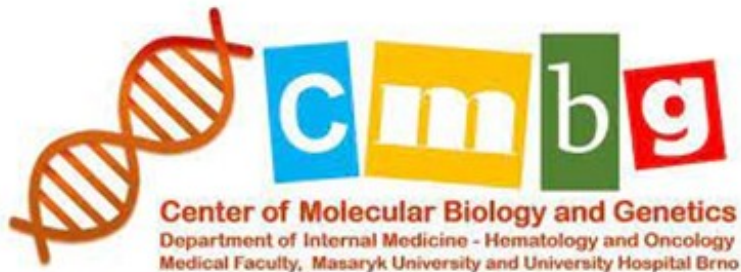


Metody molekulární cytogenetiky



Mgr. Hana Dynková Filková

Sekce cytogenomiky, Centrum molekulární biologie a genetiky, IHOK, 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

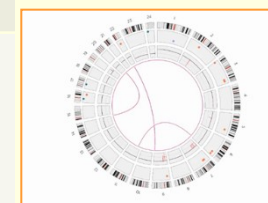
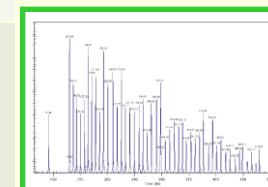
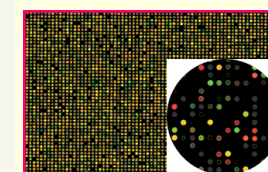
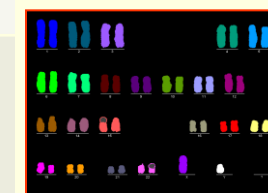
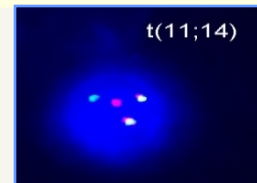
Materiál pro cytogenetické vyšetření

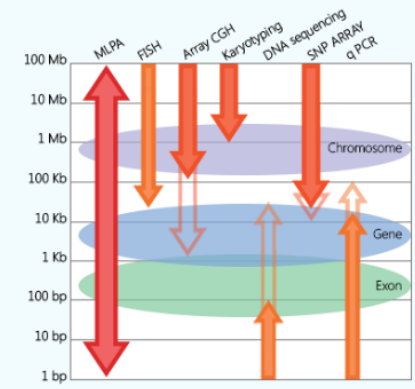
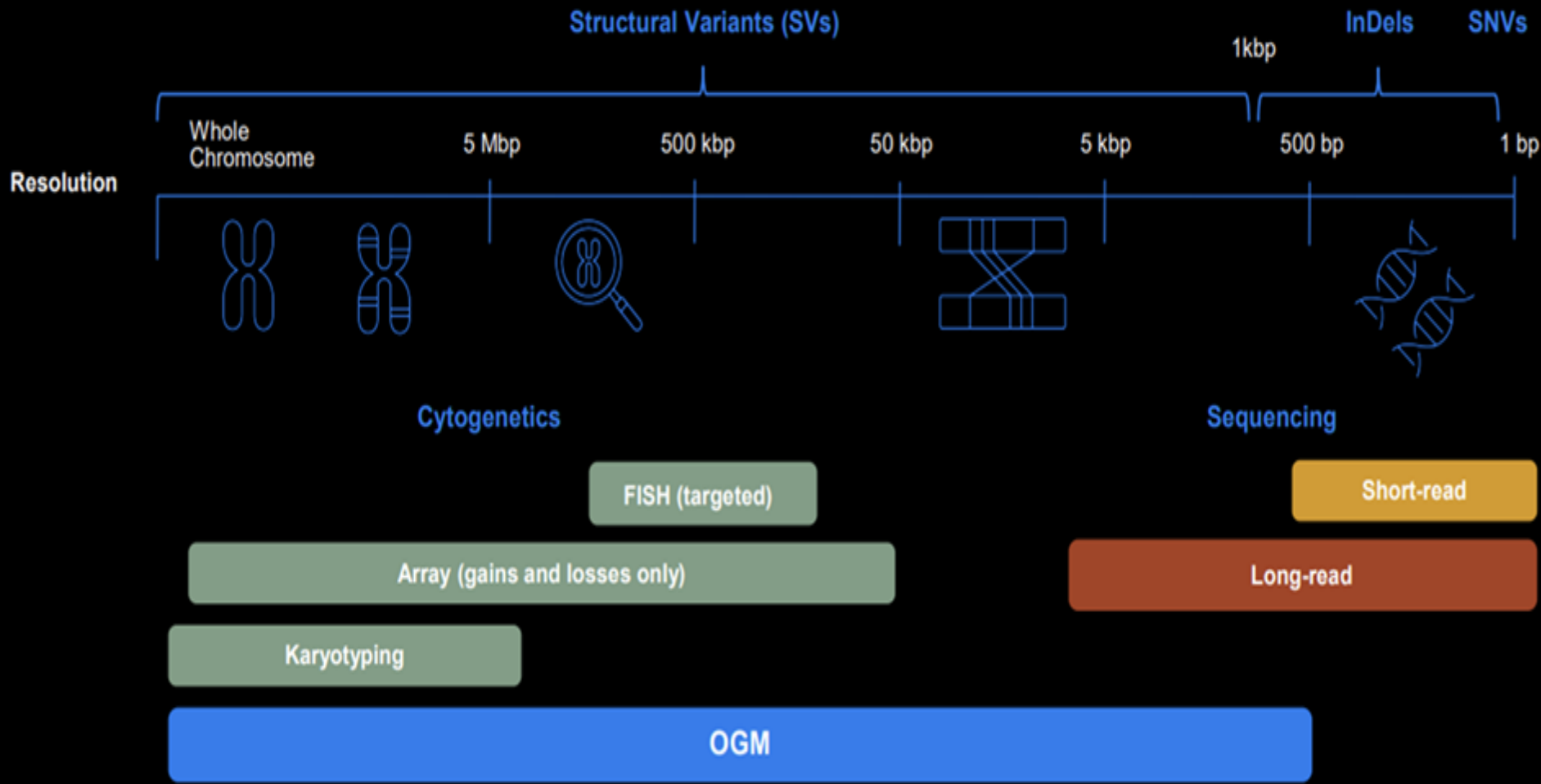
- periferní krev
- vzorky různých tkání (biopsie kožní)
- buňky plodové vody, choriových klků, placenty
- pupečnicková krev
- buňky kostní dřeně
- vzorky solidních nádorů

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

I. Metody molekulární cytogenetiky

	citlivost	detekované změny	materiál	metoda
(KARYOTYP)	5-10 Mb	balancované změny nebalancované změny	suspenze buněk (metafázní chromozomy)	celogenomová metoda
FISH (fluorescenční in situ hybridizace)	cca >10 kb	balancované změny nebalancované změny	suspenze buněk (interfázní jádra, metafázní chromozomy)	cílená metoda
M FISH (mnohobarevná FISH)	5-10 Mb	balancované změny nebalancované změny	suspenze buněk (metafázní chromozomy)	celogenomová metoda
Array CGH (komparativní genomová hybridizace na čípech)	cca > 50 kb	nebalancované změny (zisky, ztráty)	izolovaná DNA	celogenomová metoda
MLPA (Multiple Ligation-dependent Probe Amplification)	> (1bp) 1kb	nebalancované změny (zisky, ztráty)	izolovaná DNA	cílená metoda - vyšetření až 50 sekvencí najednou
OGM (Optical Genome Mapping)	>500 bp	balancované změny nebalancované změny	izolovaná DNA	celogenomová metoda



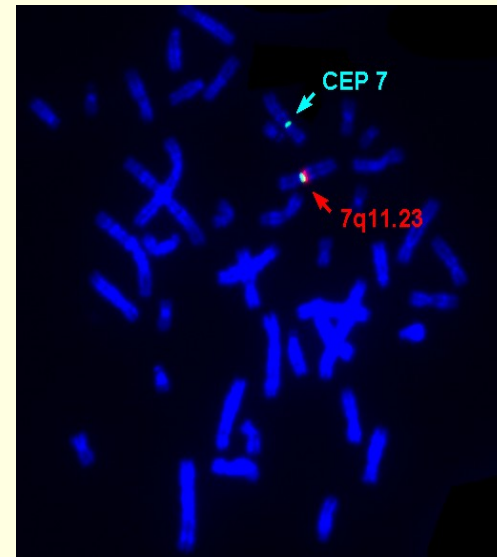
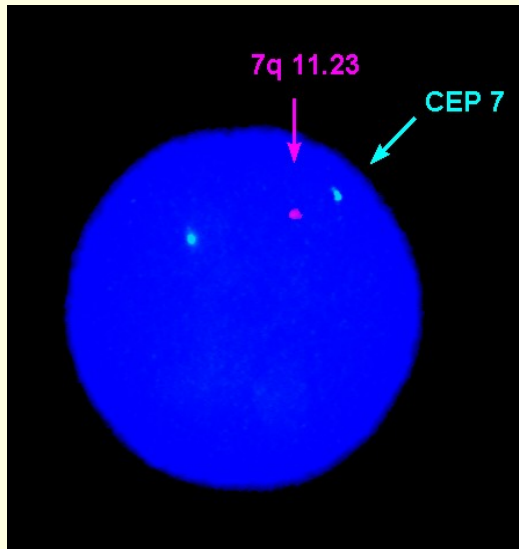


FISH = fluorescenční *in situ* hybridizace

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)

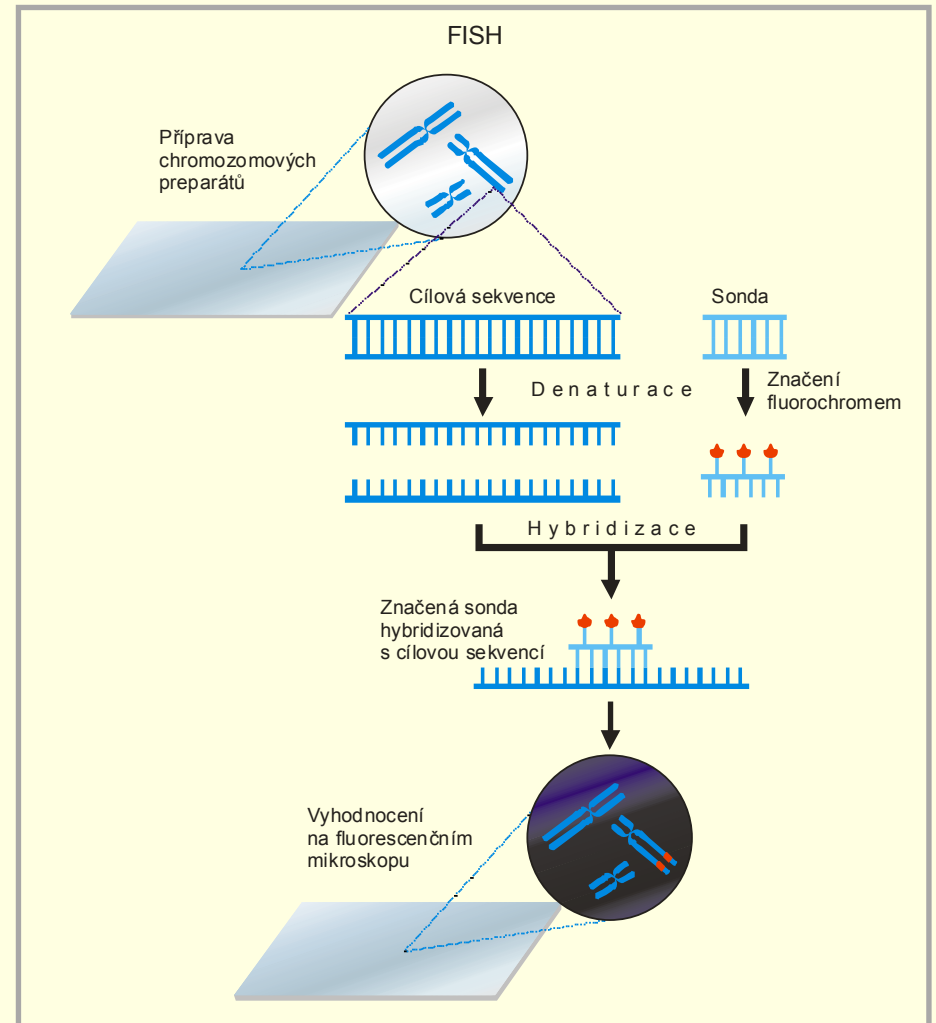
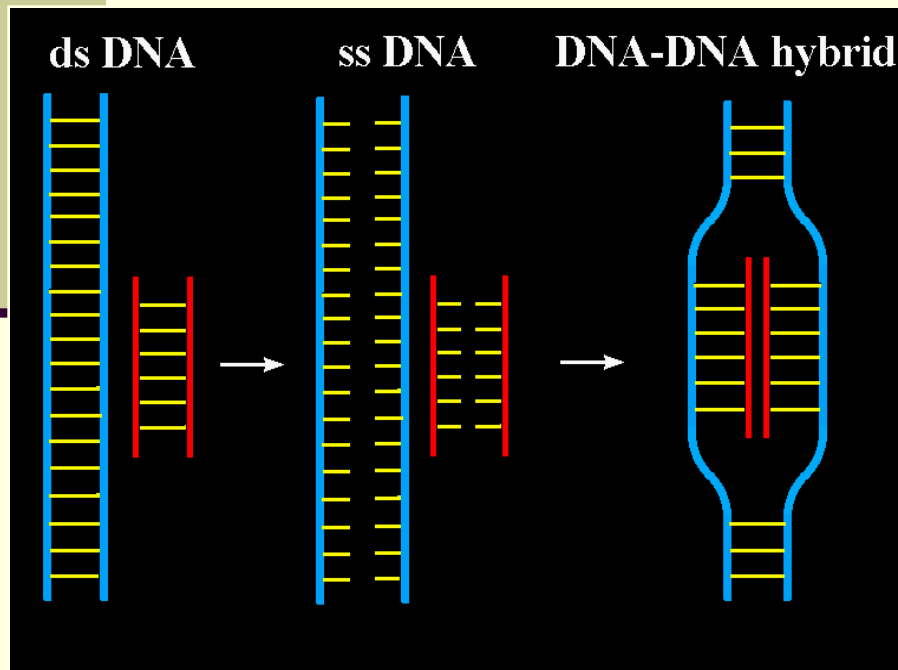
Hybridizace sondy (značené fluorescenčním barvivem) s chromozómy na cytogenetickém preparátu



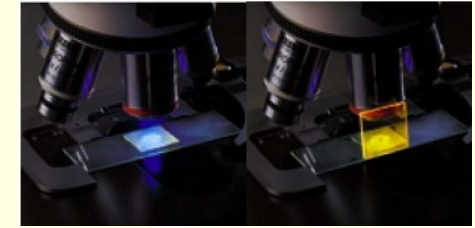
Postup FISH

Zhotovení kvalitních preparátů

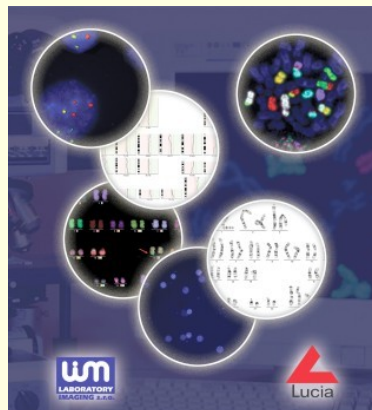
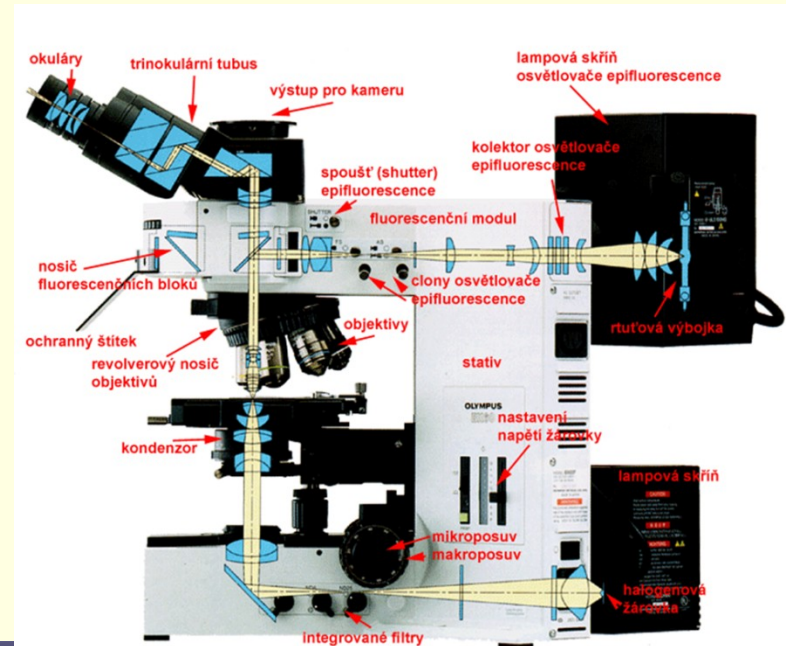
1. Denaturace sondy i cílového místa
2. Hybridizace
3. Odmytí
4. Barvení pozadí
5. Hodnocení pomocí fluorescenčního mikroskopu



