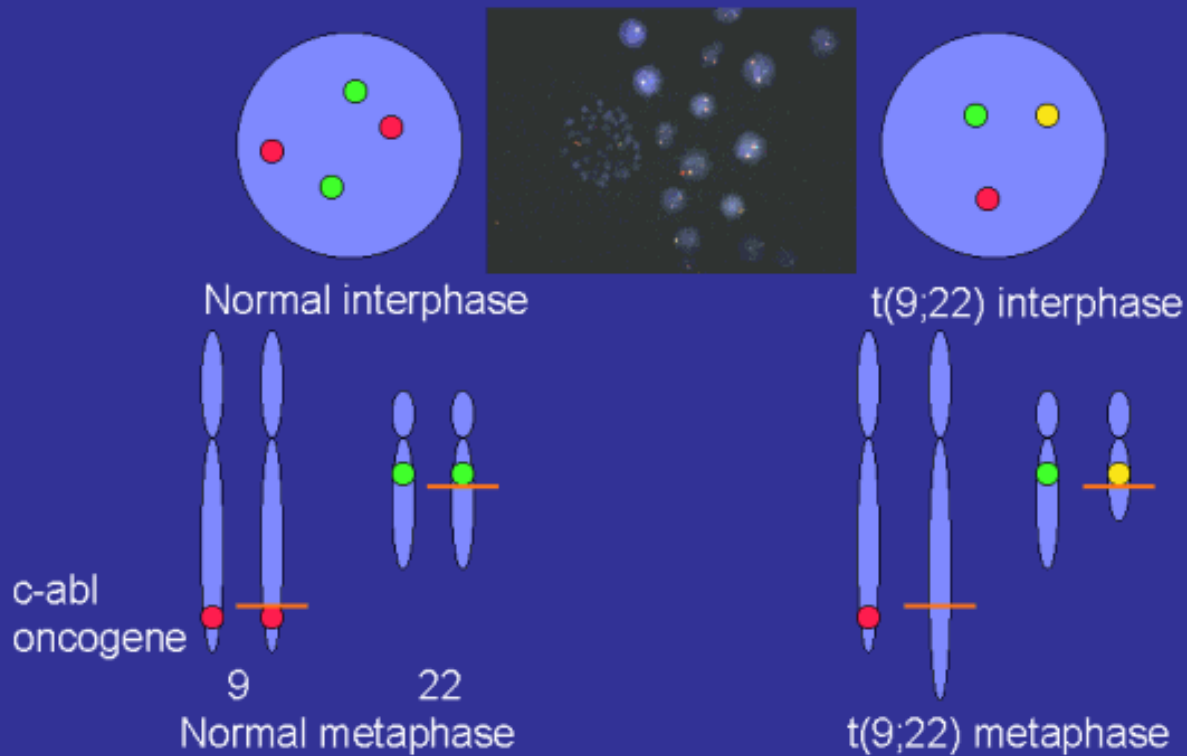
abl



# Philadelphský chromozóm

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

## Two colour FISH for cancer translocations (CML)



# Philadelphský chromozóm

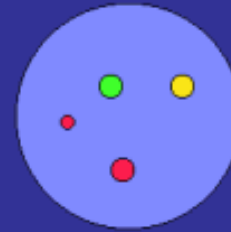
translokace BCR/ABL (9q34/22q11.2)

## Two colour (ES) FISH for CML

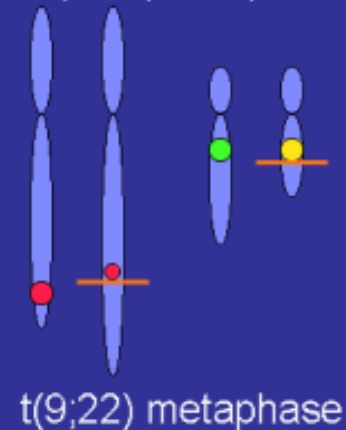
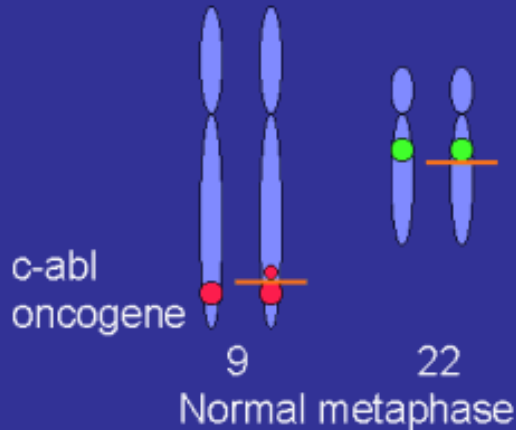
Larger probe – spanning the breakpoint



Normal interphase



t(9;22) interphase



# Využití 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