FISH Vybavení



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



FISH : Typy sond

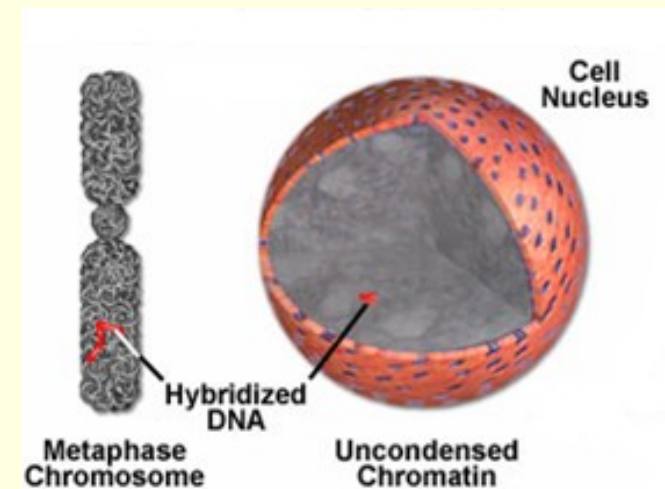
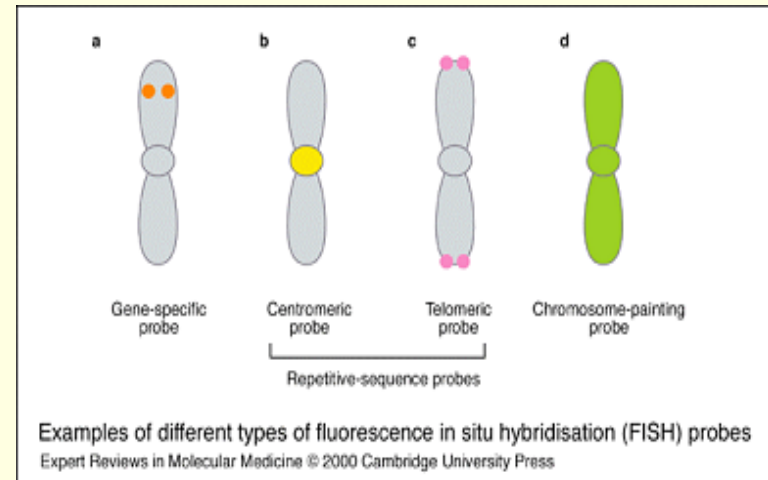
- Celochromozomové
- Centromerické
- Sondy subtelomerické
- Sondy lokus specifické

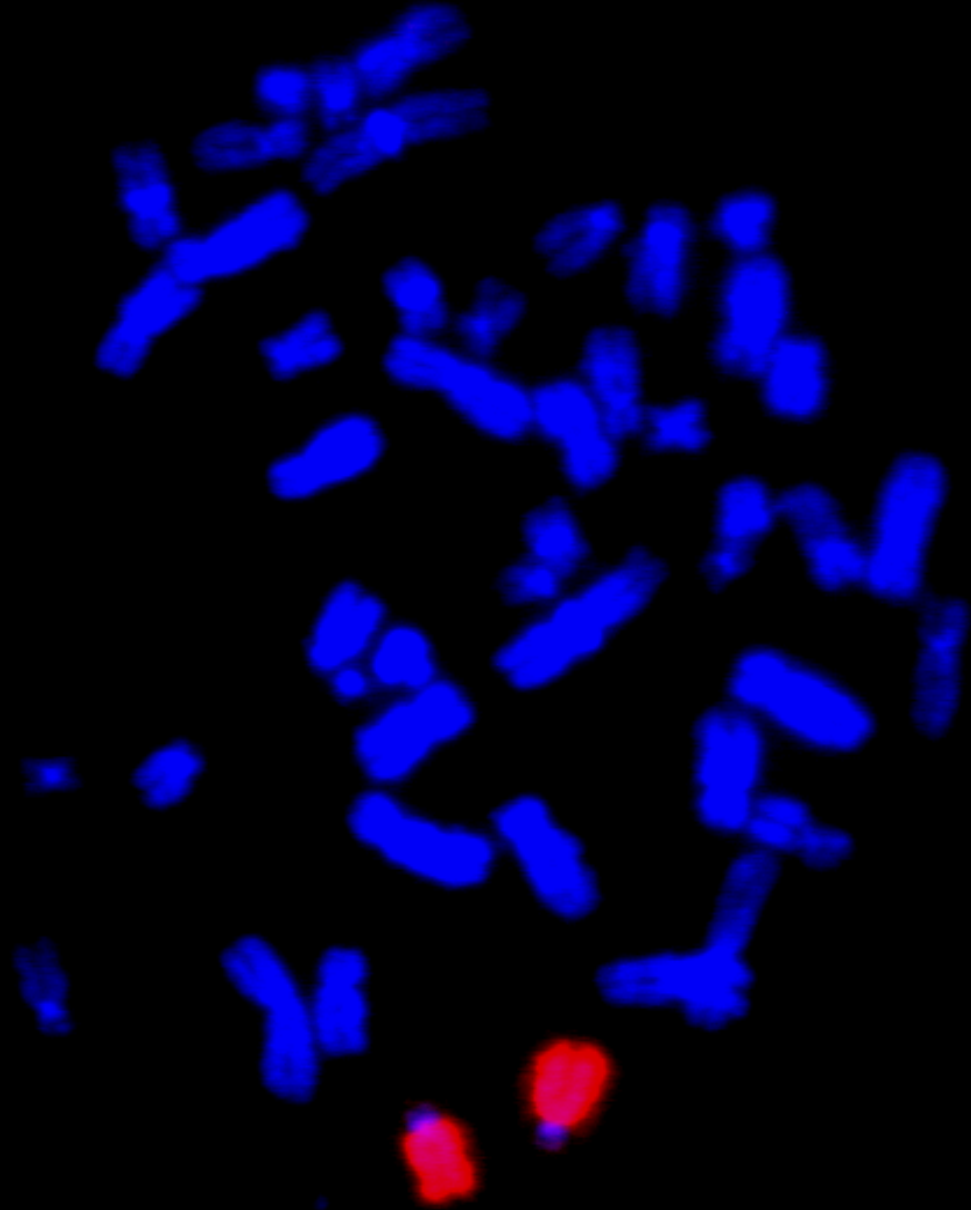
Sondy pro jedinečné sekvence:

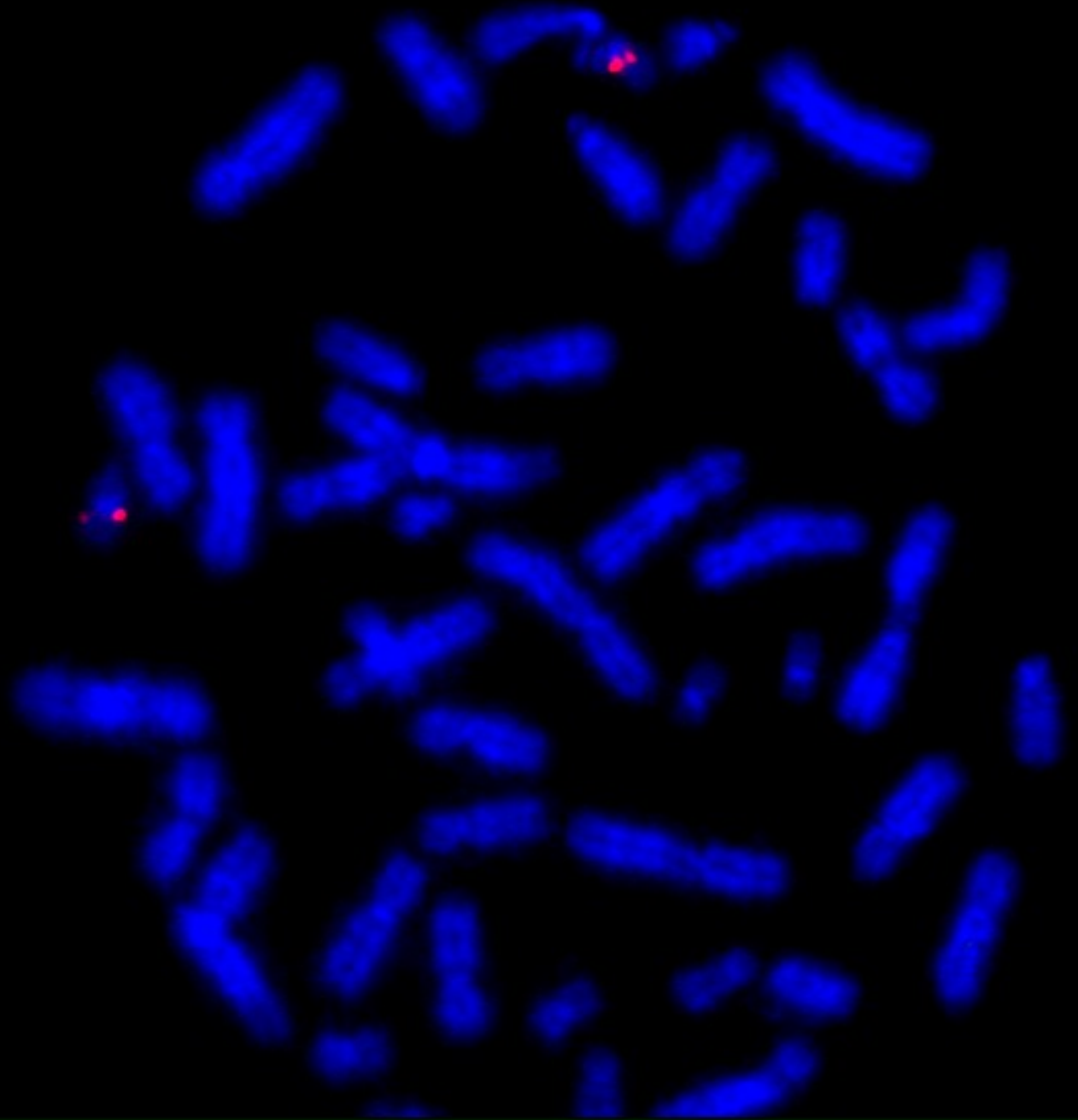
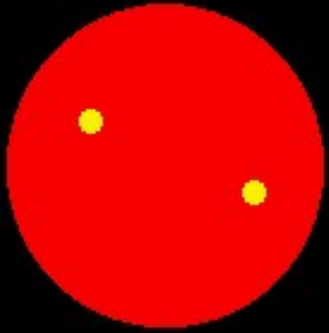
- plazmidové (500pb-5 kb)
- kosmidové (20-50 kb)
- bakteriofág lambda (8-15 kb)
- YAC klony (50-1000 kb)

Značení DNA sond

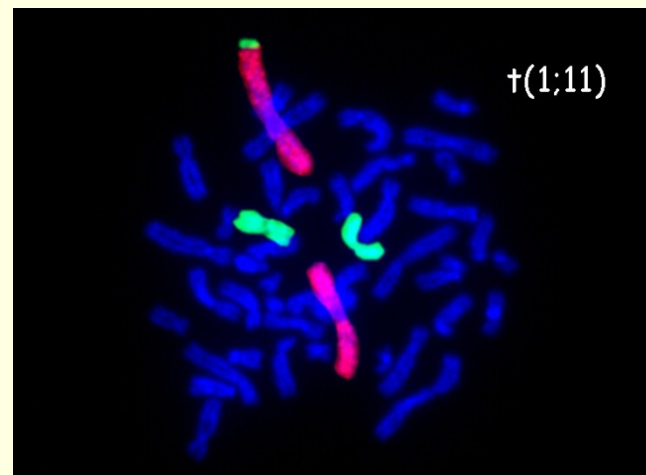
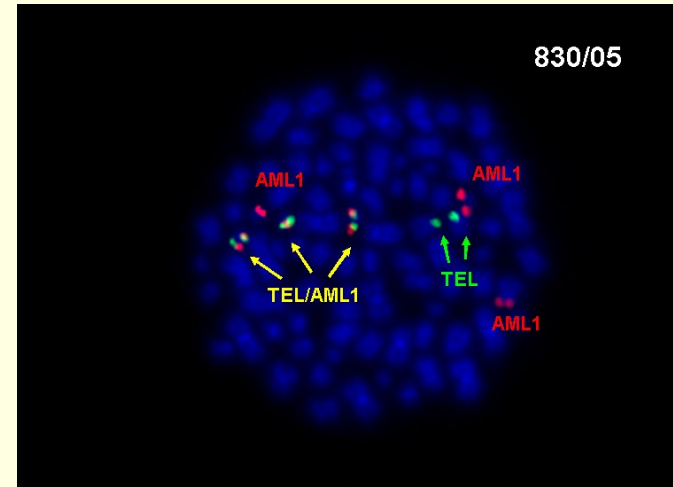
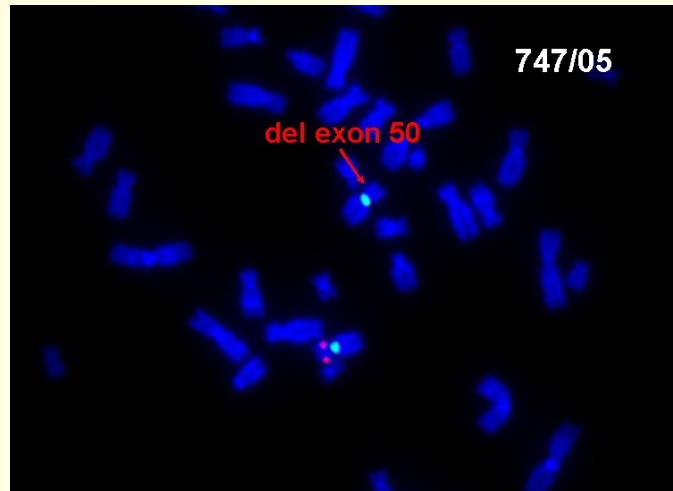
- **fluorochromy**, Texas Red, Spectrum Green, Spectrum Orange, FITC, TRITC, SpectrumAqua, SpectrumGold, aj







FISH : Přítomnost, počet a poloha signálů



Mnohobarevná FISH (M FISH)

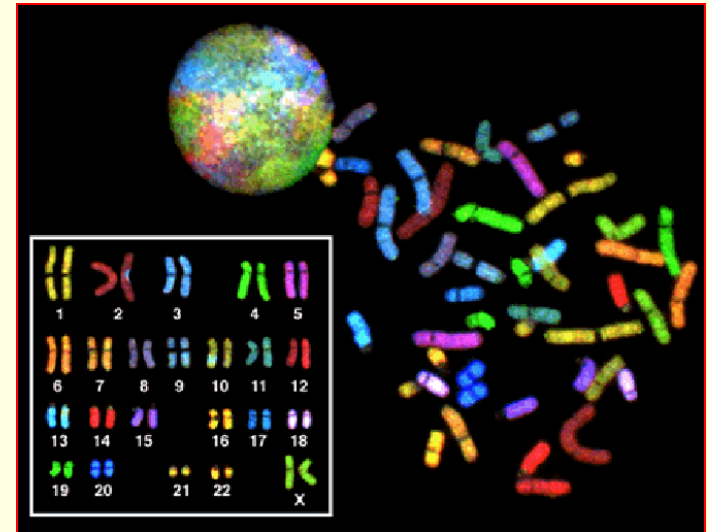
vícebarevné FISH techniky – detekce více značených sond na jednom preparátu

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

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

Sky Information

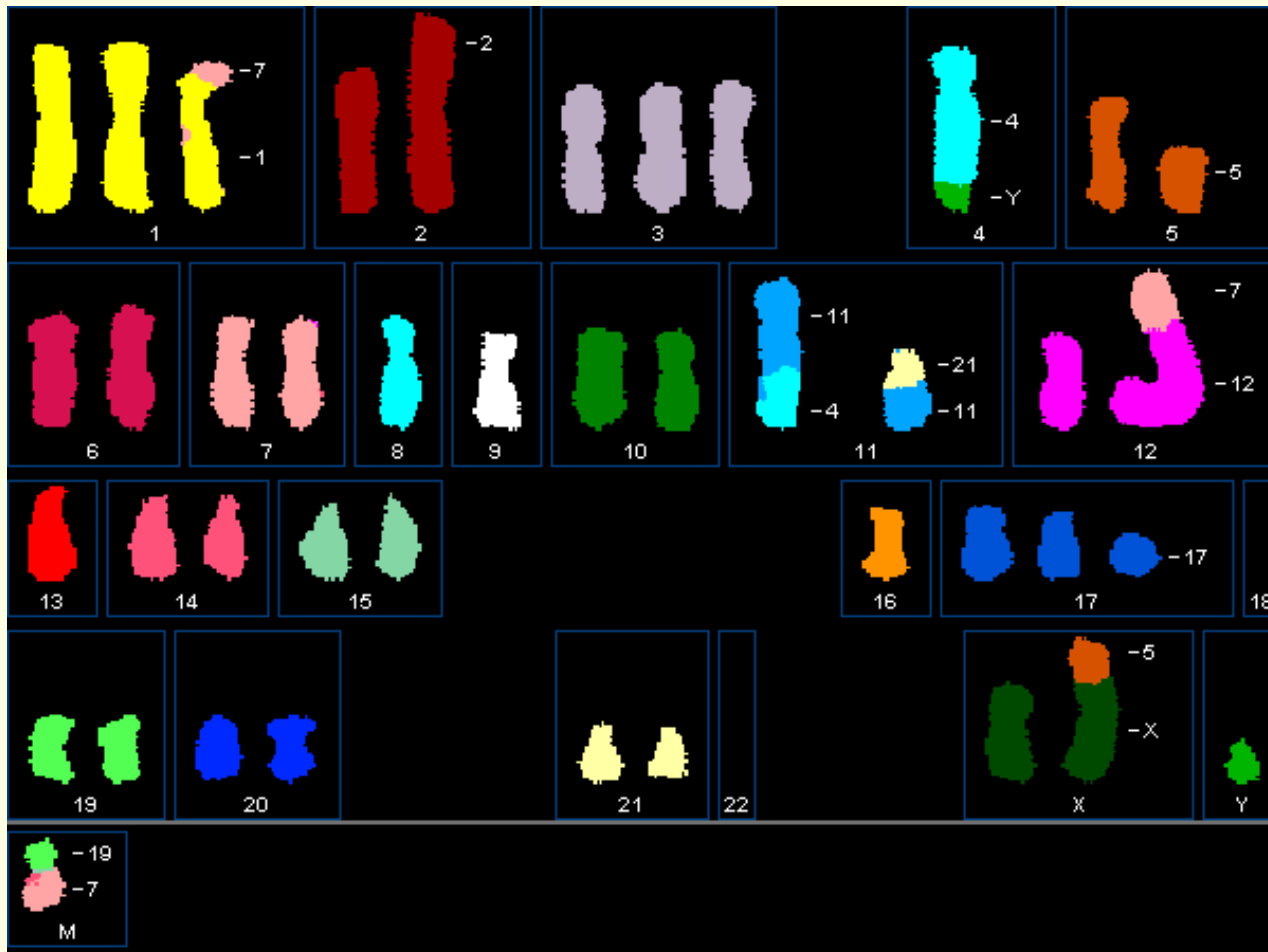
Spectrum
 556
 500 600 700

Reference: A B C D E F
 Markers: a b c d e f g h

Under the Cursor Normalization

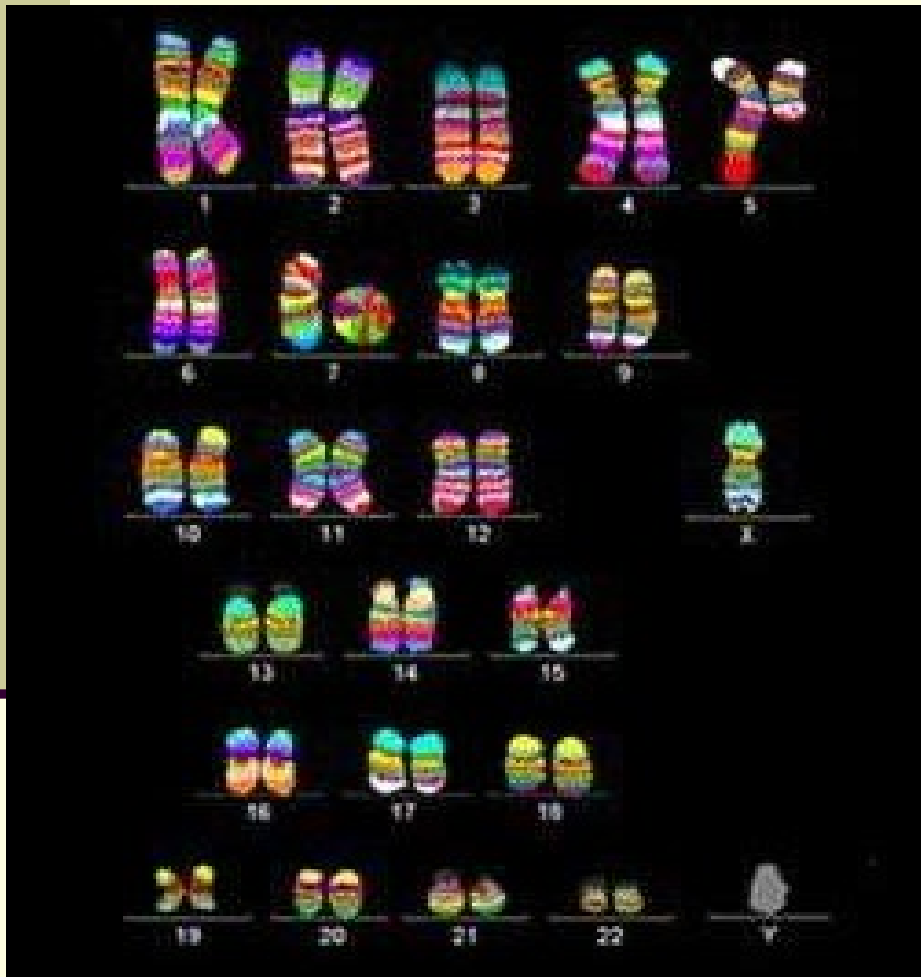
For Help, press F1 0% Chromosomes: 46 Out of image 88%

M FISH - komplexní karyotyp

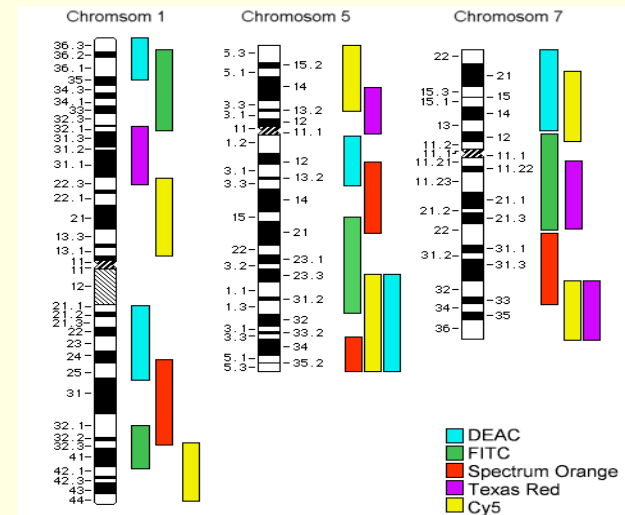


Obr. 10 (Dokumentace OLG FN Brno)

Mnohobarevné pruhování (M-banding)

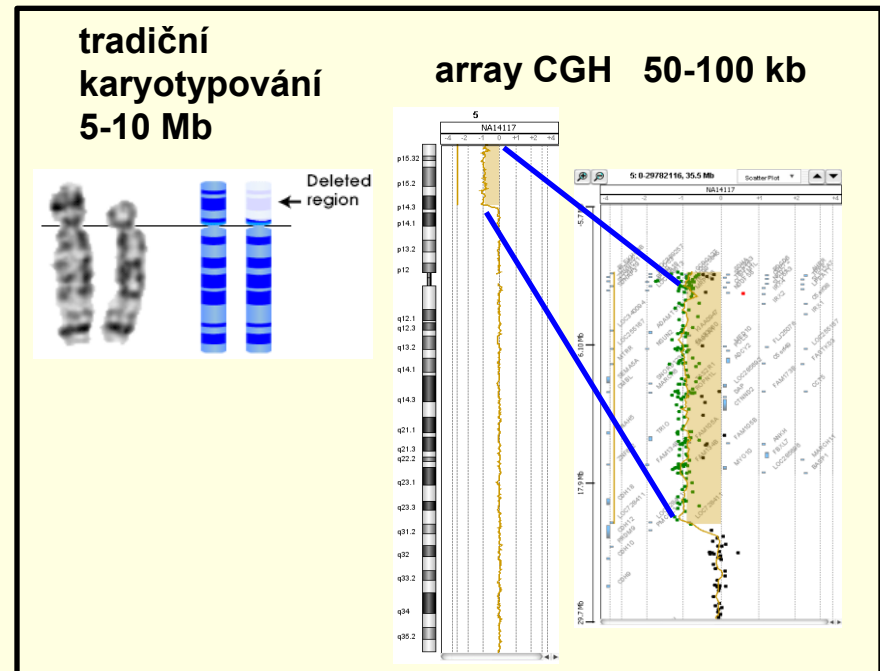
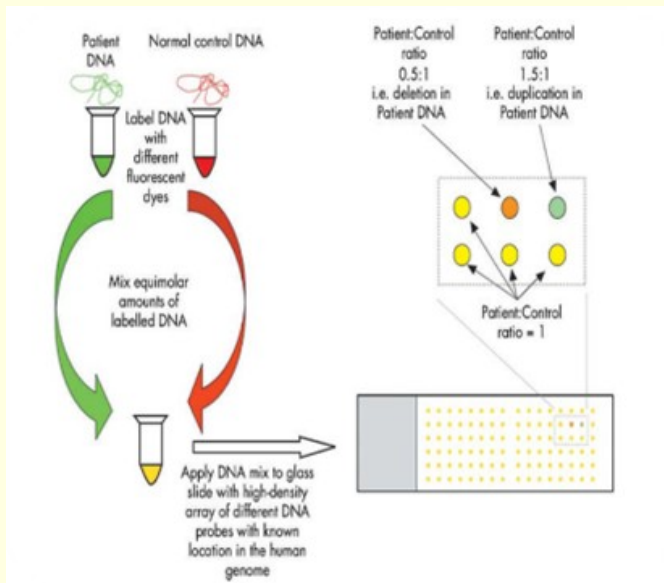


- parciální malovací sondy ze specifických oblastí chromozomů
- fluorescenční signály jednotlivých sond se podél sledovaného chromozomu částečně překrývají a dochází k jejich kombinaci
- umožňuje rozlišení intrachromozomových přestaveb (inverzí)

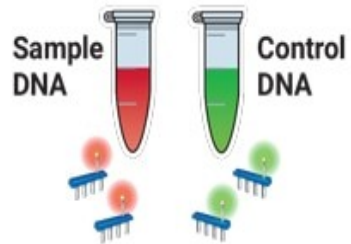


Komparativní genomová hybridizace na čípech (array-CGH)

- 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 .

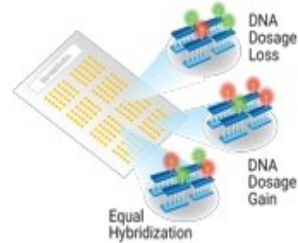


Extract & Label DNA



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.

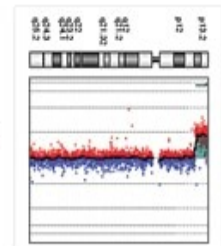
Scan



Detect red and green signals using a fluorescence scanner.

Analyze Data

CytoGenomics Software

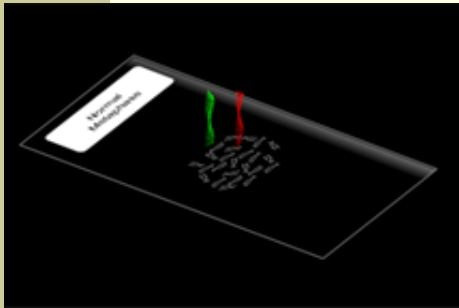


Compute and report gains or losses in the test DNA using software.

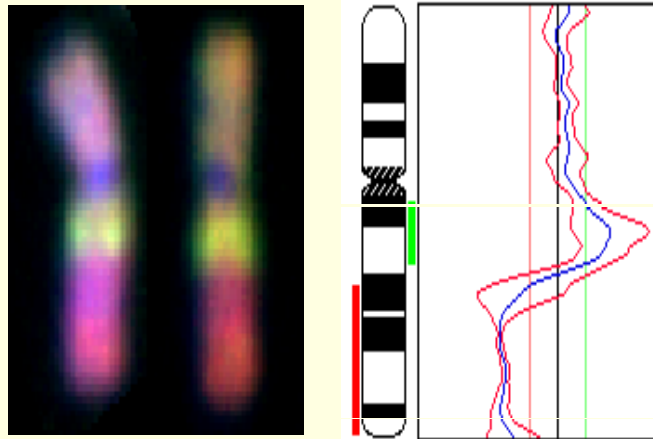


Původ metody array-CGH

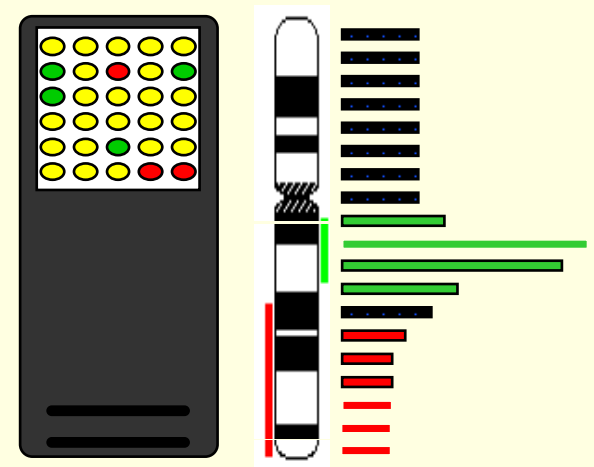
- *Solinas-Toldo a kol., 1997*
- vyhází z principu klasické (chromosomální) CGH
- nahrazení chromozomů separovanými klony (BAC, c-DNA klony, oligonukleotidy)



CGH



Array-CGH



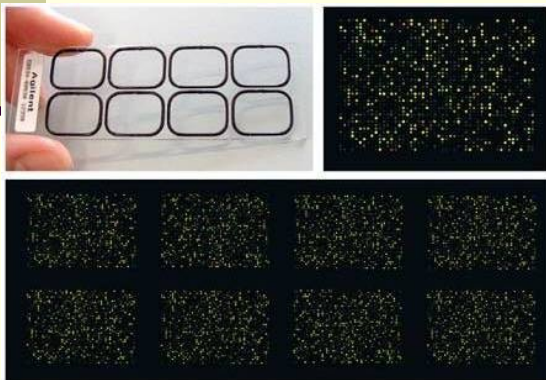
Agilent Human CGH Microarray

Oligo arrays

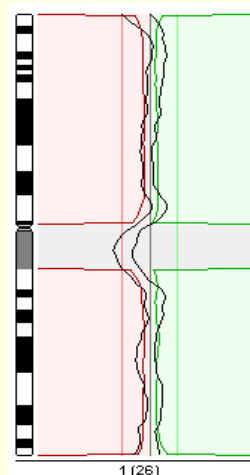
- 8x15K custom chip
- 4x44K 43 kb rozlišení
- 2x105K 21 kb rozlišení
- 1x244K 9 Kb rozlišení

Nové typy – Sure Print G3 Human

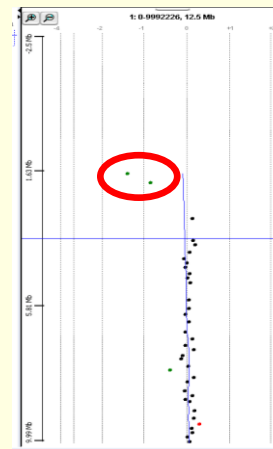
- 8x60K 41 Kb rozlišení
- 4x180K 13 Kb rozlišení
- 2x400K 5 Kb rozlišení
- 1x1M 2 Kb rozlišení



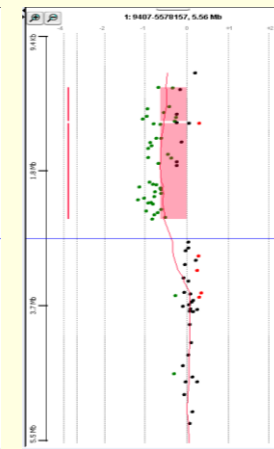
del(1)(p36), cca 3 Mb



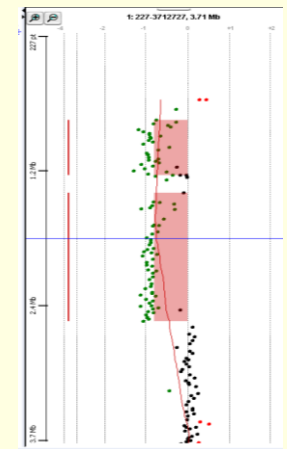
HRCGH
negativní



8x15K
negativní



4x44K
del(1)(p36)



2x105K
del(1)(p36)

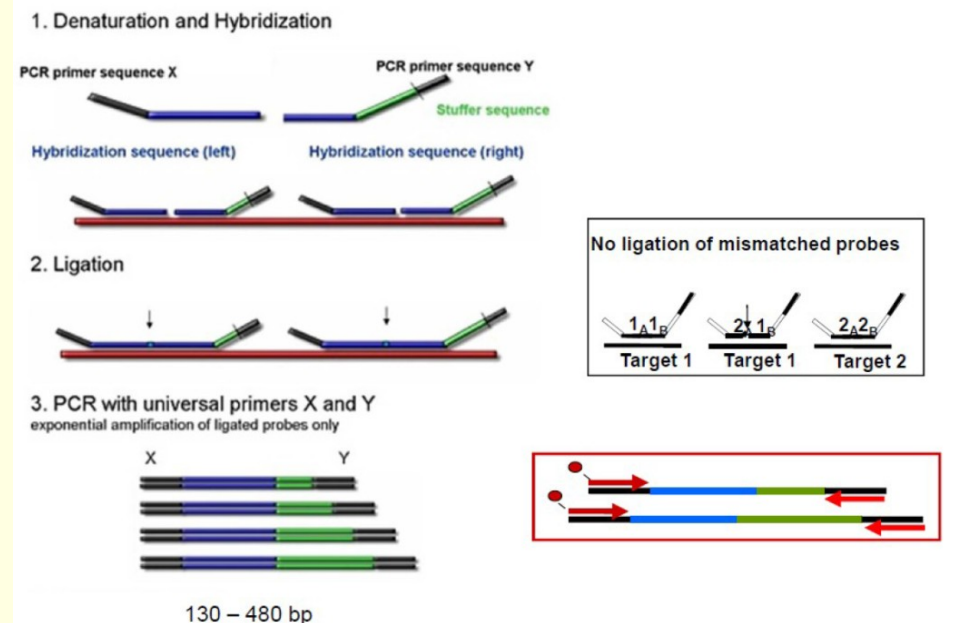
Interpretace nálezů CNVs musí probíhat vždy v kontextu s:

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

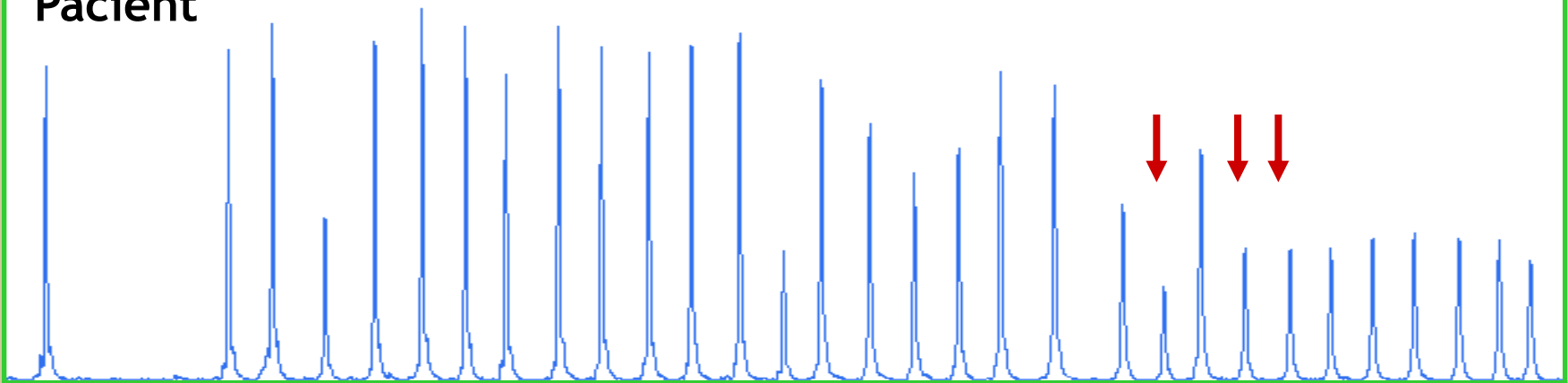
- jedná se o speciální formu multiplex PCR, při které se amplifikují MLPA sondy a ne zkoumaná DNA
- **detekuje změny počtu kopií (především rozsáhlejších delecí/duplikací) až 50 specifických sekvencí v jedné PCR reakci**
- dokáže odlišit sekvence lišící se v jediném nukleotidu;
- další aplikace – stanovení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



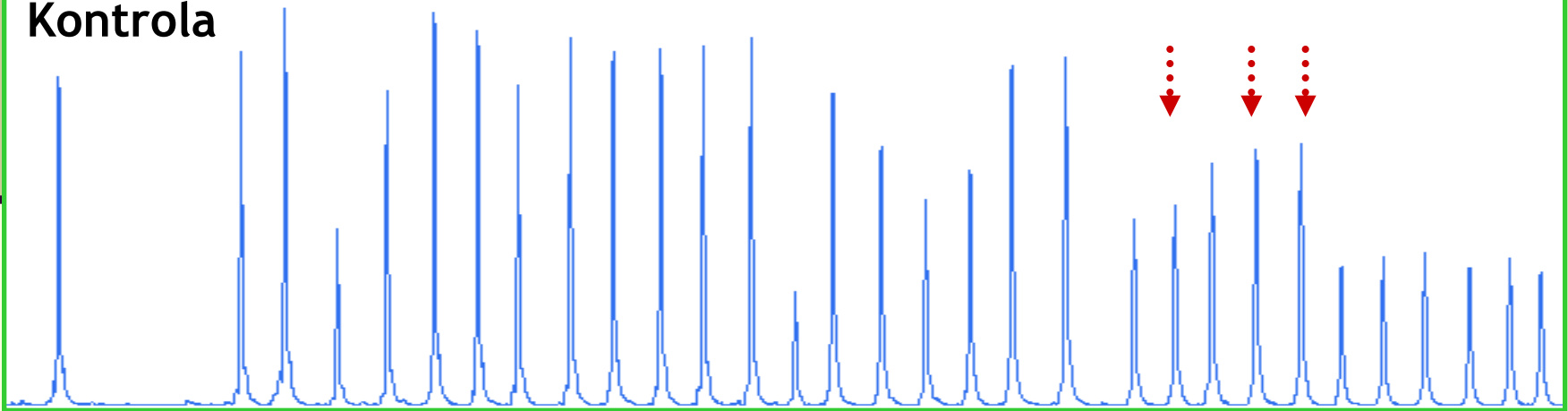
<https://files.mrcholland.com/kb/articles/22/how-does-mlpa-work.mp4>

MLPA princip

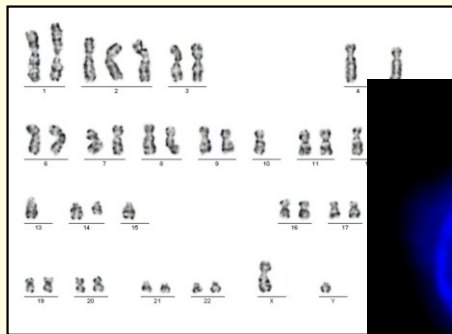
Pacient



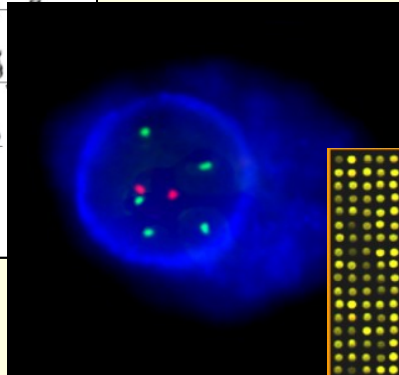
Kontrola



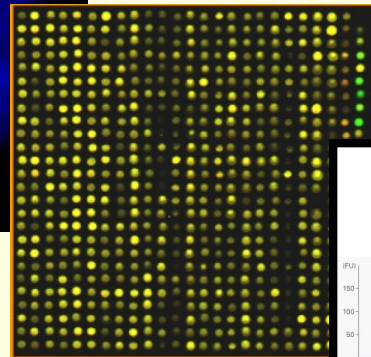
Vývoj nových cytogenetických technik pro detekci chromozomových změn



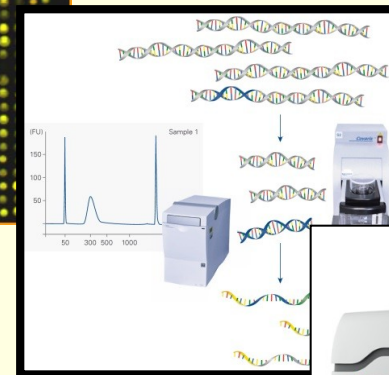
1971 G-pruhování (5 – 10 Mb)



1986 Molekulární cytogenetika
FISH (100 kb)



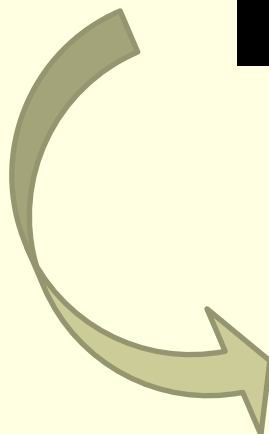
1997 array-CGH (oligo 0,06 kb)



2000 NGS

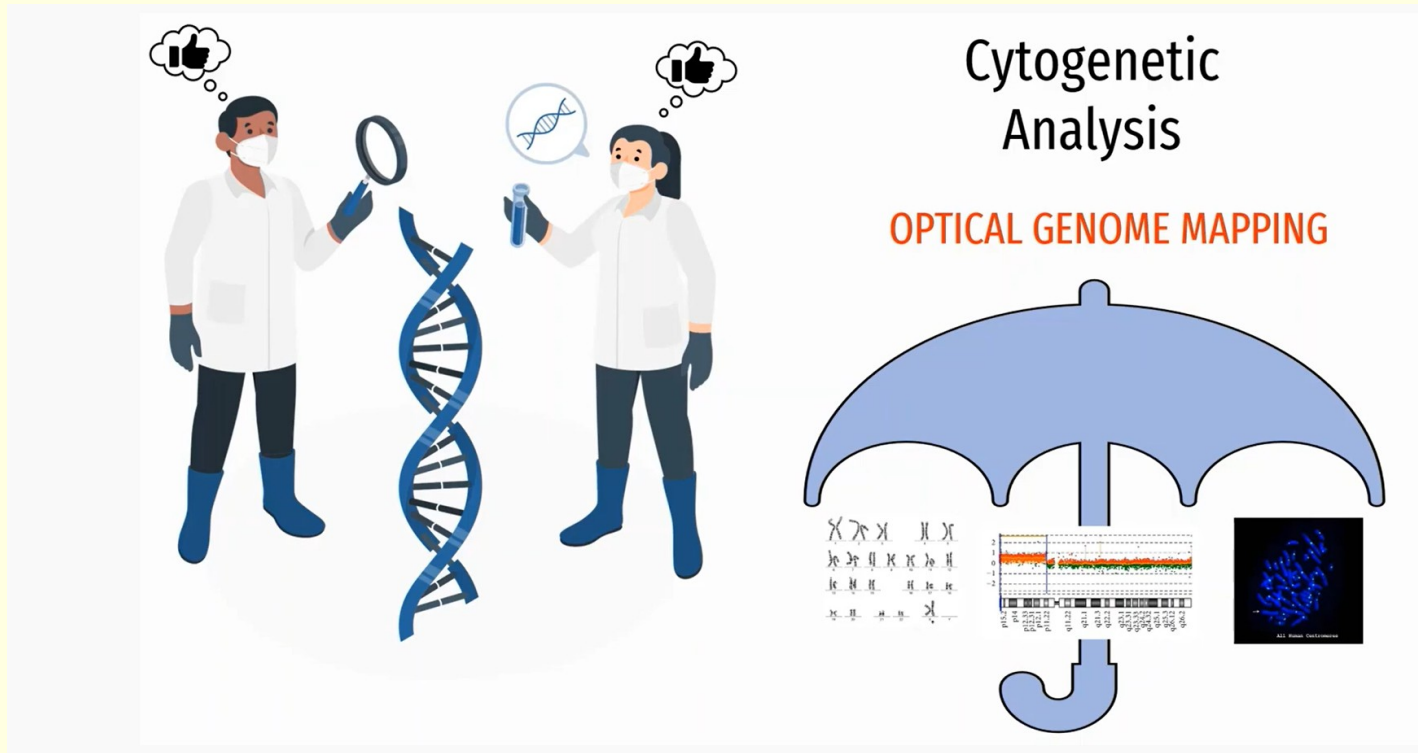


2023 Optical mapping



Od chromozomů
...k analýzám DNA

Existuje univerzální metoda, která by nahradila vše?



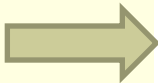
<https://bionano.com/videos/saphyr-ogm-technology-overview-video/>

Optical mapping for clinical structural variant detection

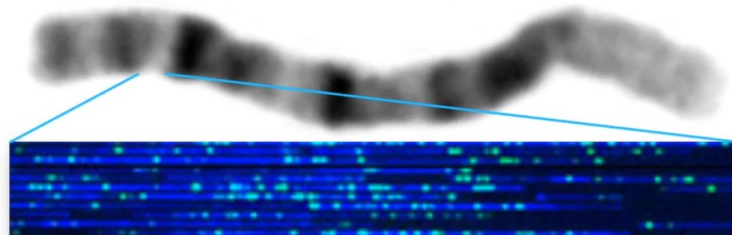
Alexander Hoischen

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

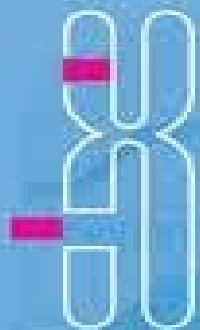


Next generation cytogenetics

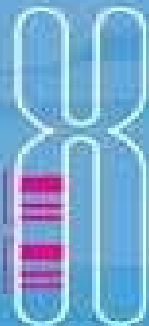


Cytogenetics with 500,000 'bands' i.e. labels ~10,000 improved sensitivity!

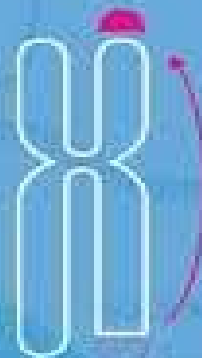
- Genomewide analysis
- Positional information
- Single molecule resolution



Deletions



Duplications

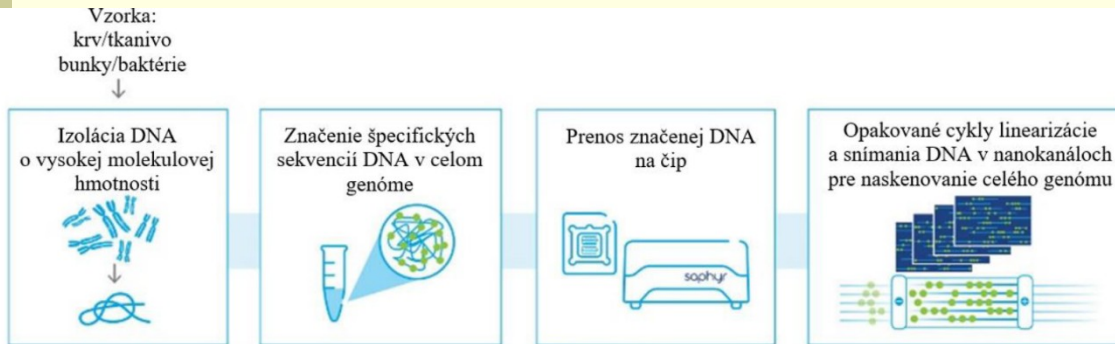


Translocations



Inversions

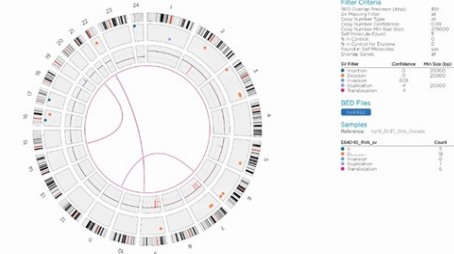
Optické mapování genomu - postup



Efektívne snímanie molekúl DNA o dĺžke niekoľko megabáz s vysokým rozlíšením

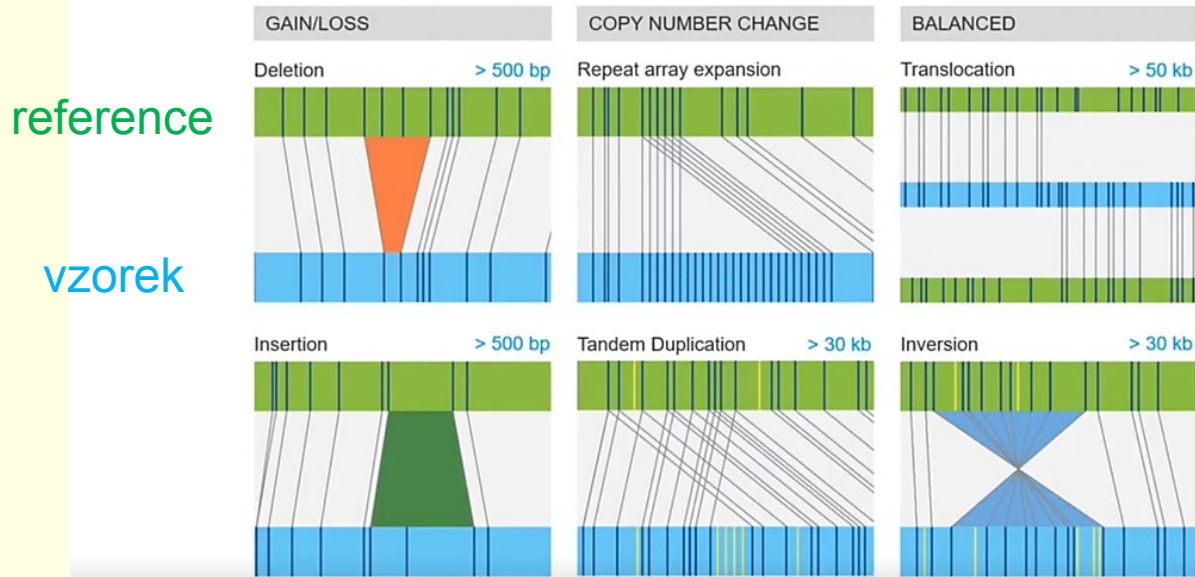


Visualize and Manipulate Maps and Structural Variants

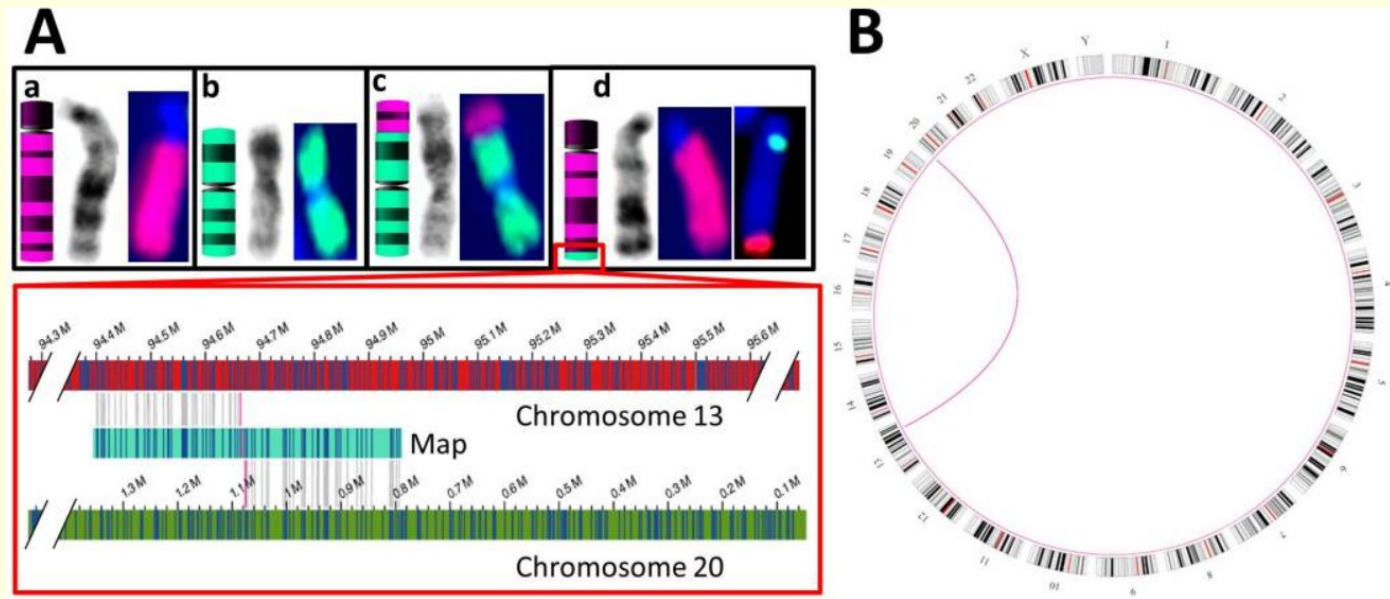


Detekce chromozomových aberací pomocí optického mapování

Structural variant calling by optical mapping



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



VÝSLEDKY

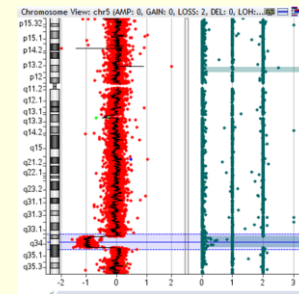
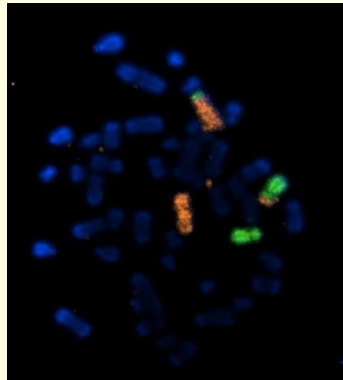
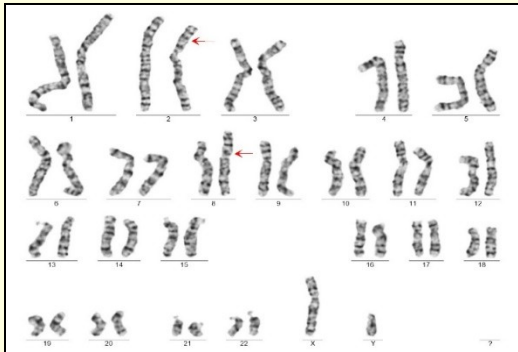
Pacienti s definovanou strukturní změnou – Proband 3

- kluk, nar. 2021, symptomatická epilepsie a epileptický syndrom, febrilný status epilepticus
- rodiče zdraví nepříbuzní

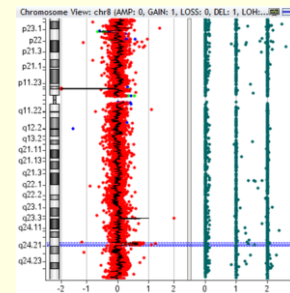
Karyotyp: 46,XY,t(5;8)(q31;q13)

FISH: t(5;8)

aCGH: del(5)(q33.2q34) - GABA receptory
dup(8)(q24.13)

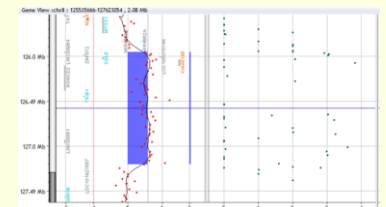
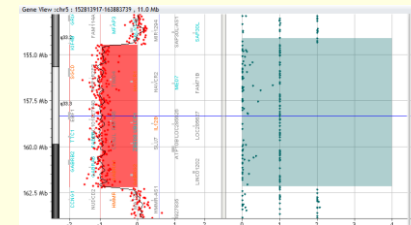


del(5)(q33.2q34) - GABA receptory



dup(8)(q24.13)

4x180K SurePrint G3
CGH+SNP Agilent



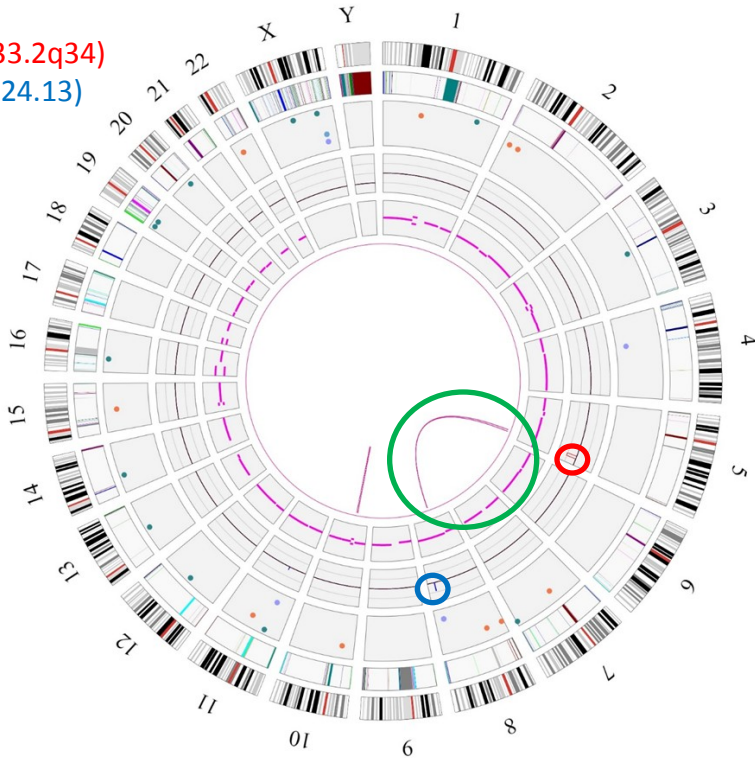
VÝSLEDKY

Proband 3

t(5;8)

del(5)(q33.2q34)

dup(8)(q24.13)



Name: O4 De novo
Sample: O4
Reference: hg19_DLE1_Okb_Olabels.cmap

SV Filters	
Feature SV Overlap Precision (Kbp):	12
SV Masking Filter:	non masked
VAF Filter:	0-1
Self Molecule Count:	0
% in Control Database:	0
% in Control Database for Enzyme:	2
SV Chimeric Score:	all
Found in Self Molecules:	yes
Overlap Genes:	all

CNV Filters	
Feature CNV Overlap Precision (Kbp):	500
Copy Number Type:	all
Copy Number Confidence:	0.99
Copy Number Min Size (bp):	250 000
Copy Number Masking Filter:	all

Aneuploidy Filters	
Aneuploidy Type:	all
Aneuploidy Confidence:	0.95

AOH/LOH Filters	
AOH/LOH Minimum Size (bp):	25 000 000

SV Filter	Confidence	Min Size (bp)
● Insertion	0	
● Deletion	0	
● Inversion	0.7	
● Duplication	-1	
● Intra-Fusion	0.05	
● Inter-Translocation	0.05	

Feature File: cnv_mask.bed SV CNV Action

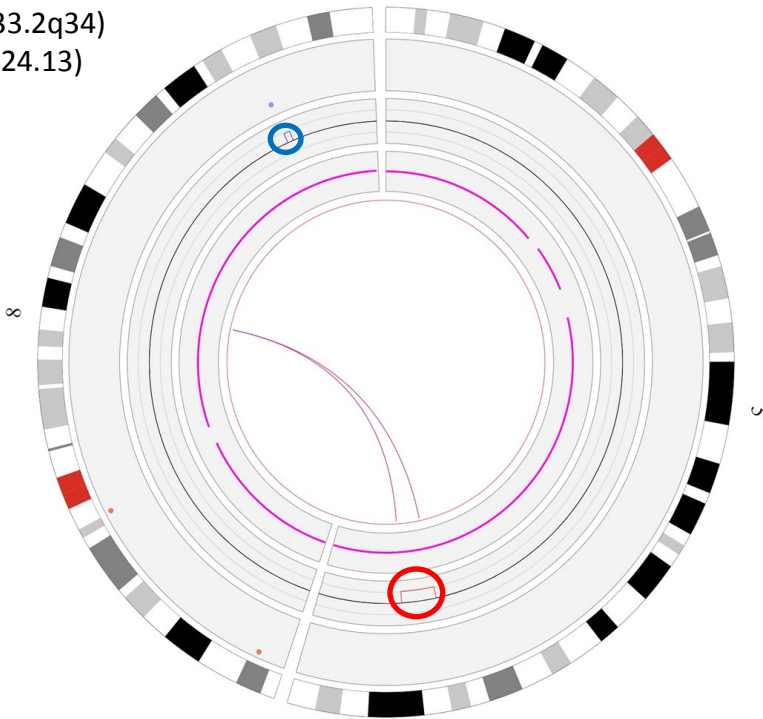
Category	Count
● Insertion	15
● Deletion	11
● Inversion	2
● Duplication	6
● Intra-Fusion	2
● Inter-Translocation	4
● AOH/LOH Region	0
● CNV Gain Segment	2
● CNV Loss Segment	1
● Aneuploidy Gain	0
● Aneuploidy Loss	0

Circos Tracks (start from outer rings)
Cytoband
cnv_mask.bed Feature
SV track
CNV track
VAF segments
Translocations

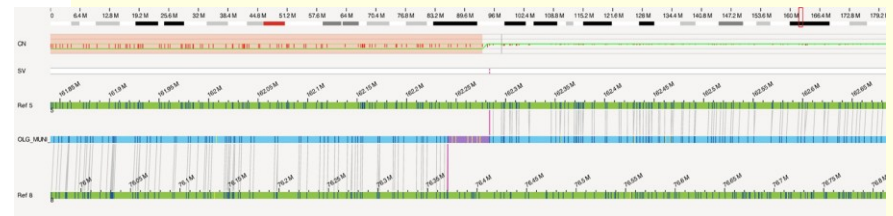
VÝSLEDKY

Proband 3

t(5;8)
del(5)(q33.2q34)
dup(8)(q24.13)



t(5;8); del(5)(q33.2q34)



ogm[GRCh37]t(5;8)(q34;q21.11)(154,464,548~162,283,811;76,370,347~76,382,253)
ogm[GRCh37] 5q33.2q34(154464548_162276558)x1

dup(8)(q24.13)



ogm[GRCh37] 8q24.13(125936927_127239385)x3

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

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

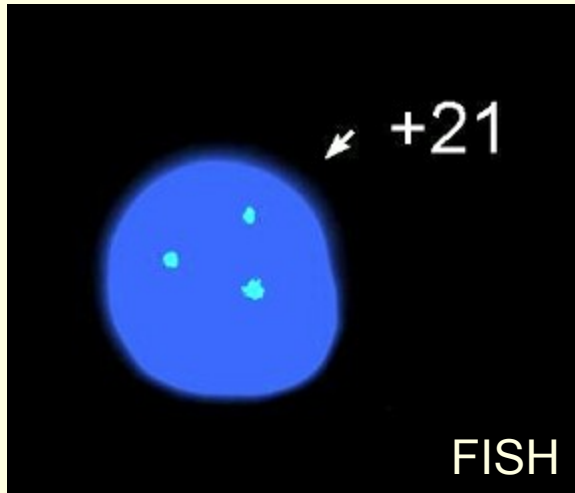
Detekce strukturních změn:

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

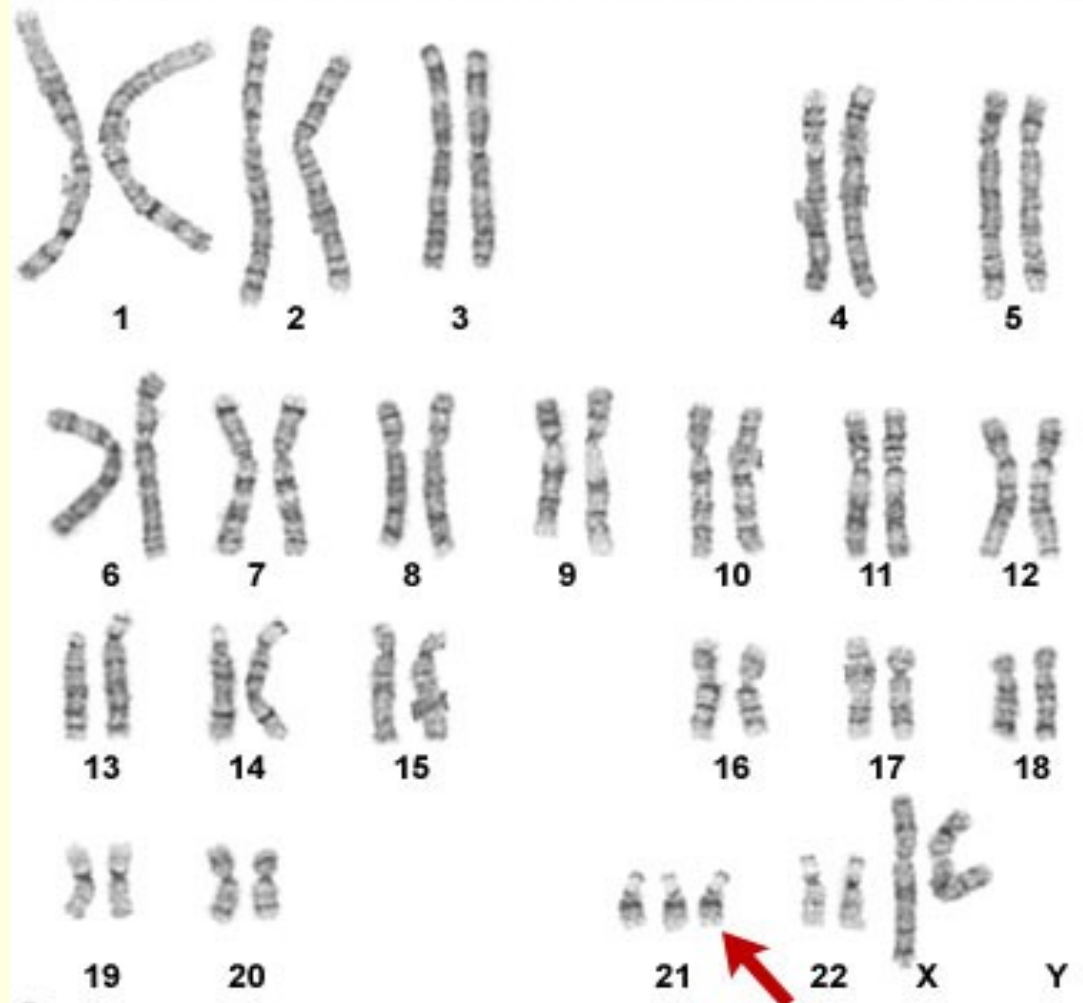
Detekce LOH, UPD

Využití metod molekulární cytogenetiky (příklady)

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



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



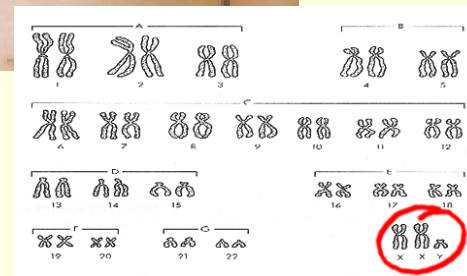
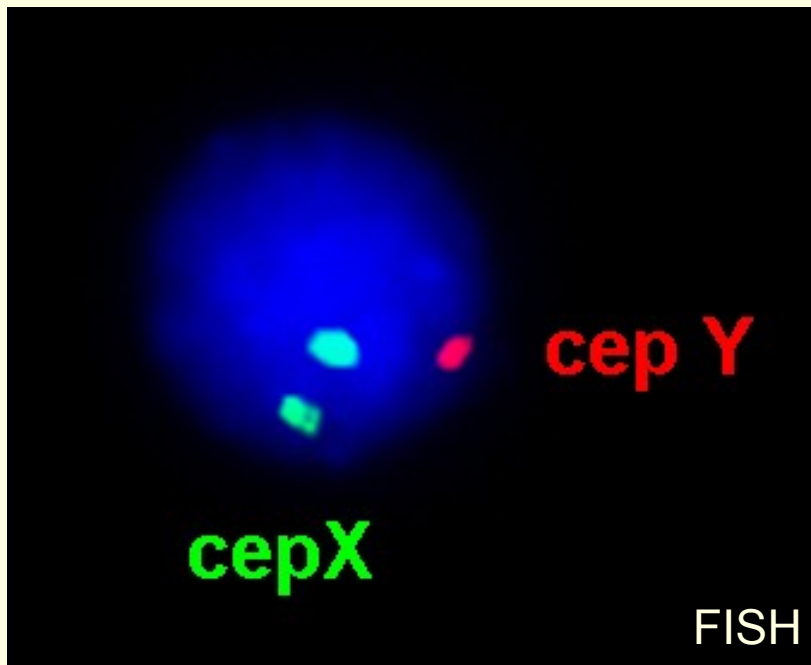
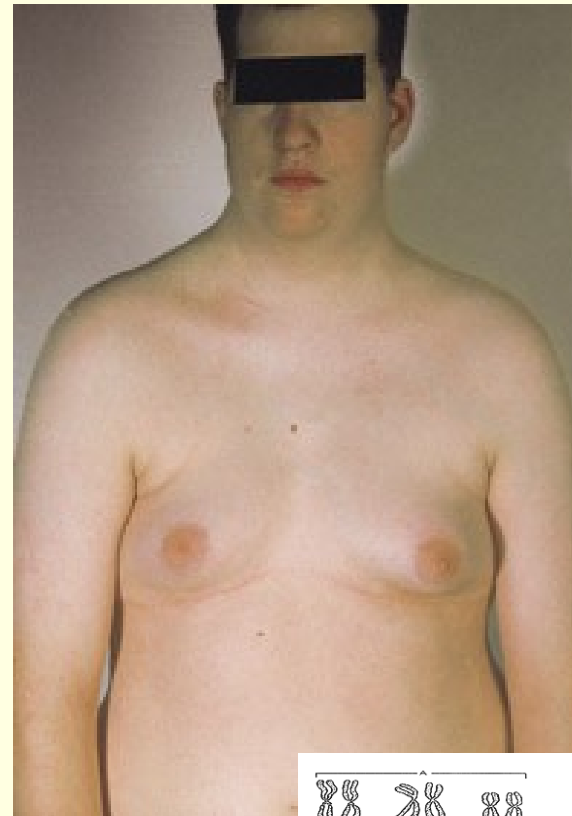


Využití metod molekulární cytogenetiky

(příklady)

numerické změny: Klinefelterův syndrom

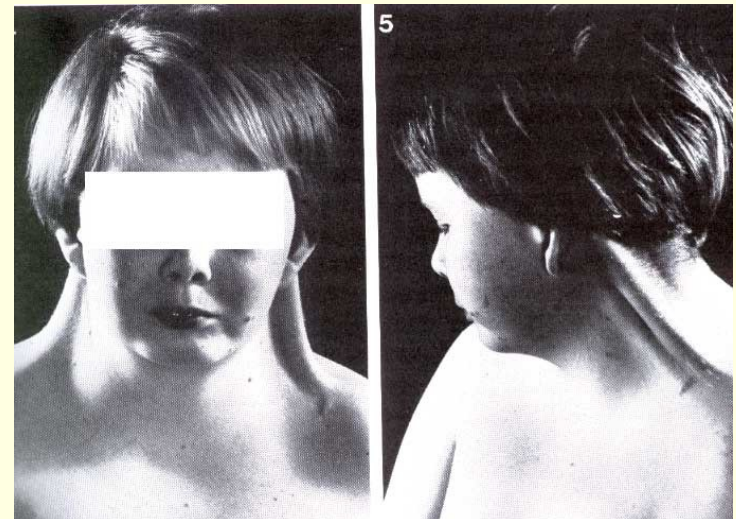
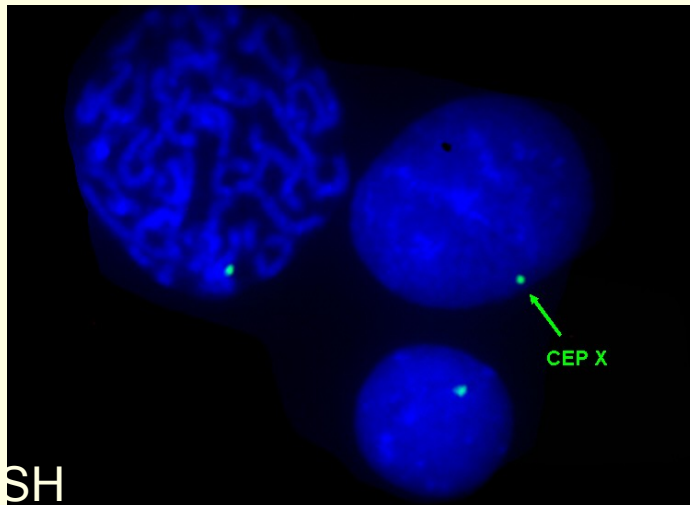
- **47,XXY**
- vysoká postava, porucha růstu vousů, ženská distribuce podkožního tuku, PMR



Využití metod molekulární cytogenetiky (příklady)

numerické změny: Turnerův syndrom

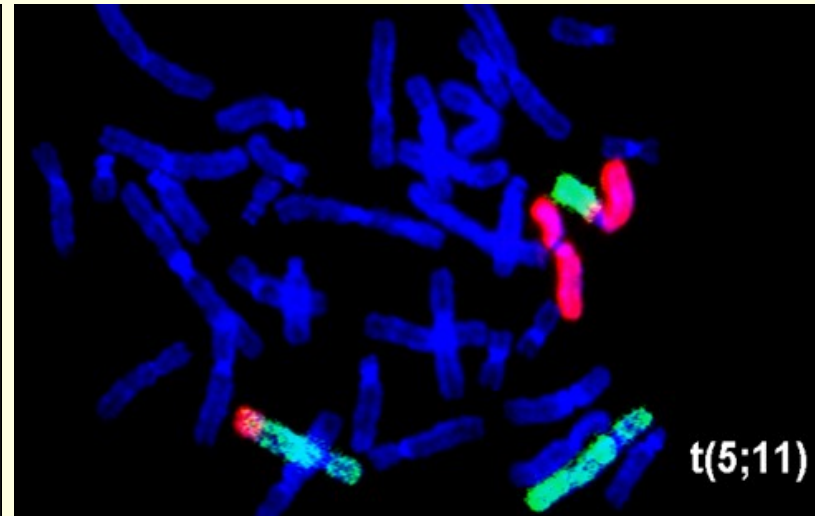
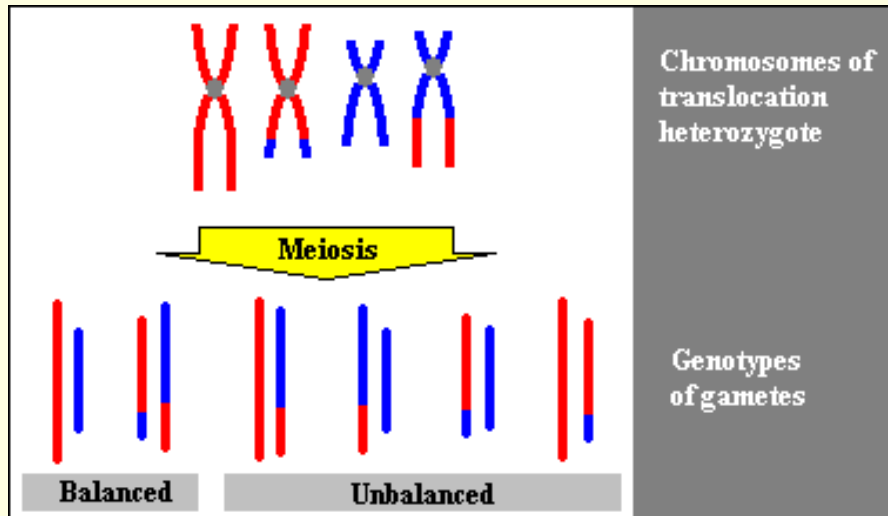
- **45,X**
- chybí jeden chromozom X
- 1/2500 dívek
- 95 % SA
- malá postava, chybí vaječníky až sterilita



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

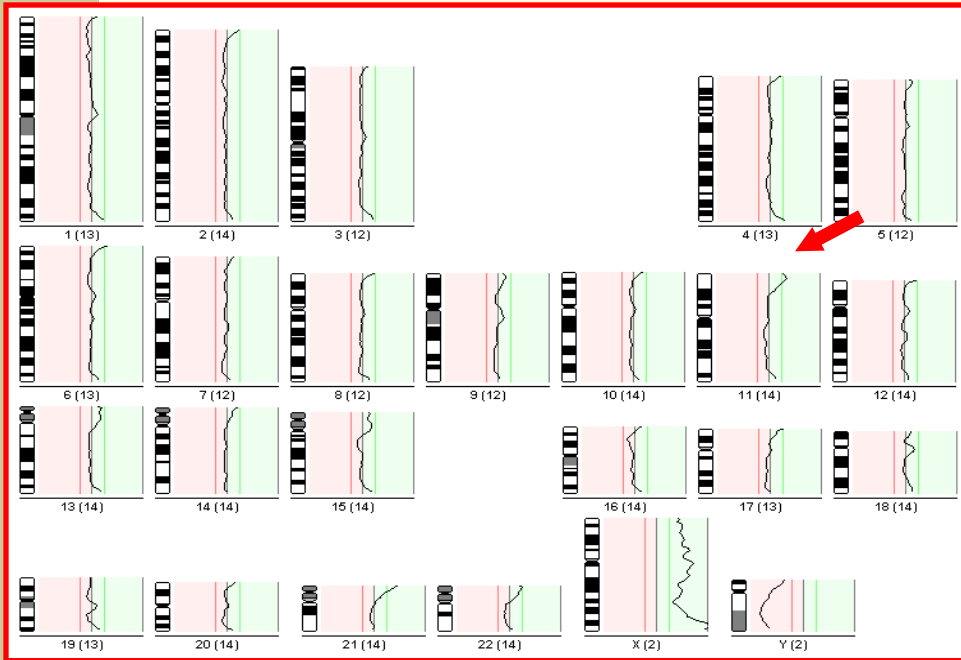
- děvče, rok narození 2002
- dg: stigmata - mongoloidní postavení očí, hyperplastická gingivální sliznice, soudkovitý hrudník, velké rozlité břicho
- matka 46,XX, inv(9), otec 46,XY,add(1)[87]/46,XY[13]



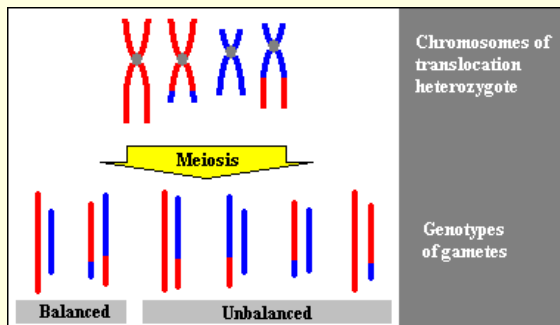
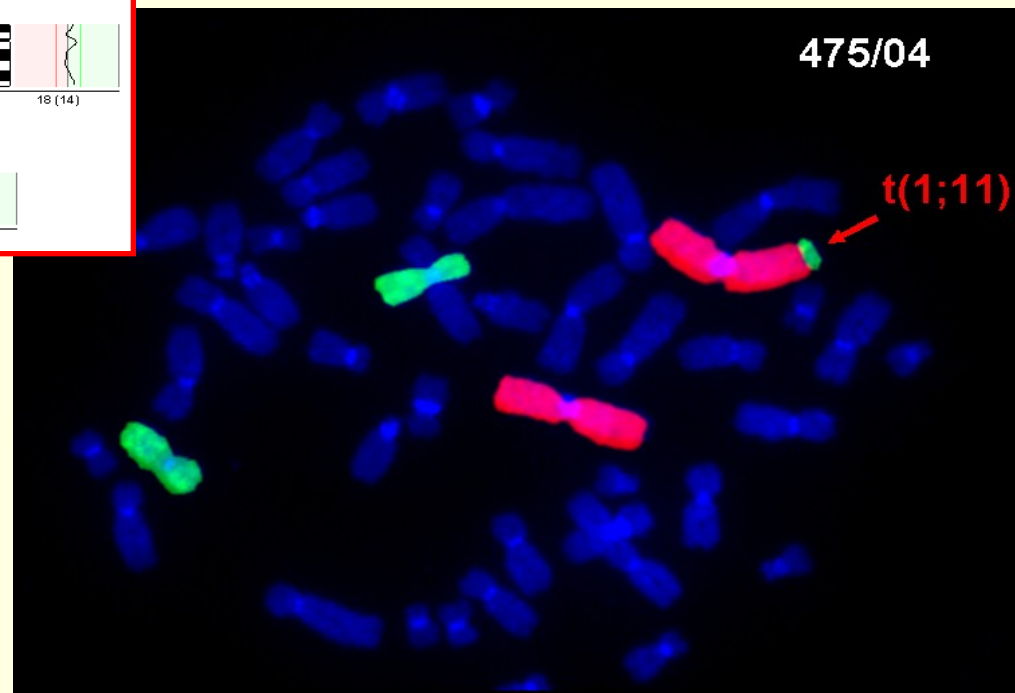
46,XX,add(1)

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:

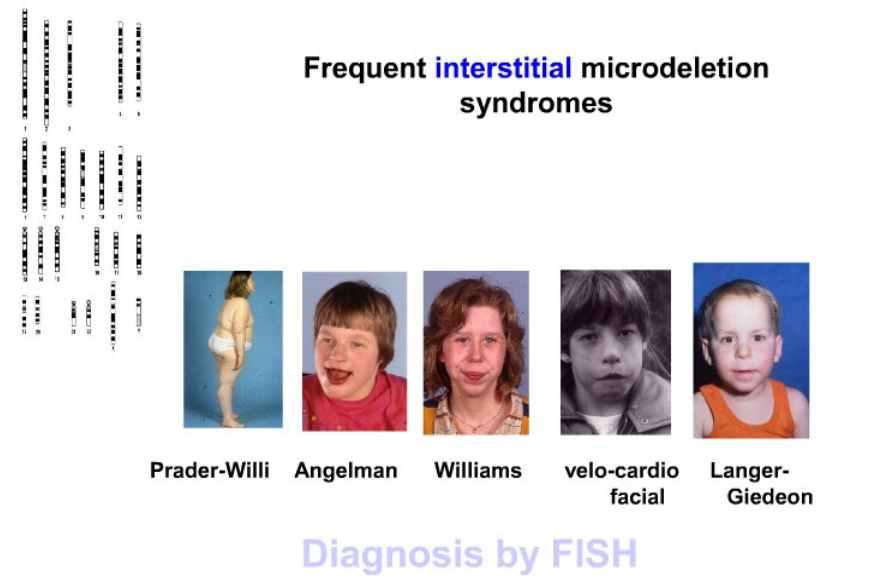
DiGeorgeův/Velokardiofaciální syndrom

Prader-Williho a Angelmanův syndrom

Williamsův-Beurenův syndrom

Obecné příznaky:

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

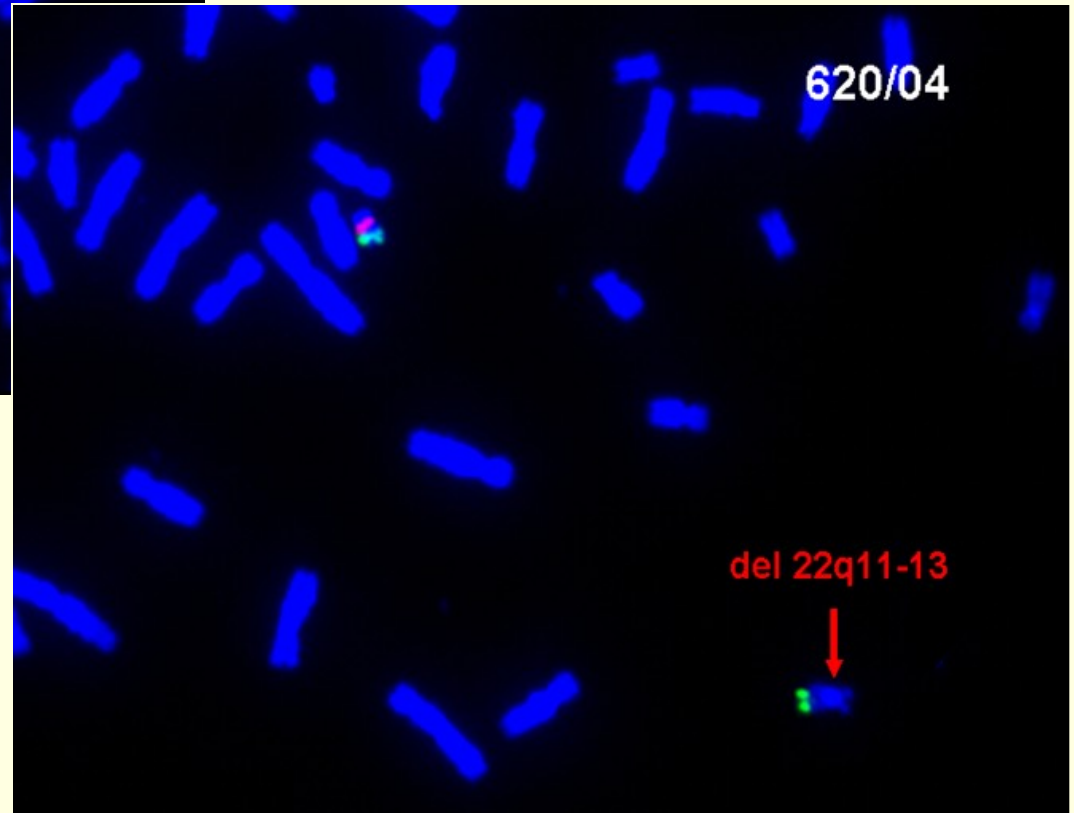
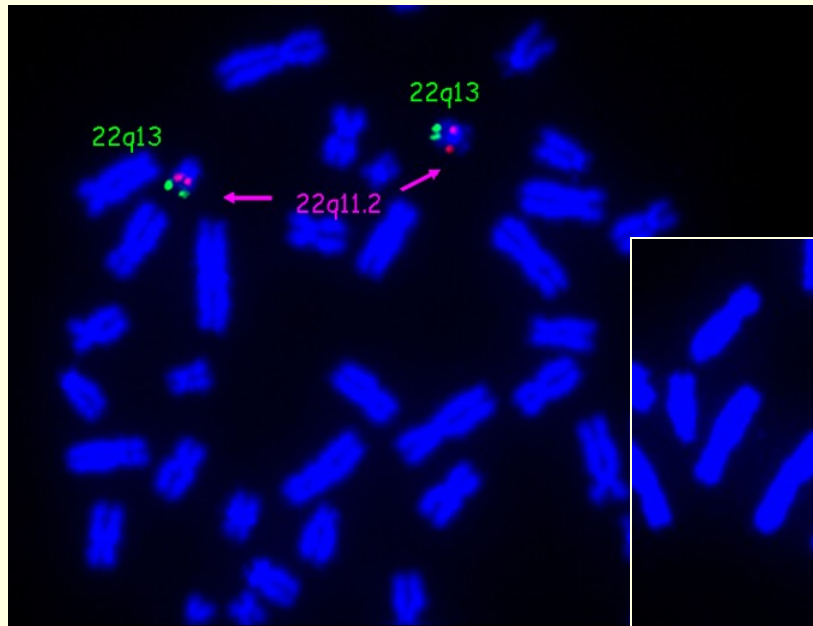


Mikrodeleční syndrom	Lokalizace	Nejčastější velikost přestavby [kb]	Četnost v populaci
DiGeorgeův syndrom/ Velokardiofaciální syndrom	22q11	3 000	1:4 000
Williamsův-Beurenův syndrom	7p11.23	2 000	1:10 000
Smith-Magenisův syndrom	17p11.2	5 000	1:25 000
Prader-Williho syndrom/ Angelmanův syndrom	15q11-q13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

Využití metod molekulární cytogenetiky

FISH: detekce mikrodelečních syndromů

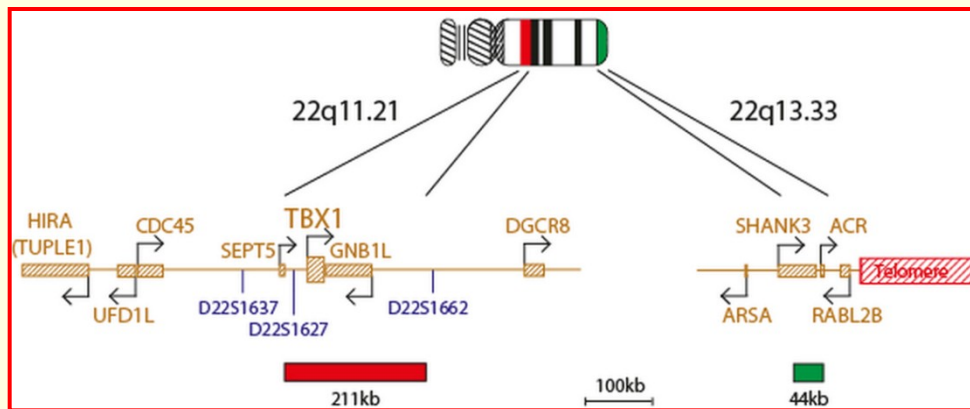
– např. del 22q11 **DiGeorge syndrom**



- SRDEČNÍ VADY
- ANOMÁLIE TVÁŘE
- PORUCHY IMUNITY

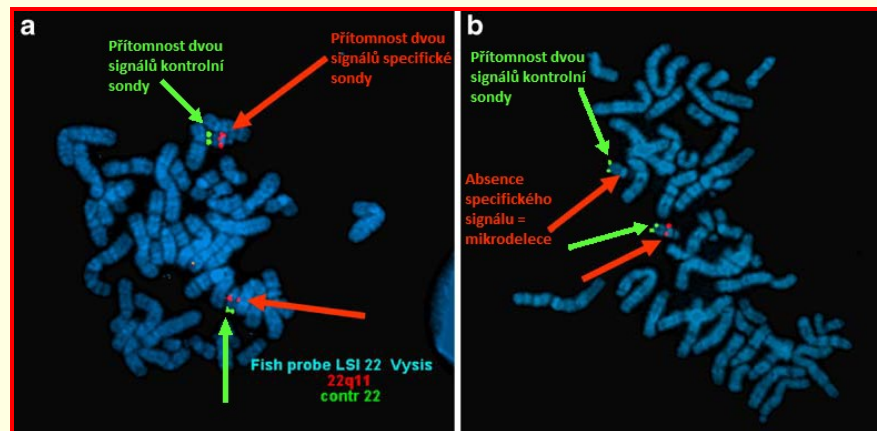
Využití metod molekulární cytogenetiky

FISH: DiGeorge syndrom del 22q11



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

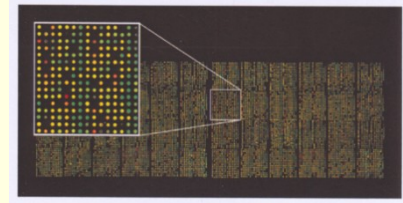
Dvoubarevná FISH



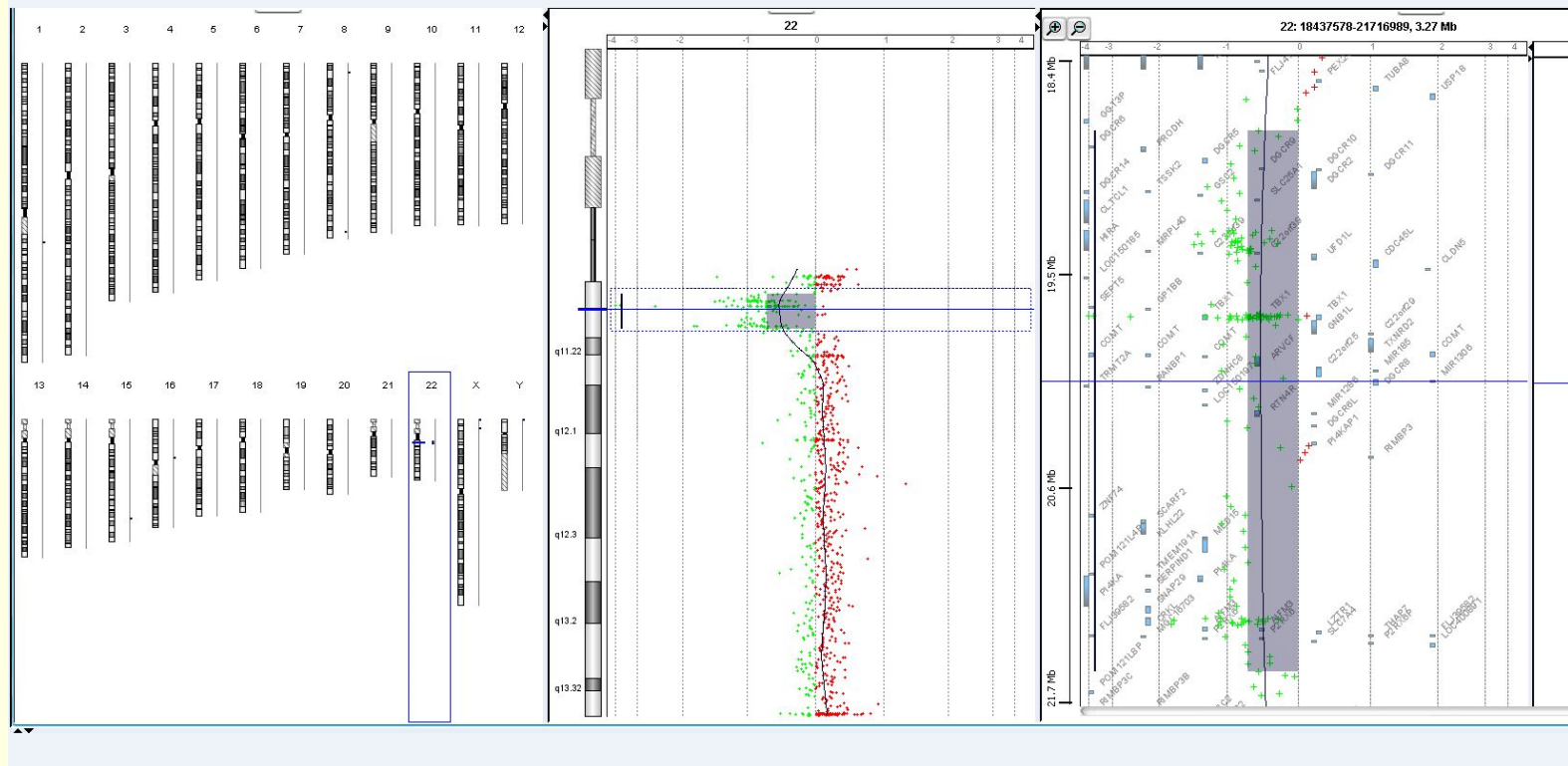
Obrázek: Ukázka normální mitózy a mitózy s mikrodeleci 22q11 vyšetřená pomocí techniky FISH (de Ravel *et al.*, 2007; upraveno)

Využití metod molekulární cytogenetiky

Array CGH: DiGeorge syndrom del 22q11



Pomocí DNA čipů zjistíme i velikost mikrolece



Array-CGH profil DNA pacienta s mikrolepci 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**

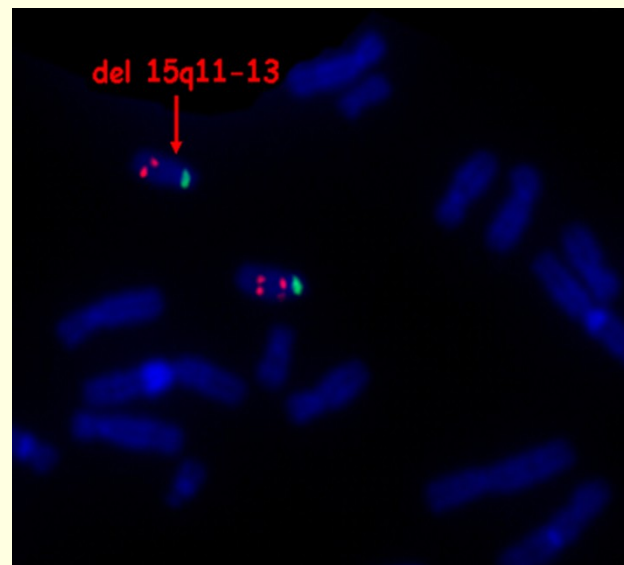
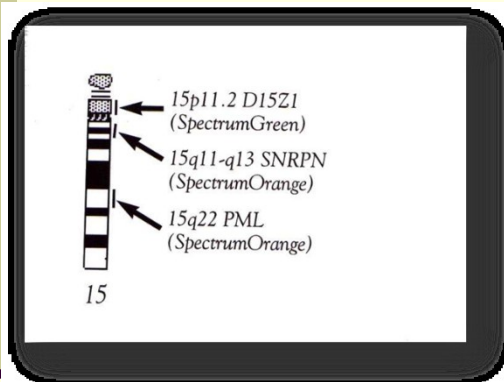
del 15q11-13

Metody pro stanovení diagnózy PWS a AS

Cytogenetické : karyotyp - translokace

Molekulárně cytogenetické : FISH - mikrodelece

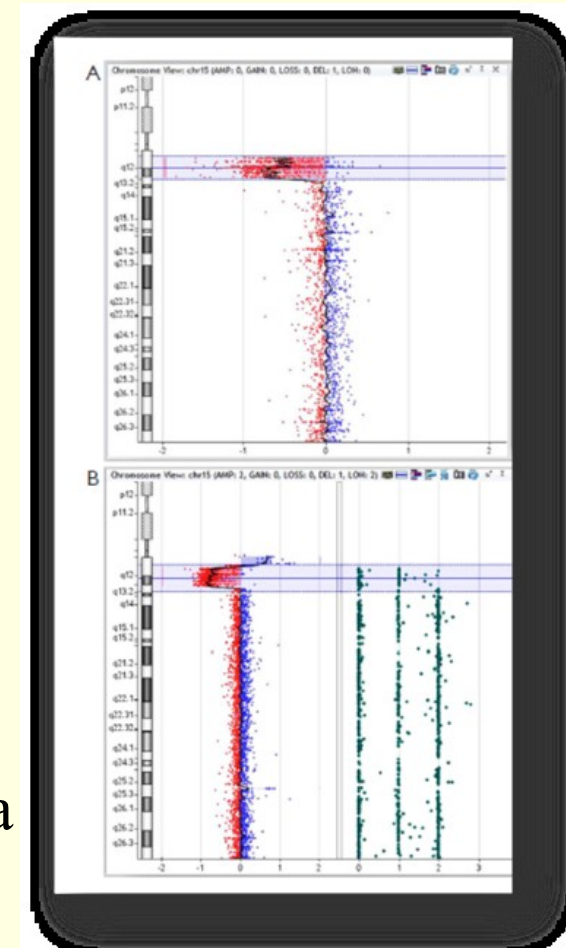
15q11-13 DNA sonda



MLPA, array-CGH

Molekulárně genetické:

PCR - uniparentální disomie, Metylační analýza



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 %)

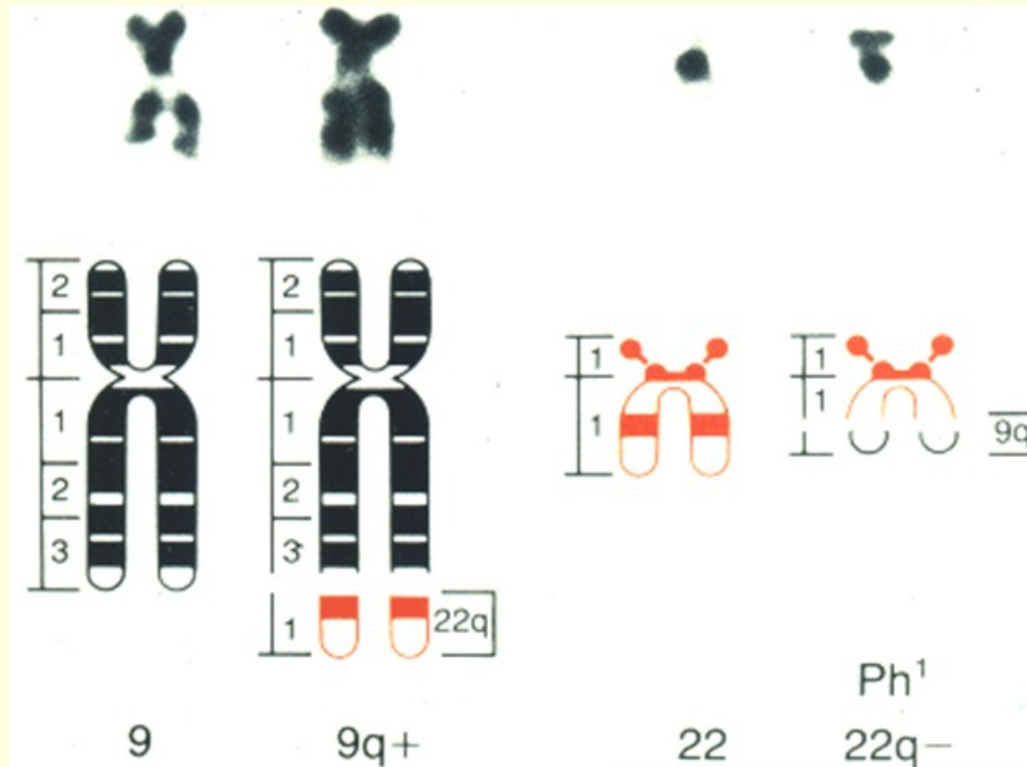
Využití metod molekulární cytogenetiky

onkocytogenetika (příklad reciproké translokace)

Chronická myeloidní leukemie (CML)

Philadelphský chromozóm

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



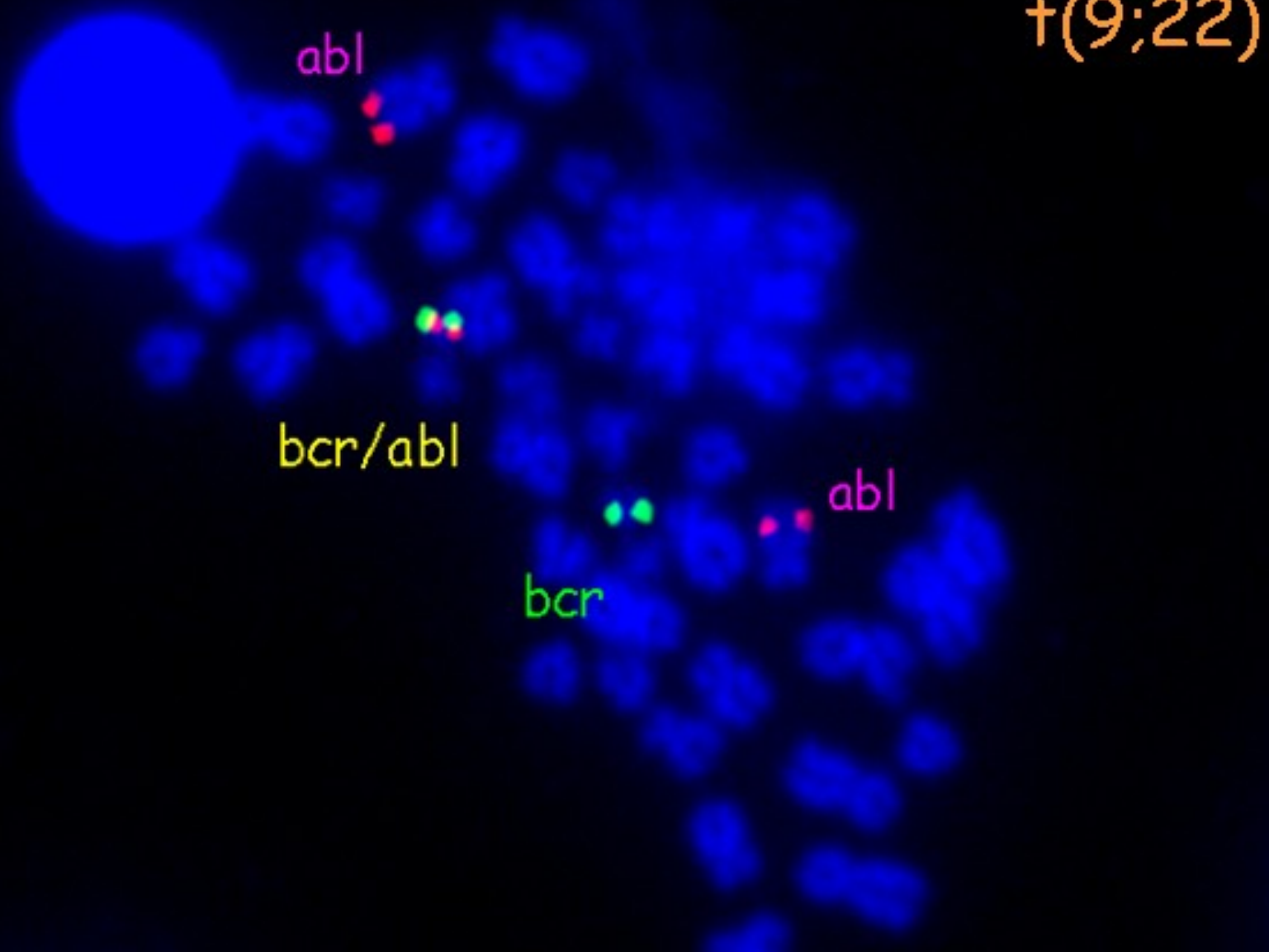
+ (9;22)

abl

bcr/abl

bcr

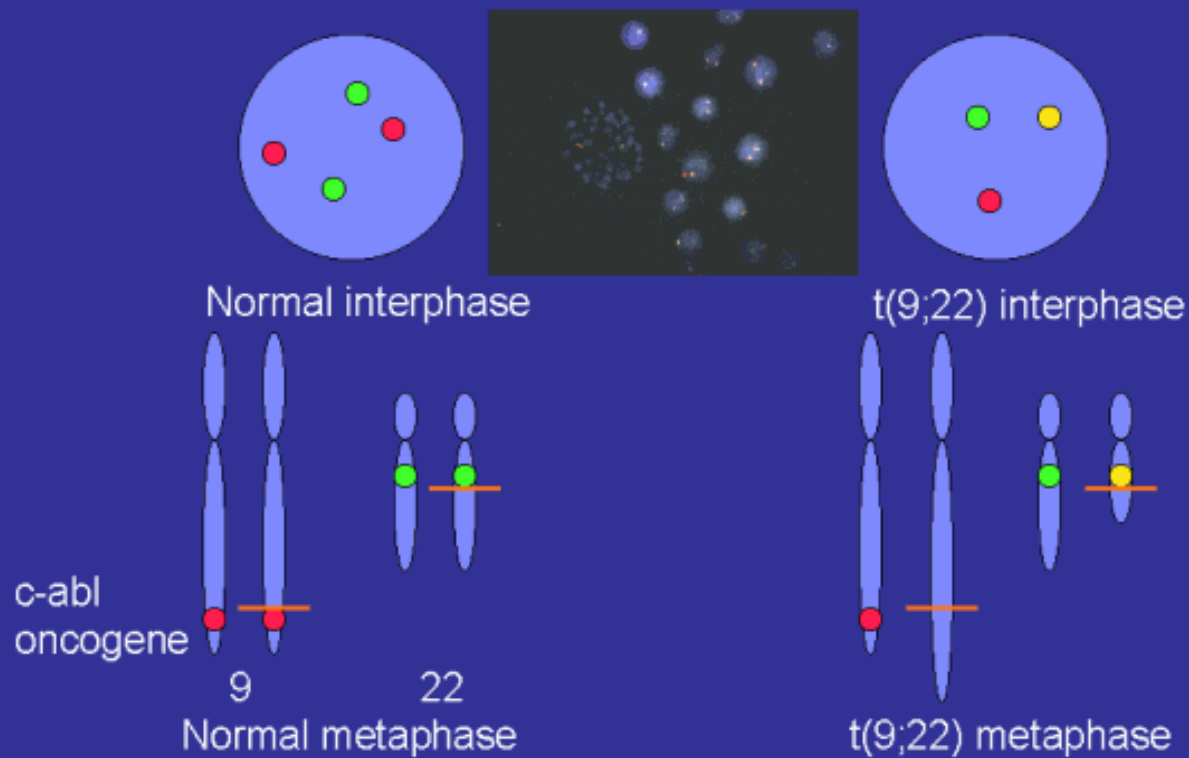
abl



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

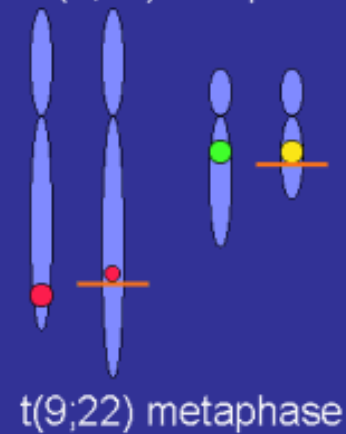
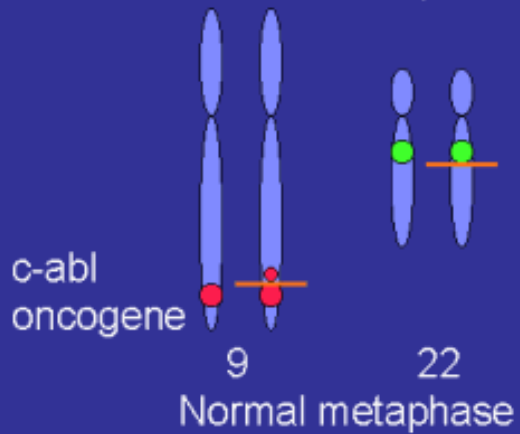
Larger probe – spanning the breakpoint



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

